

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047669**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.22

(21) Номер заявки
202291870

(22) Дата подачи заявки
2021.02.25

(51) Int. Cl. **A61K 47/00** (2006.01)
A61K 47/06 (2006.01)
A61K 47/14 (2017.01)

(54) **АНТИТЕЛА, КОНЬЮГИРОВАННЫЕ С МОЛЕКУЛАМИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/982,476**

(32) **2020.02.27**

(33) **US**

(43) **2022.10.12**

(86) **PCT/US2021/019583**

(87) **WO 2021/173783 2021.09.02**

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

(72) Изобретатель:
Ли Джек Чунян, Цзя Хайцюнь, Цзоу Хой, Ван Минхань (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **US-A1-20130150563**
US-A1-20060099208
US-A1-20170058053
US-A1-20160176964

(57) В изобретении описаны моноклональные антитела (mAb), или биспецифические антитела (bsAb), или мультиспецифические антитела, содержащие молекулу жирной кислоты (FA), конъюгированную с антигенсвязывающим доменом или вблизи него. Также описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, композиции, содержащие антитела, и способы получения антител и применения антител для лечения или профилактики заболеваний, таких как рак и/или связанные с ним осложнения.

B1

047669

047669

B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку

По данной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/982476, поданной 27 февраля 2020 г. Это описание полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение предлагает моноклональные выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат: (а) переменную область тяжелой цепи (VH); и переменную область легкой цепи (VL); где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны к специфическому связыванию с антиген-мишенью; где аминокислотный остаток в VH, VL или на расстоянии двадцати (20) аминокислот, предпочтительно, на расстоянии пяти (5) аминокислот, от VH или VL заменен аминокислотным остатком, способным к конъюгации с жирной кислотой (FA); и где после конъюгации с FA на замещенном аминокислотном остатке, моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент все еще способны к специфическому связыванию с антиген-мишенью; и где моноклональное антитело, конъюгированное с FA, или его антигенсвязывающий фрагмент снижает или устраняет специфическое связывание с антиген-мишенью в присутствии физиологических уровней альбумина (например, от 35 до 50 мг/мл). Настоящее изобретение также относится к мультиспецифическим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, где мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одно или несколько антигенсвязывающих плеч, содержащих замененный аминокислотный остаток, который конъюгирован с FA. Это изобретение также предлагает нуклеиновые кислоты и векторы экспрессии, кодирующие антитела, рекомбинантные клетки, содержащие векторы, и композиции, содержащие антитела. Также предложены способы получения антител, способы конъюгирования антител с FA, способы получения композиций, содержащих конъюгированные антитела, и способы применения конъюгированных антител для лечения рака.

Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде

Эта заявка содержит список последовательностей, который представляется в электронном виде через EFS-Web в виде списка последовательностей в формате ASCII с именем файла "065799.32WO1 Sequence List" и датой создания 22 февраля 2021 и размером 29 кб. Перечень последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью спецификации и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Привлекающие T-клетки агенты представляют собой молекулы, состоящие из двух связывающих доменов, один из которых связывается с опухолеассоциированным антигеном (TAA), экспрессируемым на поверхности раковой клетки, и другой домен связывается с молекулой поверхности T-клетки для активации T-клетки. Хотя различные домены, связывающие T-клетки, использовались в качестве активирующего компонента, анти-CD3 связывающие домены широко использовались как часть привлекающих T-клетки агентов. Анти-CD3 биспецифические антитела используют в качестве иммунотерапевтических агентов, привлекающих T-клетки, для рекрутинга T-клеток к опухолевым клеткам для облегчения уничтожения рака. Одной из основных проблем этого иммуноонкологического подхода является риск синдрома высвобождения цитокинов (CRS). Модулирование активности этих агентов при активации T-клеток на сайтах, удаленных от микроокружения опухоли, может помочь снизить риск CRS и других токсических эффектов.

Жирные кислоты (FA) существуют в высоких концентрациях в циркулирующей крови. Из-за гидрофобной природы, жирные кислоты связываются с молекулами альбумина крови, которые находятся в диапазоне 35-50 мг/мл (Peters, T., 1996. All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications. San Diego, CA: Academic Press Limited). На альбумине идентифицировано семь общих сайтов связывания FA (Bhattacharya et al., J Mol Biol. 2000. 303:721-32; Petitpas et al., J Mol Biol. 2001.314:955-60). Кроме того, было высказано предположение, что опухоли используют альбумин в качестве источника энергии для поддержки своего агрессивного роста (Merlot et al., Front Physiol. 2014. 5:299), что согласуется с высокой скоростью катаболизма альбумина в опухолевых сайтах (HRADEC, Br J Cancer, 1958. 12:290-304, Andersson et al., J Surg Res. 1991. 50:156-62, Schilling et al., Int J Rad Appl Instrum B. 1992. 19:685-95; Stehle et al., Crit Rev Oncol Hematol. 1997, 26:77-100). Высокий оборот альбумина в опухолевых сайтах свидетельствует о снижении концентрации альбумина в микроокружении опухоли. Таким образом, ожидается, что уровень альбумина вокруг некоторых опухолевых клеток будет ниже, чем в циркулирующей крови. Кроме того, сообщалось, что интерстициальные концентрации альбумина значительно ниже в жировой ткани и скелетных мышцах по сравнению с концентрацией в сыворотке (Ellmerer et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 278:E352-E356 (2000)).

Используя более низкие уровни альбумина в тканях, таких как жировая ткань, скелетные мышцы и микроокружение опухоли, по сравнению с циркулирующей кровью, можно использовать связывание FA с альбумином для модулирования активности терапий, таргетирующих ткани или сайты с низким уровнем альбумина. Это можно осуществить с помощью FA, конъюгированной с активным сайтом терапии, так что, когда альбумин связывается с FA, активность терапии снижается или устраняется. Когда этот подход применяется к иммуноонкологическим терапиям, таким как анти-CD3 моноклональные и/или биспецифические антитела, он может снизить риск CRS и других видов токсичности в способах лечения рака.

Сущность изобретения

В одном общем аспекте, изобретение предлагает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит (а) переменную область тяжелой цепи (VH); и переменную область легкой цепи (VL); где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном-мишенью, предпочтительно антигеном-мишенью человека; где аминокислотный остаток в VH, VL или на расстоянии двадцати (20) аминокислот, предпочтительно, на расстоянии пяти (5) аминокислот от VH или VL заменен аминокислотным остатком, который конъюгирован с жирной кислотой (FA); и где после конъюгации с FA на замененном аминокислотном остатке, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент все еще связывается с антигеном-мишенью; и где антитело, конъюгированное с FA, или его антигенсвязывающий фрагмент снижают или устраняют специфическое связывание с антигеном-мишенью в присутствии физиологических уровней альбумина (например, от 35 до 50 мг/мл). Замещенный аминокислотный остаток может, например, представлять собой цистеиновый остаток или лизиновый остаток, или модифицированную аминокислоту, подходящую для химической конъюгации.

В некоторых вариантах осуществления, замененная аминокислота находится в аминокислотном остатке, соответствующем остатку 25, 27, 62, 64, 73, 76, 101, 112 или 113 SEQ ID NO:1, или аминокислотном остатке, соответствующем остатку 26, 27, 52, 53, 56 или 67 SEQ ID NO:2, предпочтительно замена выбрана из замены, соответствующей S25C, Y27C, K62C, K64C, K73C, S76C, D101C, S112C или S113C SEQ ID NO:1 или замену, соответствующую S26C, S27C, S52C, K53C, S56C или S67C SEQ ID NO:2, где остатки пронумерованы по Kabat. В некоторых вариантах осуществления, замененная аминокислота находится в остатке 64, соответствующем SEQ ID NO:1, или в остатке 26, соответствующем SEQ ID NO:2, предпочтительно, замена выбрана из замены K64C, соответствующей SEQ ID NO:1, или замены S26C, соответствует SEQ ID NO:2, где остатки пронумерованы по Kabat.

В некоторых вариантах осуществления, замененная аминокислота находится на остатке 119 или 120 SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12, или остатке 121 или 124 SEQ ID NO:13 или 14, предпочтительно, замена выбрана из S119C или T120C SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12, или S121C или Q124C SEQ ID NO:13 или 14, где остатки пронумерованы в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления, замененная аминокислота находится в остатке 120 SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12, предпочтительно замена представляет собой замену T120C, где остатки пронумерованы в соответствии с нумерацией EU.

В некоторых вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело против модулятора иммунных клеток (ICM) или его антигенсвязывающий фрагмент и способно специфически связываться с ICM, предпочтительно с ICM человека. ICM может быть выбран, например, из группы, состоящей из CD3, CD27, CD28, CD40, CD122, OX40, CD16, 4-1BB, GITR, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT, VISTA, SIGLEC7, NKG2D, SIGLEC9, KIR, CD91, BTLA, NKp46, B7-H3, SIPR α и других иммунорегуляторных молекул клеточной поверхности.

В некоторых вариантах осуществления, анти-ICM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и способно специфически связываться с CD3, предпочтительно, CD3 человека. Выделенное анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, содержать определяющую комплементарную область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарную область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно, или SEQ ID NO:33, 34, 35, 36, 37 и 38, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, замененная аминокислота находится в остатке 25, 27, 62, 64, 73, 76, 101, 112 или 113 в VH анти-CD3 mAb (SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:27) или 26, 27, 52, 53, 56 или 67 в VL анти-CD3 mAb (SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:28), предпочтительно, замена выбрана из S25C, Y27C, K62C, K64C, K73C, S76C, D101C, S112C или S113C в VH (SEQ ID NO:1 или 27) или S26C, S27C, S52C, K53C, S56C или S67C в VL (SEQ ID NO:2 или 28), где остатки пронумерованы по Kabat. В некоторых вариантах осуществления, замененная аминокислота находится на остатке 64 в VH (SEQ ID NO:1 или 27) или 26 в VL (SEQ ID NO:2 или 28), предпочтительно, замена выбрана из замены K64C в VH (SEQ ID NO:1 или 27) или замены S26C в VL (SEQ ID NO:2 или 28), где остатки пронумерованы по Kabat.

Выделенное анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, содержать область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:1 с аминокислотной заменой K64C, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:2; или область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:27 с аминокислотной заменой K64C, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:28; или область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:1, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:2 с аминокислотной заменой S26C; или область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:27, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:28 с аминокислотной заменой S26C; или область константного домена 1 тяжелой цепи (CH1) с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12, с аминокислотной заменой T120C, и область константного домена легкой цепи (CL) с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:13 или 14; или

область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:1, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:2, область CH1 с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12 с аминокислотной заменой T120C, и область CL с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:13 или 14; или область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:27, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:28, область CH1 с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12 с аминокислотной заменой T120C, и область CL с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:13 или 14.

В некоторых вариантах осуществления, предложено выделенное мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, и где мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одно или несколько антигенсвязывающих плеч, содержащих замененный аминокислотный остаток, который конъюгирован с FA. Мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут, например, быть биспецифическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антигенсвязывающее плечо (Ab1) и второе антигенсвязывающее плечо (Ab2), где Ab1 и/или Ab2 содержат замененную аминокислоту, которая конъюгирована с FA.

В некоторых вариантах осуществления, Ab1 связывается с модулятором иммунных клеток (ICM), предпочтительно, ICM человека. ICM можно, например, выбрать из группы, состоящей из CD3, CD27, CD28, CD40, CD122, OX40, CD16, 4-1BB, GITR, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT, VISTA, SIGLEC7, NKG2D, SIGLEC9, KIR, CD91, BTLA, NKp46, B7-H3, SIPR α , и другие иммунорегуляторные молекулы клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления, ICM представляет собой CD3, предпочтительно, CD3 человека.

В некоторых вариантах осуществления, Ab2 связывается с опухолеассоциированным антигеном (ТАА), предпочтительно, с опухолеассоциированным антигеном человека (ТАА человека). Например, ТАА может быть DLL3.

В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее H1 и L1, и второе антигенсвязывающее плечо (Ab2), содержащее H2 и L2, где:

(a) H1 и H2 каждая содержит CH1 область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека и

(b) каждая из L1 и L2 содержит CL область легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека;

где каждый H1L1 и H2L2 содержит пару зарядов, выбранную из группы, состоящей из следующих аминокислотных замен:

(1) G166D/E в CH1 H1 и S114K/R в CL L1, соответственно, и G166K/R в CH1 H2 и S114D/E в CL L2, соответственно;

(2) T187D/E в CH1 H1 и D/N170K/R в CL L1, соответственно, T187K/R в CH1 H2 и D/N170D/E в CL L2, соответственно;

(3) S131D/E в CH1 H1 и P119K/R в CL L1, соответственно, S131K/R в CH1 H2 и P119D/E в CL L2, соответственно;

(4) A129D/E в CH1 H1 и S121K/R в CL L1, соответственно, A129K/R в CH1 H2 и S121D/E в CL L2, соответственно;

(5) K/R133D/E в CH1 H1 и K207K/R в CL L1, соответственно, K/R133K/R в CH1 H2 и K207D/E в CL L2, соответственно;

(6) K/R133D/E в CH1 H1 и I/L117K/R в CL L1, соответственно, K/R133K/R в CH1 H2 и I/L117D/E в CL L2, соответственно;

(7) K/R133D/E в CH1 H1 и F/V209K/R в CL L1, соответственно, K/R133K/R в CH1 H2 и F/V209D/E в CL L2, соответственно;

(8) G166D/E в CH1 H2 и S114K/R в CL L2, соответственно, и G166K/R в CH1 H1 и S114D/E в CL L1, соответственно;

(9) T187D/E в CH1 H2 и D/N170K/R в CL L2, соответственно, T187K/R в CH1 H1 и D/N170D/E в CL L1, соответственно;

(10) S131D/E в CH1 H2 и P119K/R в CL L2, соответственно, S131K/R в CH1 H1 и P119D/E в CL L1, соответственно;

(11) A129D/E в CH1 H2 и S121K/R в CL L2, соответственно, A129K/R в CH1 H1 и S121D/E в CL L1, соответственно;

(12) K/R133D/E в CH1 H2 и K207K/R в CL L2, соответственно, K/R133K/R в CH1 H1 и K207D/E в CL L1, соответственно;

(13) K/R133D/E в CH1 H2 и I/L117K/R в CL L2, соответственно, K/R133K/R в CH1 H1 и I/L117D/E в CL L1, соответственно; или

(14) K/R133D/E в CH1 H2 и F/V209K/R в CL L2, соответственно, K/R133K/R в CH1 H1 и F/V209D/E в CL L1, соответственно.

связывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывание альбумина с FA на плече Ab1 не влияет на связывание плеча Ab2 с его антигеном, или связывание альбумина с FA на плече Ab2 не влияет на связывание плеча Ab1 с его антигеном. В некоторых вариантах осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с FA, обладает пониженной способностью активировать Т-клетки при связывании с альбумином, по сравнению с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, конъюгированным с FA, не связывающейся с альбумином.

Также предложены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Также предложены векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Также предложены клетки-хозяева, содержащие векторы по изобретению.

Также предложены фармацевтические композиции, содержащие выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции содержат выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с FA, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции содержат выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с FA, где FA связан с альбумином, и фармацевтически приемлемый носитель.

Также предложены способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, где способы включают введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению. Рак можно, например, выбрать из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

Также предложены способы продуцирования выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. Способы включают культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающих продуцирование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и, необязательно, выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Также предложены способы продуцирования выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с FA по изобретению. Способы включают конъюгацию FA с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом на замененном аминокислотном остатке. Также предложены способы продуцирования выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с FA и связанного с альбумином, где способы включают контакт выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с FA, с альбумином.

Также предложены способы получения фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Способы включают объединение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Также предложены способы, включающие контакт альбумина с конъюгатом, содержащим FA, ковалентно связанным, необязательно через линкер, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в конъюгате способны специфически связываться с антигеном-мишенью, FA в конъюгате способны связываться с альбумином, и связывание альбумина с FA приводит к частичному или полному блокированию связывания между антигеном-мишенью и антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит один или несколько замененных аминокислотных остатков в VH, VL или на расстоянии двадцати (20) аминокислот, предпочтительно, на расстоянии пяти (5) аминокислот, от VH или VL, и один или несколько замененных аминокислотных остатков ковалентно связаны, необязательно через линкер, с FA. В некоторых вариантах осуществления, стадия контакта включает введение фармацевтической композиции, содержащей конъюгат, субъекту, нуждающемуся в лечении опухоли, где опухоль содержит антиген-мишень. В некоторых вариантах осуществления, альбумин имеет более высокий метаболизм в микроокружении опухоли по сравнению с циркулирующей кровью, и/или альбумин присутствует в микроокружении опухоли на уровне ниже, чем уровень альбумина в циркулирующей крови субъекта.

Краткое описание чертежей

Приведенная выше сущность изобретения, а также последующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки будут лучше понятны при чтении вместе с прило-

женными чертежами. Однако следует понимать, что применение не ограничивается точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На фиг. 1A-1E схематически показаны структуры моноклонального антитела (mAb) (фиг. 1A) и биспецифического антитела (bsAb) (фиг. 1B и 1C) с молекулой жирной кислоты (FA), конъюгированной с областью VH, иллюстрация механизма действия биспецифического антитела, конъюгированного с FA, *in vivo* (фиг. 1D) и схема стратегии идентификации антител, конъюгированных с FA (фиг. 1E). Фиг. 1A-1C схематически представлены только в иллюстративных целях, поскольку сайт конъюгации может находиться в других подходящих сайтах в Fab области, включая VL область и CL область. Кроме того, оба плеча биспецифического антитела могут быть конъюгированы на фиг. 1B-1C. FA потенциально может модулировать антигенсвязывающую активность конъюгированного плеча в различной степени. На фиг. 1A показано, что молекула FA конъюгирована с областью VH обоих плеч; на фиг. 1B показано, что молекула FA конъюгирована с областью VH одного из плеч биспецифического антитела; на фиг. 1C показано, что молекула FA конъюгирована с областью CH1 одного из плеч биспецифического антитела. Ожидается, что антигенсвязывающая активность конъюгированного плеча будет модулироваться альбумином, поскольку альбумин, связанный с конъюгированным FA, может полностью или частично блокировать связывание целевого антигена конъюгированным плечом. Фиг. 1D иллюстрирует способ действия биспецифического антитела, конъюгированного с FA, для применения для вовлечения Т-клеток в раковые клетки-мишени *in vivo*. Когда оба плеча биспецифического антитела конъюгированы с FA, можно достичь той же цели; однако модуляция альбумином в этом случае может быть увеличена по сравнению с биспецифическими антителами с конъюгацией только одного плеча. Кроме того, на фиг. 1D показано, как уровень альбумина регулирует антигенсвязывающую активность биспецифического антитела, конъюгированного с FA. На фиг. 1E показаны конкретные стадии идентификации mAb или bsAb, конъюгированных с FA. Альбуминзависимая активность относится к тому факту, что активность конъюгированного антитела модулируется альбумином (т.е. высокие концентрации альбумина снижают или полностью блокируют антигенсвязывающую активность).

На фиг. 2A-2D показаны аминокислотные последовательности типовых антител. На фиг. 2A показана аминокислотная последовательность области VH анти-CD3-антитела (SEQ ID NO:1). На фиг. 2B показана аминокислотная последовательность области VL анти-CD3-антитела (SEQ ID NO:2). На фиг. 2C показаны аминокислотные последовательности областей CH1 IgG1 (SEQ ID NO:9), IgG2 (SEQ ID NO:10), IgG3 (SEQ ID NO:11) и IgG4 (SEQ ID NO:12) человека. На фиг. 2D показаны аминокислотные последовательности CL областей легких цепей каппа (SEQ ID NO:13) и лямбда (SEQ ID NO:14) человека. Области CDR, определенные комбинацией методов IMGT и Kabat, выделены серым цветом. * представляет сайты известных аллельных вариаций.

На фиг. 3A-3G показаны примеры выбранных аминокислотных остатков для замены и конъюгации с FA в моноклональном анти-CD3 антителе (mAb). На фиг. 3A показано трехмерное моделирование Fab области (содержащей VH, CH1, VL и CL) в анти-CD3 mAb для определения потенциальных сайтов для цистеинового ноклина для конъюгации FA. В качестве примеров показаны четыре сайта в 3-D структуре (LC_S26, LC_S31, HC_K64 и HC_T120) (LC: легкая цепь; HC: тяжелая цепь). Дополнительные сайты показаны в табл. 3. На фиг. 3B-3G показаны графики, демонстрирующие связывание анти-CD3 mAb с нокинами цистеина с CD3 на клетках Jurkat. MFI: средняя интенсивность флуоресценции. Анти-CD3 mAb, анти-CD3 mAb дикого типа.

На фиг. 4A-4C показаны структуры молекул FA для конъюгации с анти-CD3 mAb и профили масс-спектрометрии (МС) конъюгированных с FA анти-CD3 mAb. На фиг. 4A показаны структуры молекул FA для конъюгации. Все молекулы FA конъюгированы через линкер PEG. На фиг. 4B показаны МС профили mAb (LC_S26C, HC_K64C и HC_T120C), конъюгированных с C18 FA. На фиг. 4C показаны МС профили mAb HC_K64C, конъюгированных с C6, C10 и C14 FA, соответственно. Ожид., ожидаемая масса после деконволюции; набл., наблюдаемая масса после деконволюции. LC_S26C представляет собой анти-CD3 mAb, в котором серин в положении S26 легкой цепи заменен цистеином; все другие mAb с добавленным цистеином следуют тому же правилу именования.

На фиг. 5A-5C показано влияние альбумина на связывание C18-FA-конъюгированных анти-CD3 mAb с CD3 на клетках Jurkat. Анализ проводят в отсутствие или в присутствии 50 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA). На фиг. 5A, конъюгированный LC_S26C; на фиг. 5B, конъюгированный HC_K64C; на фиг. 5C, конъюгированный HC_T120C.

На фиг. 6A-6C показано влияние различных концентраций альбумина на активацию Т-клеток с помощью C18-FA-конъюгированных анти-CD3 mAb. На фиг. 6A, конъюгированный LC_S26C; на фиг. 6B, конъюгированный HC_K64C; на фиг. 6C, конъюгированный HC_T120C. Среда для анализа содержит 1% FBS (фетальной бычьей сыворотки); отмеченная концентрация BSA представляет собой BSA, добавленную в среду для анализа.

На фиг. 7A-7C показано влияние различных концентраций альбумина на активацию Т-клеток C6, C10 и C14 FA-конъюгированными анти-CD3 mAb, соответственно. На фиг. 7A, C6 FA-конъюгированный HC_K64C; на фиг. 7B, C10 FA-конъюгированный HC_K64C; на фиг. 7C, C14 FA-конъюгированный HC_K64C. Среда для анализа содержит 1% FBS; отмеченная концентрация BSA представляет собой BSA, добавленную в среду для анализа; Контроль, без добавления BSA.

На фиг. 8А-8С показана чистота очищенного анти-DLL3/анти-CD3 биспецифического антитела bsAb HC_K64C, где остаток K64 на HC плече анти-CD3 заменен цистеином. На фиг. 8А показан результат анализа ХГВ ВЭЖХ очищенного bsAb HC_K64C с некоторыми стандартами примесей; на фиг. 8В показан результат анализа СКО ВЭЖХ очищенного bsAb HC_K64C с некоторыми стандартами примесей; на фиг. 8С показывает результат анализа ГЭХ ВЭЖХ очищенного bsAb HC_K64C. Анти-CD3 выпуклый гомодимер/половина мол., стандарт примеси, который представляет собой белок А, очищенный из среды клеток, трансфицированных анти-CD3 HC и анти-CD3 LC; анти-DLL3 впалый гомодимер/половина мол., стандарт примеси, который представляет собой белок А, очищенный из среды клеток, трансфицированных анти-DLL3 HC и анти-DLL3 LC; 2х ошибочное спаривание анти-CD3 LC, стандарт примеси, которым является белок А, очищенный из среды клеток, трансфицированных анти-CD3 HC, анти-CD3 LC и анти-DLL3 HC; 2х ошибочное спаривание анти-DLL3 LC, стандарт примеси, которым является белок А, очищенный из среды клеток, трансфицированных анти-CD3 HC, анти-DLL3 HC и анти-DLL3 LC. Половина мол., половина молекулы IgG только с одним HC и одним LC.

На фиг. 9А-9С показана чистота очищенного анти-DLL3/анти-CD3 биспецифического антитела bsAb HC_T120C, где остаток T120 на HC плеча анти-CD3 заменен цистеином. На фиг. 9А показан результат анализа ХГВ ВЭЖХ очищенного bsAb HC_T120C с некоторыми стандартами примесей; на фиг. 9В показан результат анализа ВЭЖХ СКО очищенного bsAb HC_T120C с некоторыми стандартами примесей; на фиг. 9С показан результат анализа ГЭХ ВЭЖХ очищенного bsAb HC_T120C. Анти-CD3 выпуклый гомодимер/половина мол., стандарт примеси, который представляет собой белок А, очищенный из среды клеток, трансфицированных анти-CD3 HC и анти-CD3 LC; анти-DLL3 впалый гомодимер/половина мол., стандарт примеси, который представляет собой белок А, очищенный из среды клеток, трансфицированных анти-DLL3 HC и анти-DLL3 LC; 2х ошибочное спаривание анти-CD3 LC, стандарт примеси, которым является белок А, очищенный из среды клеток, трансфицированных анти-CD3 HC, анти-CD3 LC и анти-DLL3 HC; 2х ошибочное спаривание анти-DLL3 LC, стандарт примеси, которым является белок А, очищенный из среды клеток, трансфицированных анти-CD3 HC, анти-DLL3 HC и анти-DLL3 LC. Половина мол., половина молекулы IgG только с одним HC и одним LC.

На фиг. 10А-10В показана чистота очищенных анти-DLL3/анти-CD3 биспецифических антител, конъюгированных с молекулами жирных кислот. На фиг. 10А показан результат анализа ХГВ ВЭЖХ очищенных анти-DLL3/анти-CD3 биспецифических антител, конъюгированных с молекулами жирных кислот; на фиг. 10В показан результат анализов ГЭХ ВЭЖХ очищенных анти-DLL3/анти-CD3 биспецифических антител, конъюгированных с молекулами жирных кислот. bsAb HC_T120C_C18 относится к анти-DLL3/анти-CD3 биспецифическим антителам bsAb HC_T120C, конъюгированным с C18 FA; другие конъюгированные биспецифические антитела следуют тому же правилу именования.

На фиг. 11 показан результат анализа перекрестного связывания клеток SHP-77 и Jurkat неконъюгированными и конъюгированными анти-DLL3/анти-CD3 биспецифическими антителами в присутствии или в отсутствие блокирующих антител. Блокирующее анти-DLL3 mAb представляет собой mAb версии плеча анти-DLL3; блокирующее анти-CD3 mAb представляет собой mAb версии плеча анти-CD3 (без нокинированного цистеина). bsAb WT, анти-DLL3/анти-CD3 биспецифическое антитело дикого типа (без нокинированного цистеина); SHP-77+контроль Jurkat, анализ проводят с клетками без добавления антител.

На фиг. 12А, 12В показаны результаты активации комплекса Т-клетка-рецептор-CD3 (TCR/CD3) на клетках Jurkat в присутствии клеток SHP-77 (экспрессирующих DLL3), опосредованного неконъюгированными и конъюгированными анти-DLL3/анти-CD3 биспецифическими антителами. Блокирующие анти-DLL3 mAb используют для подавления активации, чтобы продемонстрировать, что активация клеток Jurkat требует одновременного связывания клеток SHP-77 биспецифическими антителами. Среда для анализа содержит 0,5% FBS.

На фиг. 13А-13В показаны результаты влияния BSA на активацию комплекса TCR/CD3 на клетках Jurkat в присутствии клеток SHP-77 (экспрессирующих DLL3; также известных как клетка-мишень), опосредованных неконъюгированными и конъюгированными анти-DLL3/анти-CD3 биспецифическими антителами. Среда для анализа содержит 0,5% FBS; отмеченная концентрация BSA представляет собой BSA, добавленную в среду для анализа.

На фиг. 14 показан результат анализа ELISA, использованного для оценки влияния BSA на антиген-связывающую активность плеча анти-DLL3 конъюгированных биспецифических антител. Анти-DLL3 F(ab')₂ используют в качестве контроля ингибирования связывания DLL3 плечом анти-DLL3 конъюгированных биспецифических антител.

Подробное описание изобретения

Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описываются в известном уровне техники и по всему описанию; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей или подобных, которые были включены в настоящее описание, проводится с целью обеспечения контекста изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все эти вопросы составляют часть известного уровня техники в отношении любых описанных или заявленных изобретений.

Если не указано иное, все используемые здесь технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. В остальном, некоторые используемые здесь термины имеют значения, указанные в описании.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как измененные во всех случаях термином "примерно". Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом, диапазон концентраций от 1% до 10% (мас./об.) включает от 0,9% (мас./об.) до 11% (мас./об.). Используемый здесь термин "числовой диапазон" явно включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в таких диапазонах и доли значений, если в контексте явно не указано иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере" предшествующий ряду элементов следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду. Специалист в данной области техники сможет распознать или будет способен установить, применяя не более чем обычные эксперименты, множество эквивалентов к конкретным вариантам осуществления по изобретению, описанным в настоящем документе. Такие эквиваленты предназначены для включения в настоящее изобретение.

Используемые здесь термины "содержит", "содержащий", "включает", "включающий", "имеет", "имеющий", "содержит" или "содержащий" или любой другой их вариант следует понимать как подразумевающий включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел, и предполагается, что они являются не исключительными или открытыми. Например, композиция, смесь, процесс, метод, изделие или аппарат, которые содержат список элементов, не обязательно ограничены только этими элементами, но могут включать другие элементы, не указанные явно или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или аппарату. Кроме того, если прямо не указано иное, "или" относится к включающему или, а не к исключающему или. Например, условие А или В удовлетворяется любым из следующих условий: А истинно (или присутствует) и В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует) и В истинно (или присутствует), и оба А и В истинны (или присутствуют).

Используемый здесь соединительный термин "и/или" между несколькими указанными элементами понимается как охватывающий как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, когда два элемента соединены "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к совместному применению первого и второго элементов. Подразумевается, что любой из этих вариантов подпадает под это значение и, следовательно, удовлетворяет требованию термина "и/или", используемого в настоящем документе. Одновременное применение более чем одного из вариантов также понимается как подпадающее под это значение и, следовательно, удовлетворяющее требованию термина "и/или".

Используемый в настоящем документе термин "состоит из" или варианты, такие как "состоит из" или "состоящий из", используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, но что никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не может быть добавлена к указанному способу, структуре или композиции.

Используемый в настоящем документе термин "состоит по существу из" или варианты, такие как "по существу состоит из" или "состоящий по существу из", используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, и необязательное включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

Используемый в настоящем документе термин "субъект" означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно, человека. Термин "млекопитающее", используемый в настоящем документе, охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но не ограничены ими, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т.д., более предпочтительно, человека.

Слова "правый", "левый", "нижний" и "верхний" обозначают направления на чертежах, на которые делается ссылка.

Также следует понимать, что термины "примерно", "приблизительно", "в целом", "по существу" и подобные им термины, используемые в настоящем документе применительно к размеру или характеристике компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанный размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительных вариаций от них, которые являются одинаковыми или подобными по функциональности, как это будет понятно специалистам в данной области техники. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовой параметр, должны включать варианты, которые, с использованием математических и промышленных принципов, принятых в данной области техники (например, округление, измерения или другие системные ошибки, производственные допуски и т.д.), не изменяют последнюю значащую цифру.

Используемые в настоящем документе термины "разные тяжелые цепи" или "разные легкие цепи",

используемые в описании и формуле изобретения, указывают на то, что тяжелые цепи или легкие цепи имеют последовательности, которые не идентичны друг другу.

Термины "идентичный" или доля "идентичности" в контексте двух или нескольких последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов (например, анти-DL3 антител, анти-CD3 антител, анти-CD3/анти-DL3 биспецифических антител, DLL3-полипептидов и полинуклеотидов, которые их кодируют, и CD3 полипептидов и полинуклеотидов, которые их кодируют), относятся к двум или нескольким последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенную долю одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, при измерении с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или при визуальном осмотре.

Для сравнения последовательностей, обычно одна последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравниваются тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, в компьютер вводятся тестируемая и эталонная последовательности, при необходимости назначаются координаты подпоследовательностей и назначаются параметры программы алгоритма последовательности. Алгоритм сравнения последовательностей затем вычисляет долю идентичности последовательности для тестируемой последовательности(ей) по отношению к эталонной последовательности, основываясь на назначенных параметрах программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно провести, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), с помощью алгоритма гомологического выравнивания Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), способом поиска подобия Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированных вариантов этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или путем визуального осмотра (см., в общем, *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, подходящих для определения доли идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает в себя сначала идентификацию пар последовательностей с высокой оценкой (HSP) путем определения коротких слов длины W в запрашиваемой последовательности, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при сопоставлении со словом той же длины в последовательности базы данных. T упоминается как порог оценки соседнего слова (Altschul et al., см. выше). Эти начальные совпадения соседних слов действуют как исходные данные для инициирования поиска, чтобы найти более длинные HSP, содержащие их. Затем совпадения слов расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько может быть увеличена совокупная оценка выравнивания.

Совокупные баллы рассчитываются с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров M (поощрительный балл за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за ошибочно спаренные остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей используется матрица оценок для расчета суммарной оценки. Расширение совпадений слов в каждом направлении останавливается, когда: суммарный показатель выравнивания падает на величину X от максимально достигнутого значения; суммарная оценка становится равной нулю или ниже из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательной оценкой; или достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину слова (W), равную 11, ожидание (E), равное 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей, программа BLASTP использует по умолчанию длину слова (W), равную 3, ожидание (E), равное 10, и матрицу оценок BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

В дополнение к вычислению доли идентичности последовательности, алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Одной из мер сходства, обеспечиваемой алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая указывает вероятность того, что совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями произойдет случайно. Например, нуклеиновая кислота считается подобной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее примерно 0,1, более предпочтительно, менее примерно 0,01 и наиболее предпочтительно, менее примерно 0,001.

Дополнительным признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот или полипептидов по существу идентичны, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой,

является иммунологически перекрестно реактивным с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно практически идентичен второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот по существу идентичны, является то, что две молекулы гибридизуются друг с другом в жестких условиях.

Используемый в настоящем документе термин "полинуклеотид", синонимично обозначаемый как "молекула нуклеиновой кислоты", "нуклеотиды" или "нуклеиновые кислоты", относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. "Полинуклеотиды" включают, без ограничения, одноцепочечную и двухцепочечную ДНК, ДНК, представляющую собой смесь одноцепочечных и двухцепочечных областей, одноцепочечную и двухцепочечную РНК и РНК, представляющую собой смесь одноцепочечных и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, что более типично, двухцепочечными, или смесью одноцепочечных и двухцепочечных областей. Кроме того, "полинуклеотид" относится к трехцепочечным областям, содержащим РНК или ДНК, или и РНК, и ДНК. Термин "полинуклеотид" также включает ДНК или РНК, содержащие одно или несколько модифицированных оснований, и ДНК или РНК с остовами, модифицированными для стабильности или по другим причинам. "Модифицированные" основания включают, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; таким образом, "полинуклеотид" охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, которые обычно встречаются в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. "Полинуклеотид" также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

Используемый в данном документе термин "вектор" представляет собой репликон, в который может быть функционально вставлен другой сегмент нуклеиновой кислоты, чтобы вызвать репликацию или экспрессию сегмента.

Используемый в настоящем документе термин "клетка-хозяин" относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению. "Клетка-хозяин" может представлять собой клетку любого типа, например, первичную клетку, клетку в культуре или клетку из клеточной линии. В одном варианте осуществления, "клетка-хозяин" представляет собой клетку, трансфицированную молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению. В другом варианте осуществления, "клетка-хозяин" представляет собой потомство или потенциальное потомство такой трансфицированной клетки. Потомство клетки может быть или не быть идентичным родительской клетке, например, из-за мутаций или воздействий окружающей среды, которые могут происходить в последующих поколениях, или из-за интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

Используемый в настоящем документе термин "экспрессия" относится к биосинтезу генного продукта. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или несколько полипептидов и, кроме того, охватывает все встречающиеся в природе посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Экспрессированное моноклональное или биспецифическое антитело может находиться в цитоплазме клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как среда для роста клеточной культуры, или может быть заякорено на клеточной мембране.

Используемые в настоящем документе термины "пептид", "полипептид" или "белок" могут относиться к молекуле, состоящей из аминокислот, и могут быть распознаны специалистами в данной области техники как белок. В настоящем документе используется обычный однобуквенный или трехбуквенный код аминокислотных остатков. Термины "пептид", "полипептид" и "белок" могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может быть прерван не аминокислотами. Эти термины также охватывают полимер аминокислоты, который был модифицирован естественным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацелированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такими как конъюгация. Также в определение включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислоты (включая, например, аминокислоты неприродного происхождения, и т.д.), а также другие модификации, известные в данной области техники.

Описанные в настоящем документе пептидные последовательности записываются в соответствии с обычным соглашением, согласно которому N-концевая область пептида находится слева, а C-концевая область находится справа. Хотя известны изомерные формы аминокислот, представлена L-форма аминокислоты, если не указано иное.

Как описано в настоящем документе, термин "CD3" относится к кластеру дифференциации 3, который представляет собой мульти-субъединичный белковый комплекс, функционирующий как корецептор для T-клеточного рецептора (TCR) (Dong et al., Nature 573(7775): 546-552 (2019)). Связывание TCR с пептидом-МНС (pMHC) на поверхности клеток-мишеней индуцирует кластеризацию комплекса TCR-

CD3 и активирует внутриклеточную передачу сигналов, опосредованную ζ цепью CD3 (Annu Rev Immunol. 27:591-619 (2009)). CD3 необходим для активации Т-клеток, и его рМНС-независимая активация терапевтическими средствами, такими как CAR-Т-клетки и активаторы Т-клеток на основе CD3, очень эффективна для мобилизации Т-клеток для уничтожения опухолевых клеток (Brown and Mackall, Nat Rev Immunol 19(2):73-74 (2019) and Clynes and Desjarlais, Annu Rev Med 70:437-450 (2019)). Типовая аминокислотная последовательность эpsilon субъединицы CD3 человека представлена в GenBank под номером доступа NP_000724.1.

Как описано в настоящем документе, термин "DLL3" относится к дельта-подобному каноническому лиганду Notch 3 (DLL3), также известному как дельта-подобный 3 или дельта-подобный белок 3, который необходим для сегментации сомитов на раннем этапе развития (Dunwoodie et al., Development 129:1795-806 (2002)). В отличие от лигандов DLL1, DLL4, JAG1 и JAG2 семейства Notch млекопитающих, которые все активируют передачу сигналов рецептора Notch в транс (Ntziachristos et al., Cancer Cell 25(3):318-34 (2014)), DLL3 преимущественно локализован в аппарате Гольджи и не может активировать передачу сигналов Notch (Charman et al., Hum Mol Genet 20(5):905-16 (2011) и Geffers et al., J Cell Biol 178(3):465-76 (2007)). Во время нормального развития, DLL3 ингибирует активацию как цис-, так и транс-действующего пути Notch путем взаимодействия с Notch и DLL1 (Charman et al., Hum Mol Genet 20(5):905-16(2011)). DLL3 обычно либо отсутствует, либо присутствует на очень низком уровне в нормальных тканях взрослого человека, за исключением мозга, но сверхэкспрессируется в образцах рака легкого, рака яичка, глиомы и меланомы (Uhlen et al., Science 357(6352): eaan2507 (2017)). Кроме того, DLL3 обнаруживается на поверхности опухолевых клеток мелкоклеточного рака легкого (SCLC) и крупноклеточной нейроэндокринной карциномы (LCNEC) (Saunders et al., Sci Transl Med 7(302):302ra136 (2015) и Sharma et al., Cancer Res 77(14):3931-41 (2017)), что делает его потенциальной мишенью моноклональных антител для противораковой терапии. Следовательно, моноклональное анти-DLL3 антитело можно использовать для специфического таргетирования опухолевых клеток, экспрессирующих DLL3, и использовать в качестве потенциального противоракового терапевтического средства. Термин "DLL3 человека" относится к DLL3, происходящий от человека. Типовая аминокислотная последовательность DLL3 человека представлена в GenBank под номером доступа NP_058637.1.

"Опухлеассоциированный антиген (ТАА)", как описано в настоящем документе, относится к любому пептиду и/или антигену клеточной поверхности или комбинации пептида и/или антигена клеточной поверхности и его посттрансляционной модифицирующей части (такой как гликозилирование), которые присутствуют в опухолях на более высоком уровне, чем в нормальных тканях. Некоторые опухлеассоциированные антигены, присутствующие специфически в опухолях, также известны как опухолеспецифические антигены (TSA). Примерами опухлеассоциированных антигенов являются вирусные белки, кодируемые онкогенными вирусами; мутировавшие онкопротеины или супрессоры опухолей; нормальные белки, сверхэкспрессированные на опухолевых клетках и/или в них; посттрансляционные модификации белков клеточной поверхности; онкофетальные белки, экспрессия которых обычно ограничена на стадиях развития, но не во взрослых тканях; и белки, специфичные для клеточного типа, экспрессия которых ограничена несущими тканями.

"Жирная кислота", как описано в настоящем документе, относится к химической молекуле, состоящей из углеводородных цепей, оканчивающихся группами карбоновой кислоты, обычно с 6-22 атомами углерода. Для настоящего изобретения, различные производные жирных кислот также считаются жирными кислотами из-за их способности связываться с альбумином. Жирные кислоты и их производные являются основными компонентами липидов и придают им гидрофобные свойства. Длина и степень насыщения углеводородной цепи варьируются в зависимости от жирных кислот, что определяет связанные с ними физические свойства. Типы жирных кислот включают ненасыщенные жирные кислоты (полиненасыщенные и мононенасыщенные) и насыщенные жирные кислоты; насыщенные жирные кислоты насыщены водородом и в основном представляют собой прямые углеводородные цепи с четным числом атомов углерода.

"Модулятор иммунных клеток (ИМ)", как описано в настоящем документе, относится к любой молекуле клеточной поверхности, такой как белок, который экспрессируется на поверхности иммунных клеток и регулирует функцию иммунных клеток. ИМ включают стимулирующие молекулы и ингибирующие молекулы. Стимулирующий ИМ может опосредовать активацию иммунных клеток, когда специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент с определенными характеристиками специфически связывается со стимулирующим ИМ. Ингибирующий ИМ подавляет активность иммунной клетки при связывании с лигандом/взаимодействующим партнером, который может быть заблокирован специфическим антителом или антигенсвязывающим фрагментом с определенными характеристиками, приводящими к активации иммунных клеток. Эти иммунные клетки могут быть Т-клетками, НК-клетками, макрофагами или другими типами клеток иммунной системы. Примеры ИМ включают, но не ограничены ими, CD3, CD27, CD28, CD40, CD122, OX40, CD16, 4-1BB, GITR, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT, VISTA, SIGLEC7, NKG2D, SIGLEC9, KIR, CD91, BTLA, NKp46, B7-H3, SIPR α и другие иммунорегуляторные молекулы клеточной поверхности.

Используемый в настоящем документе термин "полный блок" или "полная блокада" относится к полному ингибированию связывания антигена-мишени (например, ICM, такого как CD3) с антигенсвязывающим доменом-мишенью (например, моноклональным или биспецифическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом). Полное ингибирование связывания антигена-мишени означает отсутствие связывания (например, 0% связывания) антигена-мишени с антигенсвязывающим доменом-мишенью.

Используемый в настоящем документе термин "частичный блок" или "частичная блокада" относится к неполному ингибированию связывания антигена-мишени (например, ICM, такого как CD3) с антигенсвязывающим доменом-мишенью (например, моноклональным или биспецифическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом). Неполное ингибирование связывания антигена-мишени означает, что имеет место, по меньшей мере, некоторое связывание (например, связывание от 1% до 99%) антигена-мишени с антигенсвязывающим доменом-мишенью.

Используемый в настоящем документе термин "специфическое связывание" относится к значительному связыванию антигена-мишени с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по сравнению с контрольным антигеном, и/или значительному связыванию антигена-мишени с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по сравнению с контрольным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, где контрольный антиген отличается от антигена-мишени сравнением последовательности и/или структуры, и контрольное антитело или антигенсвязывающий фрагмент значительно и селективно связывается только с соответствующим ему антигеном, который отличается от антигена-мишени сравнением последовательности и/или структуры.

Антитела.

Изобретение в целом относится к моноклональным антителам (mAb) (например, mAb к ICM, таким как mAb к CD3) или биспецифическим антителам (bsAb) (например, bsAb к CD3/анти-DLL3), содержащим молекулу жирной кислоты (FA), конъюгированную с или рядом с антигенсвязывающим доменом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL) (например, в VH, VL или на расстоянии двадцати (20) аминокислот, предпочтительно, на расстоянии в пять (5) аминокислот от либо VH, либо VL). Сайт конъюгации представляет собой реакционноспособный остаток в или рядом с антигенсвязывающим доменом и может быть нокинирован цистеином или другой реакционноспособной аминокислотой. Расположение сайта конъюгации идентифицируют таким образом, чтобы нокин цистеина (или другой реакционноспособной аминокислоты) или конъюгированная FA не устраняла активность связывания антигена-мишени (например, ICM, такого как CD3) антигенсвязывающего домена. Конъюгированная FA может связываться с молекулой альбумина, и связанная молекула альбумина может занимать значительное пространство между антигенсвязывающим доменом и антигеном-мишенью (например, ICM, таким как CD3). Связанная молекула альбумина может пространственное препятствовать связыванию антигена-мишени с антигенсвязывающим доменом, что приводит к уменьшению или полному блокированию связывания антигена-мишени с антигенсвязывающим доменом. Конъюгированное с FA mAb или конъюгированное с FA плечо bsAb может быть направлено против модулятора иммунных клеток (ICM), который при связывании с антителом может привести к активации иммунных клеток. Примеры ICM включают, но не ограничены ими, CD3, CD27, CD28, CD40, CD122, OX40, CD16, 4-1BB, GITR, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT, VISTA, SIGLEC7, NKG2D, SIGLEC9, KIR, CD91, BTLA, NKp46, B7-H3, SIPR α и другие иммунорегуляторные молекулы клеточной поверхности. Таким образом, активность конъюгированных mAb или bsAb по активации иммунных клеток может регулироваться альбумином, связанным с конъюгированными FA. Степень регуляции зависит от концентрации альбумина вокруг конъюгированных mAb или bsAb, длины молекулы FA и конкретного местоположения сайта конъюгации. Изобретение также относится к мультиспецифическим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, где мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одно или несколько антигенсвязывающих плеч, содержащих замененный аминокислотный остаток, который конъюгирован с FA.

Конъюгированные FA на mAb или bsAb или мультиспецифическом антителе могут связываться с циркулирующим в крови альбумином, что может служить для снижения или блокирования связывания конъюгированных mAb или bsAb с антигеном-мишенью на Т-клетках (например, ICM, таких как CD3), что приводит к частичному или полному ингибированию активации Т-клеток. В микроокружении опухоли, где скорость оборота альбумина выше, чем в циркулирующей крови, и ожидается, что локальный уровень альбумина будет ниже, чем в циркулирующей крови, конъюгированные антитела имеют меньше связанного с ними альбумина или совсем не связаны с ними, что может привести к увеличению связывания антигена-мишени (например, CD3) и активации Т-клеток. Дополнительно или альтернативно, более высокая скорость оборота альбумина в микроокружении опухоли может снижать уровень связанных с альбумином mAb или bsAb или мультиспецифических антител и обнажать антигенсвязывающий домен, что приводит к увеличению связывания антигена-мишени (например, CD3) и активации Т-клеток. Конъюгированные антитела могут иметь преимущества в отношении безопасности *in vivo*, и могут применяться в терапевтических целях. Конъюгированные bsAb также можно использовать в качестве агентов, привлекающих Т-клетки, или агентов, привлекающих другие иммунные клетки, где одно плечо содержит

антигенсвязывающий домен против опухолеассоциированного антигена (ТАА), и другое плечо содержит конъюгированную антигенсвязывающую область анти-ICM (например, анти-CD3 антигенсвязывающую область).

Используемый в настоящем документе термин "антитело" используется в широком смысле и включает иммуноглобулины или молекулы антител, включая человеческие, гуманизированные, составные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. Как правило, антитела представляют собой белки или пептидные цепи, обладающие специфичностью связывания с определенным антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины могут быть отнесены к пяти основным классам (т.е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоформы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела по изобретению могут относиться к любому из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно, антитела по изобретению представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител позвоночных видов могут быть отнесены к одному из двух четко различающихся типов, а именно, каппа и ламбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Соответственно, антитела по изобретению могут содержать константный домен легкой цепи каппа или ламбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитела по изобретению включают константные области тяжелой и/или легкой цепи антител крысы или человека. В дополнение к константным доменам тяжелой и легкой цепи, антитела содержат антигенсвязывающую область, состоящую из варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т.е. определяющие комплементарность области 1-3; CDR1, CDR2 и CDR3). Домены варибельной области легкой цепи альтернативно обозначаются как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и домены варибельной области тяжелой цепи альтернативно обозначаются как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

Несколько систем используют для нумерации аминокислотных остатков в антителах. Способ нумерации Kabat представляет собой схему, основанную на варибельных участках антител (Elvin A. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 5th ed. (1991)). Система нумерации ЕС широко используется для константных доменов (включая части CH1, шарнир и Fc) (Elvin A. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 5th ed. (1991)).

Используемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с DLL3, по существу не содержит антител, которые не связываются с DLL3; выделенное антитело, которое специфически связывается с CD3, по существу не содержит антител, которые не связываются с CD3; биспецифическое антитело, которое специфически связывается с CD3 и DLL3, по существу не содержит антител, которые не связываются с CD3 и DLL3). Кроме того, выделенное антитело по существу не содержит другой клеточный материал и/или химические вещества.

Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены способом гибридомы, технологией фагового дисплея, технологией клонирования одного гена лимфоцита или способами рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела могут быть получены гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного животного, отличного от человека, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющего геном, содержащий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека.

Используемый в настоящем документе термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv фрагмент, стабилизированный дисульфидом Fv фрагмент (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидом диатело (ds диатело), молекула одноцепочечного антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), димер scFv (двухвалентное диатело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или несколько CDR, однодоменное антитело верблюдовых, нанотело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не имеет полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент способен связываться с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельную область легкой цепи, константную область легкой цепи и Fd сегмент тяжелой цепи. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

Используемый в настоящем документе термин "одноцепочечное антитело" относится к обычному одноцепочечному антителу в данной области техники, которое содержит варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом, состоящим примерно из 15-20 аминокислот. Используемый в настоящем документе термин "однодоменное антитело" относится к

обычному однодоменному антителу в данной области техники, которое содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

Используемый в настоящем документе термин "антитело человека" относится к антителу, продуцируемому человеком, или к антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеком, полученному с использованием любого метода, известного в данной области техники. Это определение антитела человека включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие, по меньшей мере, один полипептид тяжелой и/или легкой цепи человека.

Используемый в настоящем документе термин "гуманизованное антитело" относится к антителу нечеловеческого происхождения, которое модифицировано для увеличения гомологии последовательности с последовательностью антитела человека, так что антигенсвязывающие свойства антитела сохраняются, но его антигенность в теле человека уменьшается.

Используемый в настоящем документе термин "химерное антитело" относится к антителу, в котором аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина происходит от двух или нескольких видов. Переменная область как легкой, так и тяжелой цепей часто соответствует переменной области антитела, полученного из одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т.д.), обладающего желаемой специфичностью, аффинностью и способностью, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела, полученного от другого вида млекопитающих (например, человека), чтобы избежать иммунного ответа у этого вида.

Используемый в настоящем документе термин "мультиспецифическое антитело" относится к антителу, которое содержит множество последовательностей переменных доменов иммуноглобулина, где первая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и вторая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы не перекрываются или по существу не перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, например, на разных белках (или на разных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый переменный домен иммуноглобулина. В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, молекулу триспецифического антитела или молекулу тетраспецифического антитела.

Используемый в настоящем документе термин "биспецифическое антитело" относится к мультиспецифичному антителу, которое связывает не более двух эпитопов или двух антигенов. Биспецифическое антитело характеризуется последовательностью первого переменного домена иммуноглобулина, обладающей специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и последовательностью второго переменного домена иммуноглобулина, обладающей специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, например, на разных белках (или на разных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит половину антитела или его фрагмента, обладающего специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и половину антитела или его фрагмента, обладающего специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания в отношении второго эпитопа.

Используемый в настоящем документе термин "CD3" относится к кластеру дифференциации 3. Типовая аминокислотная последовательность эпсилон субъединицы CD3 человека представлена в GenBank под номером доступа NP_000724.1. Термин "4-1BB" относится к члену 9 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF9), также известному как CD137 и ILA (индуцируемому активацией лимфоцитов). Типовая аминокислотная последовательность 4-1BB человека представлена в GenBank под номером доступа NP_001552.2. Термин "OX40" относится к члену 4 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF4), также известному как CD134. Типовая аминокислотная последовательность

OX40 человека представлена в GenBank под номером доступа NP_003318.1. Термин "CD28" относится к кластеру дифференциации 28. Примеры аминокислотных последовательностей вариантов CD28 человека представлены в GenBank с номерами доступа NP_001230006.1, NP_001230007.1, NP_006130.1, XP_011510496.1 и XP_011510499.1. Термин "PD-1" относится к запрограммированной гибели клеток 1. Типовая аминокислотная последовательность PD-1 человека представлена в GenBank под номером доступа NP_005009.2. Термин "GITR" относится к индуцируемому глюкокортикоидами родственному TNFR белку (GITR), также известному как член 18 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF18) или индуцируемый активацией рецептор семейства TNFR (AITR). Типовые аминокислотные последовательности вариантов GITR человека представлены в GenBank с номерами доступа NP_004186.1, NP_683699.1 и NP_683700.1. Термин "VISTA" относится к Ig-супрессору V-домена активации Т-клеток, также известному как иммунорегуляторный рецептор V-набора (VSIR). Типовая аминокислотная последовательность VISTA человека представлена в GenBank под номером доступа NP_071436.1.

Используемый в настоящем документе термин "антитело, которое специфически связывается с CD3 и/или DLL3" относится к антителу, которое связывается с CD3 и/или DLL3, предпочтительно с CD3 человека и/или DLL3 человека, с $KD 1 \times 10^{-7}$ М или меньше, предпочтительно, 1×10^{-8} М или меньше, более предпочтительно, 5×10^{-9} М или меньше, 1×10^{-9} М или меньше, 5×10^{-10} М или меньше или 1×10^{-10} М или меньше. Термин "KD" относится к константе диссоциации, которую получают из отношения Kd к Ka (т.е. Kd/Ka) и выражают в виде молярной концентрации (М). Значения KD для антител могут быть определены с использованием способов, известных в данной области техники, с учетом настоящего изобретения. Например, KD антитела можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с помощью биосенсорной системы, например, системы Biacore®, или с помощью технологии биослойной интерферометрии, такой как система Octet RED96.

Чем меньше значение KD антитела, тем выше аффинность, с которой антитело связывается с антигеном-мишенью.

Согласно одному конкретному аспекту, изобретение предлагает выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) переменную область тяжелой цепи (VH); и переменную область легкой цепи (VL); где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном-мишенью, предпочтительно антигеном-мишенью человека; где аминокислотный остаток в VH, VL или на расстоянии двадцати (20) аминокислот, предпочтительно, на расстоянии пяти (5) аминокислот, от VH или VL заменен аминокислотным остатком, который конъюгирован с жирной кислотой (FA); и где при конъюгации с FA на замененном аминокислотном остатке, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент все еще связывается с антигеном-мишенью; и где антитело, конъюгированное с FA, или его антигенсвязывающий фрагмент снижают или устраняют специфическое связывание с антигеном-мишенью в присутствии физиологических уровней альбумина (например, от 35 до 50 мг/мл). Замененный аминокислотный остаток, например, может представлять собой цистеиновый остаток или лизиновый остаток.

Используемая в настоящем документе фраза "на расстоянии двадцати (20) аминокислот от VH или VL" относится к остатку в области CH1 или CL, который находится на расстоянии менее 20 аминокислот от переменной области тяжелой или легкой цепи. Фраза "на расстоянии пяти (5) аминокислот от VH или VL" относится к остатку в области CH1 или CL, который находится на расстоянии менее 5 аминокислот от переменной области тяжелой или легкой цепи.

Используемая в настоящем документе фраза "все еще связывается с антигеном-мишенью" указывает на то, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент при конъюгации с жирной кислотой (FA) все еще способны связывать антиген-мишень. Уровень связывания антигена-мишени с антителом, конъюгированным с FA, или его антигенсвязывающим фрагментом может, например, составлять от примерно 10% до примерно 100% от уровня связывания антигена-мишени с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим аминокислотную замену для конъюгации по изобретению в отсутствие конъюгированной FA. В некоторых вариантах осуществления, уровень связывания антигена-мишени с конъюгированным с FA антителом или его антигенсвязывающим фрагментом составляет примерно 10%, примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90% или примерно 100% от уровня связывания антигена-мишени с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим аминокислотную замену для конъюгации по изобретению в отсутствие конъюгированной FA. Специалист в данной области техники сможет определить уровень связывания антитела, конъюгированного с FA, или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном-мишенью, используя способы, известные в данной области техники. Уровень связывания можно сравнить с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим аминокислотную замену для конъюгации по изобретению, которая не конъюгирована с жирной кислотой. Уровень связывания антигена-мишени с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим аминокислотную замену для конъюгации по изобретению, которая не конъюгирована с жирной кислотой, составляет, по меньшей мере 50% от уровня антитела или его антигенсвязывающего фрагмента дикого типа.

Согласно конкретному аспекту, замененная аминокислота находится в аминокислотном остатке, соответствующем остатку 25, 27, 62, 64, 73, 76, 101, 112 или 113 SEQ ID NO:1, или аминокислотном остатке, соответствующем остатку 26, 27, 52, 53, 56 или 67 SEQ ID NO:2, предпочтительно, замена выбрана из замены, соответствующей S25C, Y27C, K62C, K64C, K73C, S76C, D101C, S112C или S113C SEQ ID NO:1 или замены, соответствующей S26C, S27C, S52C, K53C, S56C или S67C SEQ ID NO:2, где остатки пронумерованы по Kabat. В некоторых вариантах осуществления, замененная аминокислота находится на остатке 64, соответствующем SEQ ID NO:1, или на остатке 26, соответствующем SEQ ID NO:2, предпочтительно, замена выбрана из замены K64C, соответствующей SEQ ID NO:1, или замены S26C, соответствующей SEQ ID NO:2, где остатки пронумерованы по Kabat.

Как используется в настоящем документе, когда речь идет о замененной аминокислоте, соответствующей номеру аминокислотного остатка в SEQ ID NO, SEQ ID NO является ссылкой для определения замененного аминокислотного остатка в представляющей интерес последовательности. Специалист в данной области техники должен сопоставить представляющую интерес последовательность с эталонной SEQ ID NO, чтобы определить положение аминокислотного остатка, подлежащего замене. Например, аминокислотный остаток 25 в SEQ ID NO:1, который представляет собой вариабельную область тяжелой цепи моноклонального анти-CD3 антитела, представляет собой сериновый остаток. После выравнивания с вариабельной областью тяжелой цепи представляющего интерес антитела, остаток, который выравнивается с сериновым остатком в положении 25 SEQ ID NO:1, будет мишенью для замены аминокислотной группы.

В соответствии с конкретным аспектом, замененная аминокислота находится на остатке 119 или 120 в CH1 SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12, или на остатке 121 или 124 в CL SEQ ID NO:13 или 14, предпочтительно, замена выбрана из S119C или T120C в CH1 SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12, или S121C или Q124C в CL SEQ ID NO:13 или 14, где остатки пронумерованы в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления, замененная аминокислота находится на остатке 120 в области CH1 SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12, предпочтительно, замена представляет собой замену T120C в области CH1 SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12, где остатки пронумерованы в соответствии с нумерацией EU.

В соответствии с конкретным аспектом, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и способно специфически связываться с CD3, предпочтительно, с CD3 человека. Выделенное анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, содержать определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно, или SEQ ID NO:33, 34, 35, 36, 37 и 38, соответственно.

В соответствии с конкретным аспектом, замененная аминокислота выбрана из остатков 25, 27, 62, 64, 73, 76, 101, 112 или 113 в VH анти-CD3 mAb (SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:27) или 26, 27, 52, 53, 56 или 67 в VL анти-CD3 mAb (SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:28), предпочтительно, замена выбрана из S25C, Y27C, K62C, K64C, K73C, S76C, D101C, S112C или S113C в VH (SEQ ID NO:1 или 27) или S26C, S27C, S52C, K53C, S56C или S67C в VL (SEQ ID NO:2 или 28), где остатки пронумерованы по Kabat. В некоторых вариантах осуществления, замененная аминокислота находится на остатке 64 в VH (SEQ ID NO:1 или 27) или 26 в VL (SEQ ID NO:2 или 28), предпочтительно, замена выбрана из замены K64C в VH (SEQ ID NO:1 или 27) или замены S26C в VL (SEQ ID NO:2 или 28), где остатки пронумерованы по Kabat.

В соответствии с конкретным аспектом, выделенное анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, содержать область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:1 с аминокислотной заменой K64C, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:2; или область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:27 с аминокислотной заменой K64C, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:28; или область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:1, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:2 с аминокислотной заменой S26C; или область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:27, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:28 с аминокислотной заменой S26C; или область CH1 с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12, с аминокислотной заменой T120C, и область CL с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:13 или 14; или область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:1, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:2, область CH1 с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12 с аминокислотной заменой T120C и область CL с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:13 или 14; или область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:27, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:28, область CH1 с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12 с аминокислотной заменой T120C и область CL с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:13 или 14.

В соответствии с конкретным аспектом, в настоящем документе предложено мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по

изобретению, и где мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одно или несколько антигенсвязывающих плеч, содержащих замененный аминокислотный остаток, который конъюгирован с FA. Мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут, например, быть биспецифическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления, каждое плечо мультиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может содержать замененную аминокислоту в другом положении остатка с той же или другой конъюгированной FA. В некоторых вариантах осуществления, каждое плечо мультиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может содержать одинаковую замененную аминокислоту в другом положении остатка с той же или другой конъюгированной FA. В некоторых вариантах осуществления, каждое плечо мультиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может содержать замененную аминокислоту в том же положении остатка с той же или другой конъюгированной FA. В некоторых вариантах осуществления, каждое плечо мультиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может содержать одинаковую замененную аминокислоту в одном и том же положении остатка с одной и той же или разными конъюгированными FA.

В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антигенсвязывающее плечо (Ab1) и второе антигенсвязывающее плечо (Ab2), где Ab1 и/или Ab2 содержат замененную аминокислоту, которая конъюгирована с FA.

В некоторых вариантах осуществления, Ab1 связывается с модулятором иммунных клеток (ICM), предпочтительно, ICM человека, выбранным из группы, состоящей из CD3, CD27, CD28, CD40, CD122, OX40, CD16, 4-1BB, GITR, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT, VISTA, SIGLEC7, NKG2D, SIGLEC9, KIR, CD91, BTLA, НКp46, B7-H3, SIPR α и других иммунорегуляторных молекул клеточной поверхности. ICM может, например, представлять собой CD3, предпочтительно, CD3 человека.

В некоторых вариантах осуществления, Ab2 связывается с опухолеассоциированным антигеном (ТАА), предпочтительно, с опухолеассоциированным антигеном человека (ТАА человека). Например, ТАА может быть DLL3.

В одном варианте осуществления изобретения, выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению представляет собой биспецифическое анти-CD3/анти-DLL3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где первое антигенсвязывающее плечо (Ab1) специфически связывает CD3, предпочтительно, CD3 человека, и второе антигенсвязывающее плечо (Ab2) специфически связывает DLL3, предпочтительно, DLL3 человека.

Согласно конкретному аспекту, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее H1 и L1, и второе антигенсвязывающее плечо (Ab2), содержащее H2 и L2, где:

(a) H1 и H2 каждая содержит CH1 область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека и

(b) каждая из L1 и L2 содержит CL область легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека;

где каждый H1L1 и H2L2 содержит пару зарядов, выбранную из группы, состоящей из следующих аминокислотных замен:

(1) G166D/E в CH1 H1 и S114K/R в CL L1, соответственно, и G166K/R в CH1 H2 и S114D/E в CL L2, соответственно;

(2) T187D/E в CH1 H1 и D/N170K/R в CL L1, соответственно, T187K/R в CH1 H2 и D/N170D/E в CL L2, соответственно;

(3) S131D/E в CH1 H1 и P119K/R в CL L1, соответственно, S131K/R в CH1 H2 и P119D/E в CL L2, соответственно;

(4) A129D/E в CH1 H1 и S121K/R в CL L1, соответственно, A129K/R в CH1 H2 и S121D/E в CL L2, соответственно;

(5) K/R133D/E в CH1 H1 и K207K/R в CL L1, соответственно, K/R133K/R в CH1 H2 и K207D/E в CL L2, соответственно;

(6) K/R133D/E в CH1 H1 и I/L117K/R в CL L1, соответственно, K/R133K/R в CH1 H2 и I/L117D/E в CL L2, соответственно;

(7) K/R133D/E в CH1 H1 и F/V209K/R в CL L1, соответственно, K/R133K/R в CH1 H2 и F/V209D/E в CL L2, соответственно;

(8) G166D/E в CH1 H2 и S114K/R в CL L2, соответственно, и G166K/R в CH1 H1 и S114D/E в CL L1, соответственно;

(9) T187D/E в CH1 H2 и D/N170K/R в CL L2, соответственно, T187K/R в CH1 H1 и D/N170D/E в CL L1, соответственно;

(10) S131D/E в CH1 H2 и P119K/R в CL L2, соответственно, S131K/R в CH1 H1 и P119D/E в CL L1, соответственно;

(11) A129D/E в CH1 H2 и S121K/R в CL L2, соответственно, A129K/R в CH1 H1 и S121D/E в CL L1, соответственно;

(12) K/R133D/E в CH1 H2 и K207K/R в CL L2, соответственно, K/R133K/R в CH1 H1 и K207D/E в CL L1, соответственно;

(13) K/R133D/E в CH1 H2 и I/L117K/R в CL L2, соответственно, K/R133K/R в CH1 H1 и I/L117D/E в CL L1, соответственно; или

(14) K/R133D/E в CH1 H2 и F/V209K/R в CL L2, соответственно, K/R133K/R в CH1 H1 и F/V209D/E в CL L1, соответственно.

Используемый в настоящем документе термин "пара зарядов" относится к паре аминокислот, одна из которых имеет положительный заряд, а другая имеет отрицательный заряд, которую можно ввести путем замены нативных аминокислотных остатков в области CH1 тяжелой цепи и в области CL легкой цепи первого плеча биспецифического антитела, соответственно, и одновременно та же пара аминокислот с положительным и отрицательным зарядом может быть введена путем замены нативных аминокислотных остатков в области CL легкой цепи и области CH1 тяжелой цепи второго плеча биспецифического антитела, соответственно. Альтернативно, аминокислоты с положительным и отрицательным зарядом могут быть введены путем аминокислотной замены в область VH тяжелой цепи и область VL легкой цепи первого плеча биспецифического антитела, соответственно, и одновременно та же пара аминокислоты с положительным зарядом и аминокислоты с отрицательным зарядом может быть введена аминокислотной заменой в область VL легкой цепи и область VH тяжелой цепи второго плеча, соответственно. Аминокислоты, используемые для образования пар зарядов, обычно включают D/E (отрицательный заряд) и K/R (положительный заряд). После введения в области CH1/CL или области VH/VL, аминокислоты с парой зарядов структурно находятся поблизости, и ожидается, что они будут усиливать взаимодействие тяжелой и легкой цепей одного и того же плеча за счет противоположных зарядов и исключать взаимодействие ошибочно спаренных тяжелых/легких цепей (несовместимых тяжелых и легких цепей из двух разных плеч) через одинаковые заряды. Результирующее распределение заряда введенной пары зарядов выглядит следующим образом: H1 (положительный заряд CH1)/L1 (отрицательный заряд CL)/H2 (отрицательный заряд CH1)/L2 (положительный заряд CL) или H1 (отрицательный заряд CH1)/L1 (положительный заряд CL)/H2 (положительный заряд CH1)/L2 (отрицательный заряд CL). Несколько пар зарядов могут быть объединены и введены в интерфейс CH1 и CL, где все аминокислоты с положительным зарядом вводятся в CH1, и все аминокислоты с отрицательным зарядом вводятся в CL того же плеча, или наоборот, чтобы соответствовать приведенной выше схеме распределения. Аналогичный подход можно применить к интерфейсу VH/VL. Кроме того, одна или несколько пар зарядов также могут быть введены на поверхность раздела VH и VL в комбинации с одной или несколькими парами зарядов, введенными на поверхность раздела CH1/CL - аминокислоты, введенные в одну и ту же цепь (любую из H1, L1, H2 или L2) обычно имеют одинаковый заряд, и полученное распределение введенных пар зарядов выглядит следующим образом: H1 (положительный заряд CH1 и VH)/L1 (отрицательный заряд CL и VL)/H2 (отрицательный заряд CH1 и VH)/L2 (положительный заряд CL и VL) или H1 (отрицательный заряд CH1 и VH)/L1 (положительный заряд CL и VL)/H2 (положительный заряд CH1 и VH)/L2 (отрицательный заряд CL и VL). Замены пары зарядов также можно комбинировать с другими модификациями для дальнейшего улучшения предпочтения спаривания родственных цепей (H1L1 и H2L2, соответственно) и/или облегчения очистки биспецифического антитела с использованием ионообменной хроматографии и/или ХГВ. Например, в дополнение к заменам пары зарядов, нативная межцепочечная дисульфидная связь на одном плече биспецифического антитела может быть смещена, в то время как другое плечо имеет нативную межцепочечную дисульфидную связь (см., например, PCT/US2020/063066, поданную в 3 декабря 2020, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

При описании пар зарядов, G166D/E представляет собой замену G в положении 166 (нумерация EU) на D или E, и в этом случае G166 является сайтом нокина; D170D/E представляет собой сохранение D в положении 170 или замену D в положении 170 на E; K/R133D/E представляет собой замену K или R (в зависимости от того, что находится в этом положении) в положении 133 на D или E; все остальные замены следуют тому же правилу именования.

В соответствии с конкретным аспектом, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:15, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:15. ID NO:17, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:16, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:18.

В соответствии с конкретным аспектом, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:19, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:21, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:20, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:22.

В соответствии с конкретным аспектом, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:29, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:30, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:16, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:18.

Согласно конкретному аспекту, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

содержит первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:31, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:32, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:20, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:22.

Согласно конкретному аспекту, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:15, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:17, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:16, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:18; и второе антигенсвязывающее плечо (Ab2), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:23, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:25, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:24, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:26;

(b) первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:19, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:21, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:20, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:22; и второе антигенсвязывающее плечо (Ab2), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:23, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:25, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:24, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:26;

(c) первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:29, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:30, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:16, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:18; и второе антигенсвязывающее плечо (Ab2), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:23, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:25, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:24, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:26; или

(d) первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:31, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:32, область CH1 область с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:20, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:22; и второе антигенсвязывающее плечо (Ab2), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:23, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:25, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:24, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:26.

В некоторых вариантах осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с FA на замененном аминокислотном остатке. FA может быть, например, выбрана из FA с 6 атомами углерода, 7 атомами углерода, 8 атомами углерода, 9 атомами углерода, 10 атомами углерода, 11 атомами углерода, 12 атомами углерода, 13 атомами углерода, 14 атомами углерода, 15 атомами углерода, 16 атомами углерода, 17 атомами углерода или 18 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления, FA выбрана из FA с 14 атомами углерода или 18 атомами углерода или любым числом атомов углерода между ними. Длина FA может определять относительное связывание альбумина с FA, которое может определять относительное связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном-мишенью. Чем длиннее конъюгированная FA, тем выше аффинность связывания конъюгированной FA с альбумином, что приводит к большему опосредованному альбумином снижению специфического связывания конъюгированных mAb или bsAb с антигеном-мишенью. Чем короче FA, тем ниже аффинность связывания конъюгированных FA с альбумином, что приводит к меньшему или незначительному опосредованному альбумином снижению специфического связывания конъюгированных mAb или bsAb с антигеном-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления, FA содержит линкер для конъюгации с замененным аминокислотным остатком. Линкер может быть, например, выбран из пептидного линкера или полиэтиленгликолевого (PEG) линкера. Пептидный линкер может, например, состоять из менее чем 50 аминокислот. Пептидный линкер может составлять 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 или менее аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления, FA, конъюгированная с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, способна связывать альбумин. Связывание альбумина с FA приводит к частичному или полному блокированию связывания антигена-мишени с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где только плечо Ab1 конъюгировано с FA, связывание альбумина с FA не влияет на связывание плеча Ab2 с ТАА. В некоторых вариантах осуществления, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий

звующий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где оба плеча Ab1 и Ab2 конъюгированы с FA, связывание альбумина с FA приводит к уменьшению или элиминации связывания Ab1 и Ab2 с антигеном-мишенью для Ab1 и Ab2, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают сниженной способностью активировать Т-клетки при связывании с альбумином по сравнению с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, не связывающимся с альбумином.

В одном варианте осуществления изобретения, анти-CD3/анти-DLL3 биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению способны активировать Т-клетки.

Полноразмерные биспецифические антитела по настоящему изобретению могут быть получены, например, с использованием обмена плечами Fab (или обмена половинками молекул) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами путем введения замен на границе тяжелой цепи СНЗ в каждой половинке молекулы, чтобы способствовать образованию гетеродимера из двух половинок молекул антитела, обладающих отчетливой специфичностью либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с помощью коэкспрессии. Реакция обмена плечами Fab является результатом реакции изомеризации дисульфидной связи и диссоциации-ассоциации СНЗ доменов. Дисульфидные связи тяжелой цепи в шарнирных областях исходных моноспецифических антител уменьшены. Образовавшиеся свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидную связь между тяжелыми цепями с цистеиновыми остатками молекулы второго исходного моноспецифического антитела, и одновременно высвобождаются и восстанавливаются СНЗ домены исходных антител путем диссоциации-ассоциации. СНЗ домены плеч Fab могут быть сконструированы таким образом, чтобы способствовать гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два плеча или полумолекулы Fab, каждая из которых связывает отдельный эпитоп, т.е. эпитоп на CD3 и эпитоп на DLL3.

Используемый в настоящем документе термин "гомодимеризация" относится к взаимодействию двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности СНЗ. Используемый в настоящем документе термин "гомодимер" относится к антителу, имеющему две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Используемый в настоящем документе термин "гетеродимеризация" относится к взаимодействию двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности СНЗ. Используемый в настоящем документе термин "гетеродимер" относится к антителу, имеющему две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Стратегия "выпуклость во впадине" (см., например, публикацию РСТ № WO 2006/028936) может быть использована для получения полноразмерных биспецифических антител. Коротко, выбранные аминокислоты, образующие поверхность раздела доменов СНЗ в IgG человека, могут быть мутированы в положениях, влияющих на взаимодействие СНЗ доменов, чтобы способствовать образованию гетеродимера. Аминокислота с малой боковой цепью (впадина) вводится в тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном, и аминокислота с большой боковой цепью (выпуклость) вводится в тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном. После коэкспрессии двух антител образуется гетеродимер в результате преимущественного взаимодействия тяжелой цепи с "впадиной" с тяжелой цепью с "выпуклостью". Типовые пары замен СНЗ, образующие выпуклость и впадину, представляют собой (выраженные как модифицированное положение в первом СНЗ домене первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором СНЗ домене второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Могут быть использованы другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелой цепи с использованием электростатических взаимодействий путем замены положительно заряженных остатков на одной поверхности СНЗ и отрицательно заряженных остатков на второй поверхности СНЗ, как описано в публикации патента США № US2010/0015133; публикации патента США № US2009/0182127; публикации патента США № US2010/028637; или публикации патента США № US2011/0123532. В других стратегиях, гетеродимеризации могут способствовать следующие замены (выраженные как модифицированное положение в первом СНЗ домене первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором СНЗ домене второй тяжелой цепи): L351Y_F405A/Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F_Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в публикации патента США № US2012/0149876 или публикации патента США № US2013/0195849.

В дополнение к способам, описанным выше, биспецифические антитела по изобретению могут быть получены *in vitro* в бесклеточной среде путем введения асимметричных мутаций в СНЗ областях двух моноспецифических гомодимерных антител и формирования биспецифического гетеродимерного антитела из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстанавливающих условиях, позволяющих изомеризацию дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в публикации патента РСТ № WO2011/131746. В способах, первое моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое двухвалентное антитело сконструированы так, чтобы иметь определенные

замены в СНЗ домене, которые способствуют стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы позволить цистеинам в шарнирной области подвергнуться изомеризации дисульфидной связи; тем самым создавая биспецифическое антитело путем обмена плечами Fab. Условия инкубации необязательно могут быть восстановлены до невозстанавливающих условий. Примерами восстанавливающих агентов, которые можно использовать, являются 2-меркаптоэтиламин (2-МЕА), дитиотреитол (ДТТ), дитиозритрит (ДТЕ), глутатион, трис-(2-карбокситил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно, восстанавливающий агент выбран из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис-(2-карбокситил)фосфина. Например, можно использовать инкубацию в течение, по меньшей мере, 90 мин при температуре, по меньшей мере, 20°C в присутствии, по меньшей мере, 25 мМ 2-МЕА или в присутствии, по меньшей мере, 0,5 мМ дитиотреитола при pH от 5 до 8, например при pH 7,0 или pH 7,4.

Полноразмерные биспецифические антитела по изобретению могут быть получены с использованием комбинации описанных выше подходов к гетеродимеризации и нескольких следующих подходов: (a) сдвиг межцепочечной дисульфидной связи HC/LC на одном плече биспецифического антитела (см., например, PCT/US2020/063066, поданной 3 декабря 2020 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки); (b) введение пар заряда в интерфейс VH/VL; (c) введение пар заряда в интерфейс CH1/CL; или (d) сочетание некоторых или всех подходов, описанных в (a)-(c) (см., например, как впервые описано в предварительной заявке на патент США № 63/146,334, поданной 5 февраля 2021 г., которая включена по ссылке в настоящем документе во всей полноте).

В другом общем аспекте, изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Специалистам в данной области техники будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, заменена, удалена, вставлена и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, могут быть изменены без изменения аминокислотных последовательностей белков.

В другом общем аспекте, изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области техники в свете настоящего изобретения, такой как плазида, космида, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии, такой как плазида. Вектор может включать любой элемент для установления обычной функции вектора экспрессии, например, промотор, элемент связывания рибосомы, терминатор, энхансер, маркер селекции и точку начала репликации. Промотор может быть конститутивным, индуцибельным или репрессируемым промотором. Ряд векторов экспрессии, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известен в данной области техники и может быть использован в настоящем документе для продуцирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке. Для создания рекомбинантного вектора экспрессии в соответствии с вариантами осуществления изобретения можно использовать обычные методы клонирования или синтез искусственных генов. Такие методики хорошо известны специалистам в данной области техники в связи с настоящим описанием.

В другом общем аспекте, изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Любая клетка-хозяин, известная специалистам в данной области техники в связи с настоящим описанием, может быть использована для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления, клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli* TG1 или BL21 (для экспрессии, например, антитела scFv или Fab), клетки CHO-DG44 или CHO-K1 или клетки HEK293 (для экспрессии, например, полноразмерного антитела IgG). В соответствии с конкретными вариантами осуществления, рекомбинантный вектор экспрессии трансформируют в клетки-хозяева обычными способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, где он стабильно интегрируется в геном клетки-хозяина, так что рекомбинантная нуклеиновая кислота эффективно экспрессируется.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или выделенного биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающих получение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть собраны из клеток и очищены в соответствии с обычными способами,

известными в данной области техники, и как описано в настоящем документе.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с FA по изобретению. Способы включают конъюгацию FA с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом на замененном аминокислотном остатке и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с FA.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с FA и связанного с альбумином. Способы включают контакт выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с FA, с альбумином и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгированного с FA, связанного с альбумином.

Фармацевтические композиции.

В другом общем аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Выделенное моноклональное или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно, например, конъюгировать с жирной кислотой (FA). Конъюгированное с FA моноклональное или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут, например, связываться с альбумином. Используемый в настоящем документе термин "фармацевтическая композиция" означает продукт, содержащий антитело по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Антитела по настоящему изобретению и композиции, их содержащие, также можно использовать в производстве упомянутого в настоящем документе лекарственного средства для терапевтического применения.

Используемый в настоящем документе термин "носитель" относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, липидсодержащей везикуле, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники для использования в фармацевтических составах. Понятно, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от пути введения для конкретного применения. Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному материалу, который не влияет на эффективность композиции по изобретению или биологическую активность композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, с учетом настоящего описания, любой фармацевтически приемлемый носитель, пригодный для использования в фармацевтической композиции антитела, может быть использован в изобретении.

Состав фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известен в данной области техники, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21-е издание (2005) и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают буферы, разбавители, растворители, агенты, регулирующие тоничность, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или несколько фармацевтически приемлемых носителей могут быть использованы при составлении фармацевтических композиций по изобретению.

В одном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой жидкий состав. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, т.е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может включать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и подобное. Водный состав обычно содержит, по меньшей мере, 50% масс/масс воды или, по меньшей мере, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или, по меньшей мере, 95% масс/масс воды.

В одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция может быть составлена в виде инъекционного препарата, который можно вводить, например, с помощью инъекционного устройства (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекцию можно вводить, например, подкожно, внутримышечно, внутривенно, интравитреально или интравентрикулярно.

В другом варианте осуществления, фармацевтическая композиция представляет собой твердую композицию, например лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно использовать как есть, или к которой врач или пациент перед применением добавляют растворители и/или разбавители. Твердые дозированные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки и/или таблетки с покрытием, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция также может быть в форме пакетиков, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков для восстановления, например.

Дозированные формы могут быть с немедленным высвобождением, и в этом случае они могут включать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут быть с отсроченным высвобождением, пролонгированным высвобождением или модифицированным высвобождением, и в этом случае они могут содержать водонерастворимые полимеры, которые регулируют скорость растворения дозированной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

В других вариантах осуществления, фармацевтическую композицию можно вводить интраназально, интрабуккально или сублингвально.

pH водного состава может быть между pH 3 и pH 10. В одном варианте осуществления изобретения,

pH композиции составляет от примерно 7,0 до примерно 9,5. В другом варианте осуществления изобретения, pH состава составляет от примерно 3,0 до примерно 7,0.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит буфер. Неограничивающие примеры буферов включают: аргинин, аспарагиновую кислоту, бичин, цитрат, ди-натрийгидрофосфат, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, винную кислоту, трицин и трис-(гидроксиметил)-аминометан и их смеси. Буфер может присутствовать индивидуально или в агрегате в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных буферов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит консервант. Неограничивающие примеры консервантов включают: хлорид бензетония, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксibenзоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенезин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил-4-гидроксibenзоат, имидмочевину, метил-4-гидроксibenзоат, фенол, 2-феноксиэтанол, 2-фенилэтанол, пропил-4-гидроксibenзоат, дегидроацетат натрия, тиоме-росал и их смеси. Консервант может присутствовать индивидуально или в совокупности в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных консервантов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит изотонический агент. Неограничивающие примеры изотонических агентов включают соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновая кислота, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин, 1,2-пропандиол, пропиленгликоль), 1,3-пропандиол и 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, PEG400) и их смеси. Другой пример изотонического агента включает сахар. Неограничивающими примерами сахаров могут быть моно-, ди- или полисахариды или водорастворимые глюканы, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа- и бета-HPCD, растворимый крахмал, гидроксиэтилкрахмал и карбоксиметилцеллюлозу натрия. Другим примером изотонического агента является сахарный спирт, где термин "сахарный спирт" определяется как C(4-8) углеводород, имеющий, по меньшей мере, одну группу -ОН. Неограничивающие примеры сахарных спиртов включают маннит, сорбит, инозит, галактит, дульцит, ксилит и арабит. Изотонический агент может присутствовать индивидуально или в совокупности в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных изотонических агентов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит хелатирующий агент. Неограничивающие примеры хелатирующих агентов включают лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) и их смеси. Хелатирующий агент может присутствовать индивидуально или в совокупности в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных хелатирующих агентов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Неограничивающие примеры стабилизаторов включают один или несколько ингибиторов агрегации, один или несколько ингибиторов окисления, одно или несколько поверхностно-активных веществ и/или один или несколько ингибиторов протеазы.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит стабилизатор, где указанный стабилизатор представляет собой карбокси/гидроксицеллюлозу и ее производные (такие как НРС, НРС-SL, НРС-L и НРМС), циклодекстрины, 2-метилтиоэтанол, полиэтиленгликоль (например, PEG 3350), поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон, соли (например, хлорид натрия), серосодержащие вещества, такие как монотиоглицерин) или тиогликолевая кислота. Стабилизатор может присутствовать индивидуально или в совокупности в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных стабилизаторов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В дополнительных вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит один или несколько поверхностно-активных веществ, предпочтительно, поверхностно-активное вещество, по меньшей мере, одно поверхностно-активное вещество или два различных поверхностно-активных вещества. Термин "поверхностно-активное вещество" относится к любым молекулам или ионам, которые состоят из водорастворимой (гидрофильной) части и жирорастворимой (липофильной) части. Поверхностно-активное вещество может быть выбрано, например, из группы, состоящей из анионных поверхностно-активных веществ, катионных поверхностно-активных веществ, неионных поверхностно-активных

веществ и/или цвиттерийонных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может присутствовать индивидуально или в совокупности в концентрации от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных поверхностно-активных веществ, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит один или несколько ингибиторов протеаз, таких как, например, EDTA и/или бензамидинхлоридоводородная кислота (HCl). Ингибитор протеазы может присутствовать индивидуально или в совокупности в концентрации от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических ингибиторов протеазы, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающий объединение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Способы применения.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу таргетирования опухолеассоциированного антигена (ТАА) (например, DLL3), экспрессируемого на поверхности раковых клеток у субъекта, нуждающегося в этом. Способы включают введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий плечо Ab1 (например, плечо анти-ICM, такое как плечо анти-CD3), конъюгированное с FA (например, биспецифическое антитело анти-CD3/анти-DLL3 или его антигенсвязывающий фрагмент) по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Одновременное связывание выделенного биспецифического антитела, конъюгированного с FA, или его антигенсвязывающего фрагмента с экспрессирующей ТАА раковой клеткой через плечо анти-ТАА (плечо Ab2) и Т-клеткой через анти-CD3 плечо (плечо Ab1), при низком уровне альбумина может способствовать уничтожению раковых клеток. В циркулирующей крови, где уровень альбумина высок (например, от 35 до 50 мг/мл), конъюгированное с FA анти-CD3 плечо находится в связанном с альбумином состоянии и, следовательно, имеет пониженную способность связываться и активировать Т-клетки. Т-клеточный антиген-мишень, с которым связывается плечо Ab1, может представлять собой другой Т-клеточный ICM, такой как 4-1BB, GITR, CD28 или PD-1. Этот подход может повысить запас прочности анти-ICM (например, анти-CD3) на основе биспецифического привлекающего Т-клетки агента за счет минимизации токсичности в отношении мишени и вне опухоли. Кроме того, этот подход можно применять к bsAb (включающим анти-ТАА плечо и конъюгированное анти-ICM плечо), которые можно использовать в качестве агентов взаимодействия с другими иммунными клетками. Кроме того, этот подход может быть применен к применению конъюгированных с FA mAb и/или bsAb к тканям-мишеням (таким как жировая ткань или скелетные мышцы), где локальный уровень альбумина ниже, чем в циркулирующей крови, чтобы свести к минимуму проблемы безопасности мишени в кровообращении (Ellmerer et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000. 278: E352-E356).

Функциональная активность моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают антиген-мишень (например, ICM, такой как CD3), или биспецифических антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают как ТАА (например, DLL3), так и Т-клеточный антиген-мишень (например, ICM, такой как CD3) можно охарактеризовать способами, известными в данной области техники и описанными в настоящем документе. Способы характеристики биспецифических антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают как ТАА (например, DLL3), так и Т-клеточный антиген-мишень (например, CD3), включая, но не ограничиваясь ими, анализы аффинности и специфичности, включая анализы Biacore, ELISA, FACS и OctetRed. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, способы характеристики биспецифических антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают как DLL3, так и CD3, включают способы, описанные ниже. Функциональную активность моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают ICM, или биспецифических антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают как ТАА (например, DLL3), так и ICM, отличный от CD3, можно охарактеризовать способами, аналогичными представленным выше.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или выделенного биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции по изобретению. Рак может представлять собой любой гемобластоз или солидный рак, например, он может быть выбран из, но не ограничиваясь ими, рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического

лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелоидного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

Согласно вариантам осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. Используемый в настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает желаемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели.

Используемое в настоящем документе в отношении моноклональных и/или биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, терапевтически эффективное количество означает количество моноклонального и/или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое модулирует иммунный ответ у субъекта, нуждающегося в этом. Также в настоящем описании в отношении моноклональных и/или биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, терапевтически эффективное количество означает количество моноклонального и/или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое приводит к лечению заболевания, нарушения или состояния; предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, нарушения или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, связанные с заболеванием, нарушением или состоянием.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой рак, предпочтительно рак, выбранный из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелоидного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML), и других гемобластозов. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления, заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой воспалительное заболевание, метаболическое заболевание, сердечно-сосудистое заболевание, неврологическое заболевание, инфекционное заболевание или любое другое заболевание, при котором биспецифическое антитело может быть использовано в качестве терапии.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, терапевтически эффективное количество относится к количеству терапии, достаточной для достижения одного, двух, трех, четырех или нескольких из следующих эффектов: (i) снижение или облегчение тяжести заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) уменьшение продолжительности заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iii) предотвращение прогрессирования заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (iv) регресс заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (v) профилактика развития или начала заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) профилактика рецидива заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшение госпитализаций субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) уменьшение продолжительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (ix) увеличение выживаемости субъекта с заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащим лечению, или симптомом, связанным с ним; (x) ингибирование или уменьшение заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического или терапевтического эффекта(ов) другой терапии.

Терапевтически эффективное количество или дозировка могут варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, способ введения, участок-мишень, физиологическое состояние субъекта (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), является ли субъект человеком или животным, вводят ли другие лекарственные средства и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Лечебные дозы оптимально титруются для оптимизации безопасности и эффективности.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, композиции, описанные в настоящем документе, составлены таким образом, чтобы они подходили для предполагаемого пути введения субъекту. Например, композиции, описанные в настоящем документе, могут быть составлены таким образом, чтобы они подходили для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

Используемые в настоящем документе термины "лечить", "лечение" и "лечение" предназначены для обозначения улучшения или изменения, по меньшей мере, одного измеримого физического параметра, связанного с раком, который не обязательно различим у субъекта, но может быть различим у субъекта.

Термины "лечить", "лечение" и "лечение" могут также относиться к вызыванию регрессии, профилактике прогрессирования или, по меньшей мере, замедлению прогрессирования заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "лечение" относятся к облегчению, профилактике развития или возникновения или сокращению продолжительности одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием, нарушением или состоянием, таким как опухоль или, более предпочтительно, рак. В конкретном варианте осуществления "лечить", "лечение" и "лечение" относятся к профилактике рецидива заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, термины "лечить", "лечение" и "лечение" относятся к увеличению выживаемости субъекта, страдающего заболеванием, нарушением или состоянием. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечение" и "лечение" относятся к устранению заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, предложены композиции, используемые для лечения рака. Для терапии рака композиции можно использовать в сочетании с другим лечением, включая, но не ограничиваясь этим, химиотерапию, анти-TIM-3 mAb, анти-LAG-3 mAb, анти-CD73 mAb, анти-CD47 mAb, анти-апелин mAb, анти-CTLA-4 mAb, анти-EGFR mAb, анти-HER-2 mAb, анти-CD19 mAb, анти-CD20 mAb, анти-CD33 mAb, анти-TIP-1 mAb, анти-DLL3 mAb, анти-CLDN18.2 mAb, анти-PD-L1 антитело, анти-PD-1 антитело, PD-1/PD-L1 терапия, другие иммуно-онкологические лекарственные средства, антиангиогенный агент, лучевую терапию, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), таргетную терапию или другие противораковые лекарственные средства.

Используемый в настоящем документе термин "в комбинации" в контексте введения двух или нескольких видов терапии субъекту относится к применению более чем одного вида терапии. Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок, в котором субъекту вводят терапевтические средства. Например, первая терапия (например, композиция, описанная в настоящем документе) может быть введена до (например, за 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно или после (например, через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения второй терапии субъекту.

Также предложены способы, включающие контакт альбумина с конъюгатом, содержащим жирную кислоту (FA), ковалентно связанную, необязательно через линкер, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в конъюгате способны специфически связываться с антигеном-мишенью, FA в составе конъюгата способны связываться с альбумином, и связывание альбумина с FA приводит к частичной или полной блокировке связывания антигена-мишени с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления, стадия контакта включает введение фармацевтической композиции, содержащей конъюгат, субъекту, нуждающемуся в лечении опухоли, при этом опухоль содержит антиген-мишень. В некоторых вариантах осуществления, альбумин имеет более высокий метаболизм в микроокружении опухоли по сравнению с циркулирующей кровью и/или присутствует в микроокружении опухоли на уровне ниже, чем уровень альбумина в циркулирующей крови субъекта.

Варианты осуществления

Изобретение также предлагает следующие неограничивающие варианты осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

a) вариабельную область тяжелой цепи (VH);

b) вариабельную область легкой цепи (VL);

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном-мишенью, предпочтительно антигеном-мишенью человека;

где аминокислотный остаток в VH, VL или на расстоянии двадцати (20) аминокислот от VH или VL на одном или обоих плечах заменен аминокислотным остатком, который конъюгирован с жирной кислотой (FA);

и где при конъюгации с FA на замененном аминокислотном остатке, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент все еще связываются с антигеном-мишенью.

Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, где замененный аминокислотный остаток находится в пределах пяти (5) аминокислотных остатков от VH или VL на одном или обоих плечах.

Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, где замененный аминокислотный остаток представляет собой цистеиновый остаток, лизиновый остаток или модифицированную аминокислоту, подходящую для химической конъюгации.

Вариант осуществления 4 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 3, где замененный аминокислотный остаток находится в аминокислотном остатке, соответствующем:

- (1) остатку 25, 27, 62, 64, 73, 76, 101, 112 или 113 SEQ ID NO:1 в VH (нумерация Kabat);
- (2) остатку 26, 27, 52, 53, 56 или 67 SEQ ID NO:2 в VL (нумерация Kabat);
- (3) остатку 119 или 120 SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12 в CH1 (нумерация EU) или
- (4) остатку 121 или 124 SEQ ID NO:13 или 14 в CL (нумерация EU).

Вариант осуществления 5 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 4, где замененный аминокислотный остаток находится в аминокислотном остатке, соответствующем:

- (1) замене K64C SEQ ID NO:1 в VH;
- (2) замене S26C SEQ ID NO:2 в VL или
- (3) замене T120C SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12 в области CH1.

Вариант осуществления 6 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело против модулятора иммунных клеток (ICM) или его антигенсвязывающий фрагмент и способно специфически связываться с ICM, предпочтительно, с ICM человека.

Вариант осуществления 7 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту 6, где ICM выбран из группы, состоящей из CD3, CD27, CD28, CD40, CD122, OX40, CD16, 4-1BB, GITR, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT, VISTA, SIGLEC7, NKG2D, SIGLEC9, KIR, CD91, BTLA, NKp46, B7-H3, SIPR α и других иммунорегуляторных молекул клеточной поверхности.

Вариант осуществления 8 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 7, где ICM представляет собой CD3, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно; или SEQ ID NO:33, 34, 35, 36, 37 и 38, соответственно.

Вариант осуществления 9 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 7 или 8, где ICM представляет собой CD3, и где замененный аминокислотный остаток находится в аминокислотном остатке, выбранном из:

- (1) остатка 25, 27, 62, 64, 73, 76, 101, 112 или 113 SEQ ID NO:1 или 27 в VH (нумерация Kabat);
- (2) остатка 26, 27, 52, 53, 56 или 67 SEQ ID NO:2 или 28 в VL (нумерация Kabat);
- (3) остатка 119 или 120 SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12 в CH1 (нумерация EU) или
- (4) остатка 121 или 124 SEQ ID NO:13 или 14 в CL (нумерация EU).

Вариант осуществления 10 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 5-9, содержащее:

- (1) область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:1 с аминокислотной заменой K64C, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:2;
- (2) область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:27 с аминокислотной заменой K64C, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:28;
- (3) область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:1, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:2 с аминокислотной заменой S26C;
- (4) область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:27, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:28 с аминокислотной заменой S26C;
- (5) область CH1 с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12, с аминокислотной заменой T120C, и область CL с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:13 или 14;
- (6) область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:1, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:2, область CH1 с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12 с аминокислотной заменой T120C, и область CL с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:13 или 14; или
- (7) область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:27, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:28, область CH1 с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12 с аминокислотной заменой T120C, и область CL с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:13 или 14.

Вариант осуществления 11 представляет собой выделенное мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-10, и где мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одно или несколько антигенсвязывающих плеч, содержащих замененный аминокислотный остаток, который конъюгирован с FA.

Вариант осуществления 12 представляет собой мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 11, где мультиспецифическое антитело или его анти-

генсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий первое антигенсвязывающее плечо (Ab1) и второе антигенсвязывающее плечо (Ab2), где Ab1 и/или Ab2 содержат замененную аминокислоту, которая конъюгирована с FA.

Вариант осуществления 13 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 12, где Ab1 связывает модулятор иммунных клеток (ICM), предпочтительно, ICM человека.

Вариант осуществления 14 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 13, где ICM выбран из группы, состоящей из CD3, CD27, CD28, CD40, CD122, OX40, CD16, 4-1BB, GITR, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT, VISTA, SIGLEC7, NKG2D, SIGLEC9, KIR, CD91, BTLA, NKp46, B7-H3, SIPR α и других иммунорегуляторных молекул клеточной поверхности.

Вариант осуществления 15 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 12-14, где Ab2 связывает опухолеассоциированный антиген (ТАА), предпочтительно, опухолеассоциированный антиген человека (ТАА человека).

Вариант осуществления 16 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 15, где ТАА представляет собой DLL3.

Вариант осуществления 17 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 12-16, где первое антигенсвязывающее плечо (Ab1) содержит H1 и L1, и второе антигенсвязывающее плечо (Ab2) содержит H2 и L2, где:

(a) H1 и H2 каждая содержит область CH1 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека; и

(b) каждая из L1 и L2 содержит CL-область легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека;

где каждый H1L1 и H2L2 содержит пару зарядов, выбранную из группы, состоящей из следующих аминокислотных замен:

(1) G166D/E в CH1 H1 и S114K/R в CL L1, соответственно, и G166K/R в CH1 H2 и S114D/E в CL L2, соответственно;

(2) T187D/E в CH1 H1 и D/N170K/R в CL L1, соответственно, T187K/R в CH1 H2 и D/N170D/E в CL L2, соответственно;

(3) S131D/E в CH1 H1 и P119K/R в CL L1, соответственно, S131K/R в CH1 H2 и P119D/E в CL L2, соответственно;

(4) A129D/E в CH1 H1 и S121K/R в CL L1, соответственно, A129K/R в CH1 H2 и S121D/E в CL L2, соответственно;

(5) K/R133D/E в CH1 H1 и K207K/R в CL L1, соответственно, K/R133K/R в CH1 H2 и K207D/E в CL L2, соответственно;

(6) K/R133D/E в CH1 H1 и I/L117K/R в CL L1, соответственно, K/R133K/R в CH1 H2 и I/L117D/E в CL L2, соответственно;

(7) K/R133D/E в CH1 H1 и F/V209K/R в CL L1, соответственно, K/R133K/R в CH1 H2 и F/V209D/E в CL L2, соответственно;

(8) G166D/E в CH1 H2 и S114K/R в CL L2, соответственно, и G166K/R в CH1 H1 и S114D/E в CL L1, соответственно;

(9) T187D/E в CH1 H2 и D/N170K/R в CL L2, соответственно, T187K/R в CH1 H1 и D/N170D/E в CL L1, соответственно;

(10) S131D/E в CH1 H2 и P119K/R в CL L2, соответственно, S131K/R в CH1 H1 и P119D/E в CL L1, соответственно;

(11) A129D/E в CH1 H2 и S121K/R в CL L2, соответственно, A129K/R в CH1 H1 и S121D/E в CL L1, соответственно;

(12) K/R133D/E в CH1 H2 и K207K/R в CL L2, соответственно, K/R133K/R в CH1 H1 и K207D/E в CL L1, соответственно;

(13) K/R133D/E в CH1 H2 и I/L117K/R в CL L2, соответственно, K/R133K/R в CH1 H1 и I/L117D/E в CL L1, соответственно; или

(14) K/R133D/E в CH1 H2 и F/V209K/R в CL L2, соответственно, K/R133K/R в CH1 H1 и F/V209D/E в CL L1, соответственно.

Вариант осуществления 18 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 12-17, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а) первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:15, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:17, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:16, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:18;

б) первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последова-

тельностью SEQ ID NO:19, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:21, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:20, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:22;

с) первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:29, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:30, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:16, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:18; или

д) первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:31, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:32, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:20, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:22.

Вариант осуществления 19 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 18, где второе антигенсвязывающее плечо (Ab2) содержит область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:23, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:25, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:24, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:26.

Вариант осуществления 20 представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-19, где FA выбрана из FA с 6 атомами углерода, 8 атомами углерода, 10 атомами углерода, 12 атомами углерода, 14 атомами углерода, 16 атомами углерода или 18 атомами углерода или любым количеством атомов углерода между ними.

Вариант осуществления 21 представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 20, где FA выбрана из FA с 14 атомами углерода или 18 атомами углерода или любым числом атомов углерода между ними.

Вариант осуществления 22 представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-21, где FA содержит линкер для конъюгации с замененным аминокислотным остатком.

Вариант осуществления 23 представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 22, где линкер выбран из пептидного линкера или полиэтиленгликолевого линкера.

Вариант осуществления 24 представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 23, где пептидный линкер состоит менее чем из 50 аминокислот.

Вариант осуществления 25 представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-24, где FA, конъюгированная с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, способна связывать альбумин, где связывание альбумина с FA приводит к частичному или полному блокированию связывания антигена-мишени с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Вариант осуществления 26 представляет собой выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-25, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают сниженной способностью активировать Т-клетки при связывании с альбумином по сравнению с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, не связанным с альбумином.

Вариант осуществления 27 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-26.

Вариант осуществления 28 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 27.

Вариант осуществления 29 представляет собой выделенную клетку-хозяина, содержащую вектор по варианту осуществления 27.

Вариант осуществления 30 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-26 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 31 представляет собой способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 30.

Вариант осуществления 32 представляет собой способ по варианту осуществления 31, где рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелоидного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластов.

Вариант осуществления 33 представляет собой способ получения выделенного антитела или его ан-

тигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-26, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях продуцирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Вариант осуществления 34 представляет собой способ по варианту осуществления 33, дополнительно включающий конъюгацию FA с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом на замененном аминокислотном остатке.

Вариант осуществления 35 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где способ включает комбинирование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-26 с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Вариант осуществления 36 представляет собой способ, включающий контакт альбумина с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из вариантов осуществления 1-26, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны специфически связываться с антиген-мишенью, FA способна связываться с альбумином, и связывание альбумина с FA приводит к частичному или полному блокированию связывания антигена-мишени с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Вариант осуществления 37 представляет собой способ по варианту осуществления 36, где стадия контакта включает введение фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, субъекту, нуждающемуся в лечении опухоли, где опухоль содержит антиген-мишень.

Вариант осуществления 38 представляет собой способ по варианту осуществления 36 или 37, где альбумин имеет более высокий метаболизм в микроокружении опухоли по сравнению с циркулирующей кровью и/или присутствует в микроокружении опухоли на уровне ниже, чем уровень альбумина в циркулирующей крови субъекта, предпочтительно, более низкий уровень альбумина в микроокружении опухоли обусловлен высоким катаболизмом альбумина в микроокружении опухоли и/или высоким уровнем протеаз в микроокружении опухоли.

Примеры

Пример 1. Конструирование и характеристика моноклональных антител для конъюгации с молекулами жирных кислот.

Фиг. 1A схематически иллюстрирует моноклональное антитело (mAb), в котором остаток в VH-области идентифицирован и заменен цистеином (нокинированным цистеином). Молекула жирной кислоты (FA), содержащая линкер и реакционноспособную группу, конъюгирована с нокинированным цистеином, так что каждое mAb содержит две молекулы FA (фиг. 1A). Моноклональное антитело может также содержать замененный аминокислотный остаток в VL или на расстоянии двадцати (20) аминокислот, предпочтительно, пяти (5) аминокислот, от VH или VL в области CH1 или CL. Нокинированный цистеиновый остаток также может быть другим реакционноспособным аминокислотным остатком, подходящим для конъюгации FA.

Молекулы конъюгированных FA могут связываться с альбумином, циркулирующим в крови и/или интерстициальной жидкости в тканях. Ожидается, что связанные молекулы альбумина будут частично или полностью блокировать взаимодействие антигенсвязывающего домена (содержащего VH и VL) конъюгированного mAb с антигеном из-за пространственного эффекта затруднения связанного альбумина. Следовательно, антигенсвязывающая активность конъюгированных mAb может регулироваться уровнем окружающего альбумина. В зависимости от местоположения вставленного аминокислотного остатка, длины FA, наличия линкера и длины линкера можно достичь различной степени модуляции связывания mAb с антигеном-мишенью.

mAb на фиг. 1A может, например, представлять собой анти-CD3 антитело. После конъюгации, активность анти-CD3 mAb можно модулировать *in vivo* альбумином, так что анти-CD3 mAb становится неактивным или менее активным в циркулирующей крови. В микроокружении опухоли, из-за более высокого метаболизма альбумина по сравнению с циркулирующей кровью, концентрация несвязанных конъюгированных mAb (т.е. не связанных с альбумином конъюгированных анти-CD3 mAb) увеличивается, и активация Т-клеток приводит к эффекту уничтожения рака, опосредованному анти-CD3 mAb. mAb могут быть направлены на другие раковые мишени, особенно на ICM (например, 4-1BB, GITR, OX40, CD28 или PD-1), где терапевтический подход требует меньшей или нулевой активности mAb в циркулирующей крови и большей активности в микроокружении опухоли. Кроме того, стратегию конъюгации и модуляции можно использовать с антигенсвязывающим фрагментом, который не является mAb. В этом случае, сайт конъюгации FA, длина FA, наличие линкера и длина линкера выбраны таким образом, чтобы альбумин, связанный с FA, выступал на поверхности раздела между антигенсвязывающим доменом и антигеном-мишенью.

Конъюгированное mAb или его антигенсвязывающий фрагмент можно использовать для конструирования биспецифического антитела (bsAb) или его антигенсвязывающего фрагмента с другим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В иллюстративных целях, конъюгированные биспецифи-

ческие антитела показаны на фиг. 1B, 1C. Плечо Ab1 получено из анти-CD3 антитела, и плечо Ab2 получено из mAb против опухолеассоциированного антигена (ТАА). Конъюгация молекулы FA с областью (например, VH, VL или в пределах двадцати (20) аминокислот, предпочтительно, пяти (5) аминокислот, области VH или VL) анти-CD3 плеча может модулировать активность анти-CD3 и, следовательно, модулировать активацию Т-клеток биспецифическим антителом, в то время как связывание анти-ТАА плеча с ТАА не зависит от окружающих концентраций альбумина. Ожидается, что биспецифическое антитело, конъюгированное с FA, будет менее активным или вообще не будет активным в циркулирующей крови и/или некоторых тканевых жидкостях при высоких уровнях альбумина (например, от 35 до 50 мг/мл). Ожидается, что биспецифическое антитело, конъюгированное с FA, будет активным в стимуляции Т-клеток в определенных микроокружениях опухоли из-за высокого метаболизма альбумина, что приводит к более низким локальным уровням альбумина и более высоким концентрациям голых конъюгированных bsAb (т.е. не связанных с альбумином конъюгированных анти-CD3 bsAb) и усилению уничтожения раковых клеток за счет активации Т-клеток. Анти-CD3 плечо bsAb может быть направлено на другие раковые мишени, особенно, ICM (например, 4-1BB, GITR, OX40, CD28 или PD-1), где терапевтический подход требует меньшей или отсутствия активности bsAb в циркулирующей крови, и большей активности в микроокружении опухоли. Этот подход может увеличить резерв безопасности биспецифического привлекающего Т-клетки агента на основе анти-CD3 за счет минимизации токсичности в отношении мишени и вне опухоли. Такое терапевтическое средство может снизить риск синдрома цитокинового шторма (CRS), обычно наблюдаемого при вовлечении анти-CD3 Т-клеток. Стратегию конъюгации и модуляции можно использовать с биспецифическим антигенсвязывающим фрагментом, который не является биспецифическим антителом. В этом случае, сайт конъюгации FA, длина FA, наличие линкера и длина линкера выбраны таким образом, чтобы альбумин, связанный с FA, выступал на поверхности раздела между антигенсвязывающим доменом и антигеном-мишенью.

На фиг. 1D представлена схема, демонстрирующая механизм действия конъюгированного с FA биспецифического антитела, привлекающего Т-клетки, убивающего раковую клетку. Анти-ТАА плечо связывается с ТАА на поверхности раковых клеток независимо от уровня окружающего альбумина. Конъюгированное с FA плечо, взаимодействующее с Т-клетками (например, анти-CD3 плечо), не связывается с антигеном-мишенью (например, CD3), когда уровень окружающего альбумина высок (например, от 35 до 50 мг/мл, например, в циркулирующей крови); однако, когда уровень окружающего альбумина низкий, конъюгированное с FA плечо, взаимодействующее с Т-клетками (например, анти-CD3 плечо), связывается с антигеном-мишенью (например, CD3) и активирует Т-клетку, что приводит к гибели раковой клетки. Плечо, конъюгированное с FA, может быть плечом, взаимодействующим с Т-клетками, против других ICM Т-клеток, таких как 4-1BB, GITR, OX40, CD28, PD-1, или любых других мишеней, которые экспрессируются на Т-клетках и могут опосредовать активацию Т-клеток после связывания специфическим антителом. Кроме того, плечо, конъюгированное с FA, может быть направлено против ICM на других иммунных клетках. Подход, заключающийся в использовании более низкого уровня альбумина в сайте-мишени по сравнению с уровнем в циркулирующей крови, также может быть применен к терапии, таргетирующей ткани с низким локальным уровнем альбумина; эти ткани включают жировую ткань и скелетные мышцы (Ellmerer et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000. 278: E352-E356). На фиг. 1E показаны конкретные стадии идентификации mAb или bsAb, конъюгированных с FA.

Модифицированное анти-CD3-антитело используют для конструирования конъюгированных mAb. Последовательности и нумерация VH и VL областей анти-CD3 mAb показаны на фиг. 2A-2B и в табл. 1 (SEQ ID NO:1 и 2, соответственно). Последовательности областей CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3) перечислены в табл. 2 (SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно, и SEQ ID NO:33, 34, 35, 36, 37 и 38, соответственно). Последовательности и нумерация областей CH1 тяжелых цепей (HC) IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 показаны на фиг. 2C и в табл. 1 (SEQ ID NO:9, 10, 11 и 12, соответственно). Последовательности и нумерация областей CL легких цепей каппа и лямбда (LC) показаны на фиг. 2D и в табл. 1 (SEQ ID NO:13 и 14, соответственно).

Остатки на поверхности Fab-области анти-CD3-антитела идентифицируют с помощью структурного моделирования. Последовательность анти-CD3 mAb моделируют как 1SY6 и 3EO9 с помощью Schrodinger Bioluminate® (Schrodinger; New York, NY). Рассчитывают доступность боковой цепи для растворителя, и остатки в переменных областях как тяжелой, так и легкой цепи или рядом с ними с доступностью боковой цепи в диапазоне от 30% до 70% выбирают в качестве возможных кандидатов для включения цистеина. Остатки, идентифицированные для нокина, перечислены в табл. 3. Четыре остатка, выбранные для эксперимента по нокину цистеина, показаны в трехмерной структуре анти-CD3 mAb в качестве примеров (фиг. 3A): S26 и S31 в VL области, K64 в VH области и T120 в CH1 области HC (3 аминокислотных остатка от С-конца области VH). MAb с цистеинами, нокинированными в эти сайты, называют LC_S26C, LC_S31C, HC_K64C и HC_T120C, соответственно. LC_S26C представляет собой анти-CD3 mAb с остатком серина в положении S26 легкой цепи, замененным цистеином. Другие mAb следуют тому же правилу именования.

Таблица 1

Последовательности областей анти-CD3 VH, анти-CD3 VL, #2 анти-CD3 VH, #2 анти-CD3 VL, IgG1 CH1, IgG2 CH1, IgG3 CH1, IgG4 CH1, каппа CL и лямбда CL

Наименование области	Последовательность	SEQ ID NO:
Анти-CD3 VH	DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRP GQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSS	1
Анти-CD3 VL	DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTS PKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATY YCQQWSSNPLTFGAGTKLELK	2
#2 анти-CD3 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDKSSSTAYMQ LSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSS	27
#2 анти-CD3 VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTS PKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATY YCQQWSSNPFTFGSGTKLEIN	28
IgG1 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSC	9
IgG2 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVKCC	10
IgG3 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVN HKPSNTKVDKRVELKPLG	11
IgG4 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYG	12
Каппа CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK	13
	VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
Лямбда CL	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTEC	14

Таблица 2

Области CDR для анти-CD3 mAb и #2 анти-CD3 mAb

Цепь	CDR1	SEQ ID NO:	CDR2	SEQ ID NO:	CDR3	SEQ ID NO:
HC	GYTFTRYT MH	3	YINPSRGYTNYNQK FKD	4	ARYYDDHYS LDY	5
LC	RASSSVSY MN	6	DTSKVAS	7	QQWSSNPLT	8
#2 HC	GYTFTRYT MH	33	YINPSRGYTNYNQK FKD	34	ARYYDDHYS LDY	35
#2 LC	SASSSVSYM N	36	DTSKLAS	37	QQWSSNPFT	38

HC: тяжелая цепь;

LC: легкая цепь;

CDR: определяющая комплементарность область;

CDR для анти-CD3 mAb определяют с использованием комбинации IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212) и способов Kabat (Elvin A. Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991)).

Таблица 3

Аминокислотные замены-кандидаты на анти-CD3 mAb для конъюгации

Сайт нокина цистеина	Область			
	VH	CH1	VL	CL
1			S26C	
2	K64C			
3		T120C		
4			S67C	
5				S121C
6				Q124C
7		S119C		
8	S112C			
9	S25C			
10	S76C			
11			S27C	

12			S52C	
13			S56C	
14	K62C			
15	S113C			
16			K53C	
17	K73C			
18	Y27C			
19	D101C			
20	Q61			
21			Q3	
22			T5	
23			S7	
24			K18	
25			T20	
26			K45	
27			Y60	
28			S63	
29			S65	
30			S76	
31	K3			
32	Q5			
33	K19			
34	T68			
35	T70			
36	S74			
37	S75			
38	S82a			
39	Q105			
40			A9	
41			I10	
42			S14	
43			P15	
44			G16	
45			E17	

46			T42	
47			S77	
48			A80	
49			E81	
50			A100	
51			K107	
52	A9			
53	L11			
54	R13			
55	A16			
56	S17			
57	P41			
58	Q43			
59	S82b			
60	T83			
61	S84			
62	E85			
63	T108			
64	T110			
65	D1			
66	I2			
67	N58			
68	T71			
70			V54	

Примечание: mAb, выделенные жирным шрифтом, получают, и было показано, что они обладают значительной CD3-связывающей активностью (максимальное связывание составляет более 50% от максимальной антигенсвязывающей активности анти-CD3 mAb дикого типа) после нокина цистеина. Остатки, в которых влияние аминокислотной замены на антигенсвязывающую активность не тестировали, показаны в правильной форме. VH и VL, нумерация по Kabat; CH1 и CL, нумерация EU.

Четыре mAb LC_S26C, LC_S31C, HC_K64C и HC_T120C в каркасе IgG4 HC человека и каппа LC человека экспрессируют в клетках CHO и очищают с помощью хроматографии с белком А и тестируют на связывание CD3 с помощью FACS с использованием клеток Jurkat (фиг. 3B-3E). LC_S31C теряет значительную активность после нокина цистеина (фиг. 3C). LC_S26C, HC_K64C и HC_T120C обладают существенной активностью в отношении связывания CD3 (фиг. 3B и 3D, 3E) и их отбирают для дальнейших исследований. Нокин цистеина также проводят на дополнительных остатках, как показано в табл. 3. Полученные mAb в каркасе IgG4 HC и каппа LC экспрессируют в клетках CHO, очищают с помощью хроматографии с белком А и тестируют на связывание CD3 с помощью FACS с использованием клеток Jurkat. Остатки после нокина цистеина, сохраняющие более 50% максимальной антигенсвязывающей активности анти-CD3 mAb дикого типа, показаны жирным шрифтом в табл. 3, и результаты связывания CD3 с помощью FACS с использованием клеток Jurkat показаны на фиг. 3F, 3G. Остатки, в которых влияние аминокислотной замены на антигенсвязывающую активность не тестируют, показаны в правильной форме (табл. 3).

Пример 2. Характеризация моноклональных антител, конъюгированных с молекулами жирных кислот.

Молекулы FA, использованные для конъюгации, показаны на фиг. 4A, включая C18, C14, C10 и C6. Все молекулы содержат линкер PEG и реагирующую с бромацетамидом группу. Для реакции конъюгации, антитело концентрируют до концентрации 20-30 мг/мл и буфер заменяют на буфер TBS. Антитело частично восстанавливают добавлением 10 экв. трис-(2-карбоксиил)фосфина (ТСЕР), и раствор инкубируют в течение 1 ч при 37°C. Затем антитело заменяют буфером на DPBS и повторно окисляют 30 экв. дегидроаскорбиновой кислоты путем инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). Меняют буфер для антитела на буфер для конъюгации (20 mM Трис, pH 8,5+150 mM NaCl+10% глицерин) и разводят до концентрации 10 мг/мл. Молекулу FA добавляют в количестве 20 экв. из 50 mM раствора в

ДМСО, и полученную смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 1 или 2 дней. Конечный продукт заменяют буфером на буфер для конъюгации для удаления непрореагировавших молекул FA. Образцы очищают с помощью гидрофобной хроматографии и анализируют с помощью жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ/МС). Правильный конъюгат на HC или LC подтверждают с помощью масс-спектрометрии (МС) для каждого конъюгированного mAb (фиг. 4B-4C). Конъюгацию FA с правым сайтом нокина цистеина подтверждают с помощью ЖХ/МС (табл. 4).

Таблица 4

Подтверждение конъюгации FA с правыми сайтами нокина цистеина

mAb+FA	m/z (z=2) (ожд.)	m/z (z=2) (набл.)	m/z (z=3) (ожд.)	m/z (z=3) (набл.)	m/z (z=4) (ожд.)	m/z (z=4) (набл.)
LC_S26C+C1 8	1244,99	1244,15	830,33	829,76		
HC_K64C+C1 8	653,34	651,86				
HC_T120C+C 18			1219,05	1218,93	914,53	914,45
HC_K64C+C6	569,14	568,77				
HC_K64C+C1 0	597,24	596,81				
HC_K64C+C1 4	625,29	624,84				

Примечание: конъюгированные mAb подвергают трипсиновому перевару и анализируют с помощью ЖХ/МС. Для данного конъюгированного mAb, пик, соответствующий пептидному фрагменту с FA, конъюгированной с правильным сайтом нокина цистеина, идентифицируют с помощью ЖХ/МС. m/z, отношение массы к заряду, где m означает массу, z означает количество зарядов; ожд., ожидаемая; набл., наблюдаемая.

C18-конъюгированные mAb тестируют на их способность связываться с клетками Jurkat (которые, как известно, экспрессируют CD3) в отсутствие или в присутствии 50 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA) (фиг. 5A-5C). Клетки Jurkat инкубируют с указанными антителами в буфере HBSS, содержащем 0,1% казеина с BSA или без него, во время стадии связывания первичного антитела, и затем обрабатывают в буфере, не содержащем BSA. Связывание антител количественно определяют с помощью FACS. Демонстрируют связывание неконыгированных mAb с клетками Jurkat, и на связывание не влияет присутствие BSA (фиг. 5A-5C). Конъюгированные mAb все еще способны связываться с клетками Jurkat (фиг. 5A-5C). Связывание конъюгированных mAb с клетками Jurkat ингибируется BSA, что указывает на то, что конъюгированные FA способны связывать BSA, что впоследствии уменьшает антигенсвязывание анти-CD3 mAb. Для подтверждения ингибирующего действия BSA на связывание CD3 конъюгированными mAb, проводят анализ активации Т-клеток с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) от двух разных доноров. PBMC инкубируют с указанными антителами в среде, содержащей несколько концентраций BSA, в течение 16 ч. Активацию Т-клеток оценивают путем измерения экспрессии CD25 с помощью FACS. Поскольку среда содержит 1% FBS, низкий уровень BSA (примерно 0,25 мг/мл по оценке из 1% FBS) присутствует в каждой группе в анализе, что, как ожидается, подавляет активацию Т-клеток конъюгированными mAb до добавления BSA в среду (фиг. 6A-6C). Когда в среду добавляют BSA, наблюдается повышенное ингибирование активации Т-клеток добавленным BSA (фиг. 6A-6C).

Чтобы проверить влияние длины конъюгированной молекулы FA, молекулы C6, C10 и C14 FA конъюгируют с HC_K64C, соответственно. Конъюгацию каждого из FA конкретно с тяжелой цепью каждого mAb подтверждают с помощью ЖХ/МС (фиг. 4C). Конъюгацию FA с каждым сайтом нокина цистеина подтверждают с помощью ЖХ/МС (табл. 4). Конъюгированные mAb тестируют на активацию Т-клеток с использованием PBMC от двух разных доноров, как описано выше (фиг. 7A-7C). Конъюгации C6 и C10 менее эффективны в блокировании связывания CD3 в присутствии более высоких концентраций BSA (фиг. 7A-7B); конъюгация C14 полностью блокирует связывание CD3 в присутствии более высоких концентраций BSA (фиг. 7C). Эти данные показывают, что более длинные молекулы FA, такие как C14 и C18, после конъюгации являются более эффективными в блокировании связывания CD3 через связанную BSA, тогда как более короткие молекулы FA C6 и C10 после конъюгации являются менее эффек-

тивными в блокировании связывания CD3 через связанную BSA. Каждая из этих характеристик может быть использована терапевтически в различных условиях микроокружения опухоли. Например, в зависимости от разных уровней альбумина между микроокружением опухоли и циркулирующей кровью, более длинная или более короткая FA могут быть предпочтительными в качестве конъюгированной молекулы для достижения наилучшего предела эффективности/безопасности *in vivo*.

Характеризация биспецифических антител, конъюгированных с молекулами жирных кислот.

Подход с конъюгацией FA можно использовать для модулирования антигенсвязывающей активности одного из двух плеч биспецифического антитела. Например, биспецифическое антитело может представлять собой анти-ТАА/анти-CD3 Т-клеточный рекрутер, при этом FA конъюгирована с Fab областью анти-CD3 плеча (показанного как плечо Ab1 на фиг. 1B, 1C). В настоящем документе, анти-DLL3 плечо используют в качестве примера анти-ТАА плеча. Последовательности, используемые для конструирования анти-DLL3/анти-CD3 биспецифического антитела (как впервые описано в предварительной заявке на патент США № 63/146334, поданной 5 февраля 2021 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки), используют для введения нокинов цистеина для конъюгации FA. Цистеин нокинируют в положение K64 (область VH; нумерация Kabat) или положение T120 (область CH1; нумерация EU) анти-CD3 плеча анти-DLL3/анти-CD3 биспецифического антитела. Полученные bsAb называют bsAb HC_K64C и bsAb HC_T120C, соответственно, и их последовательности перечислены в табл. 5. Обратите внимание, что bsAb HC_K64C и bsAb HC_T120C имеют одно и то же анти-DLL3 плечо (табл. 5). Биспецифические антитела находятся на каркасе IgG1 HC человека и каппа LC человека со следующими модификациями в Fc области IgG1: HC анти-CD3 плеча имеет мутацию T366W (нумерация EU) для образования "выпуклости", и HC анти-DLL3 плеча имеет мутации T366S, L368A и Y407V, образующие "впадину". Кроме того, цистеиновую мутацию S354C вводят в анти-CD3 HC, и цистеиновую мутацию Y349C вводят в анти-DLL3 HC для стабилизации гетеродимерного спаривания. Кроме того, мутации L234A и L235A вводят в области CH2 как H1, так и H2.

Последовательности областей VH, VL, CH1 и CL
биспецифических антител с нокином цистеина для конъюгации

Наименование области	Последовательность	SEQ ID
		NO:
bsAb HC_K64C, анти-CD3 VH	DIKLQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKKRP GQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSS	15
bsAb HC_K64C, анти-CD3 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVKVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC	16
bsAb HC_K64C, анти-CD3 VL	DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQEKS GTS PKRWIYDTSKVASGVPIRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATY YCQQWSSNPLTFGAGTKLELK	17
bsAb HC_K64C, анти-CD3 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKESTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	18
bsAb HC_T120C, анти-CD3 VH	DIKLQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKKRP GQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSS	19
bsAb HC_T120C, анти-CD3 CH1	ASCKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVKVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC	20
bsAb HC_T120C, анти-CD3 VL	DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQEKS GTS PKRWIYDTSKVASGVPIRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATY YCQQWSSNPLTFGAGTKLELK	21
bsAb HC_T120C, анти-CD3 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKESTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	22
Анти-DLL3	EVRLSQSGGQMKKPGESMRLSCRASGYTFTSYVMHWVREAP	23

VH	GRRPEWIGYINPYNDATKYARKFQGRATLTSKYSDTAFLEL RSLTSDDTAVYYCARGGYDYDGDYWGRGAPVTVSS	
Анти-DLL3 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSCSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVEVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSS	24
Анти-DLL3 VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCHASQNINVWLSWYQKKPGQA PRLLIYKASNLHTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQGQSYPFQFGQGTKVEIK	25
Анти-DLL3 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSCNRGES	26
bsAb HC_K64C, #2 анти-CD3 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKKR PGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQ LSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSS	29
bsAb HC_K64C, #2 анти-CD3 VL	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQEKSGTSP KRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATY YCQQWSSNPFTFGSGTKLEIN	30
bsAb HC_T120C, #2 анти-CD3 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKKR PGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQ LSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYSLDYWGQGTTLTVSS	31
bsAb HC_T120C, #2 анти-CD3 VL	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQEKSGTSP KRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATY YCQQWSSNPFTFGSGTKLEIN	32

Примечание: VH и VL, нумерация Kabat; CH1 и CL, нумерация EU.

Биспецифические антитела bsAb HC_K64C и bsAb HC_T120C временно трансфицируют в клетки ExpiCHO-S, и одновременная экспрессия двух тяжелых цепей и двух легких цепей в одной и той же клетке приводит к экспрессии и сборке желаемого биспецифического антитела и определенных примесей. Стандарты примесей получают путем временной трансфекции с использованием тех же векторов HC и LC по мере необходимости. Биспецифические антитела сначала очищают с помощью хроматографии с белком А. Образцы, очищенные от белка А, рН доводят до конечного рН 5,5 и загружают непосредственно в колонку rogos XS (Thermo) CEX, предварительно уравновешенную 25 мМ фосфатом (рН 5,8) + 210 мМ NaCl. Образцы элюируют линейным градиентом [Буфер А - 25 мМ фосфат (рН 5,8) + 210 мМ NaCl; буфер В - 25 мМ фосфат (рН 8) + 115 мМ NaCl]. Элюированные фракции анализируют с помощью ВЭЖХ с сильным катионным обменом (СКО), и фракции, демонстрирующие полное устранение 2-кратного несоответствия анти-DLL3 LC (гетеродимер HC с анти-DLL3 LC, совпадающий на обоих плечах), объединяют. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ добавляют к объединенным фракциям до конечной концентрации 700 мМ, и образец загружают непосредственно на Butyl Sepharose High Performance (Cytiva) ХГВ (хроматографии гидрофобного взаимодействия) колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ трис (рН 7,5) + 700 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +3% глицерина. Образцы элюируют линейным градиентом [Буфер А - 50 мМ трис (рН 7,5) + 700 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +3% глицерина; буфер В - 50 мМ трис (рН 7,5) + 10% глицерина]. Элюированные фракции анализируют с помощью ВЭЖХ ХГВ, и фракции, демонстрирующие полное устранение 2-кратного несоответствия анти-CD3 LC (гетеродимер HC с анти-CD3 LC, совпадающий на обоих плечах), объединяют в виде очищенного белка. Очищенные биспецифические антитела анализируют тремя различными способами.

Для ВЭЖХ ХГВ, образцы разводят до конечной концентрации 1 мг/мл в буфере, содержащем 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, и 15 мкл вводят непосредственно для анализа ВЭЖХ ХГВ с использованием колонки Agilent

AdvanceBio HIC 4,6×100 мм 3,6 мкм. (PN: 685975-908). Пробы анализируют при скорости потока 1 мл/мин при 30°C с использованием линейного градиента (буфер А - 50 mM Трис pH 7,5+1 M (NH₄)₂SO₄; буфер В - 50 mM Трис pH 7,5+10% глицерина).

Для СКО ВЭЖХ, образцы разводят до конечной концентрации 1 мг/мл в буфере, содержащем 25 mM цитрата, pH 4,5, и 15 мкл вводят непосредственно для анализа СКО ВЭЖХ с использованием колонки Waters Bioresolve SCX mAb 4,6×100 мм, 3 мкм (PN: 18609060). Пробы анализируют со скоростью потока 1 мл/мин при 30°C с использованием линейного градиента (буфер А - 25 mM фосфата, pH 5,8+2% АЦН; буфер В - 25 mM фосфата, pH 8+250 mM NaCl+2% АЦН).

Для эксклюзионной хроматографии (ЭХ) ВЭЖХ, образцы разводят до конечной концентрации 1 мг/мл в PBS, и 8 мкл вводят непосредственно для анализа ЭХ ВЭЖХ с использованием колонки Agilent AdvanceBio SEC 300A 2,7 мкм, 4,6×300 мм (PN: PL1580-5301). Образцы анализируют при скорости потока 0,35 мл/мин с использованием изократного элюирования (буфер - 50 mM фосфата, pH 7,4+300 mM NaCl+5% изопропанола).

Очищенные bsAb анализируют с помощью ХГВ ВЭЖХ, СКО ВЭЖХ и ГЭХ ВЭЖХ (фиг. 8А, 8В и 9А-9В). На фиг. 8А очищенное bsAb HC_K64C отделено от примесей, за исключением 2-кратного ошибочного спаривания анти-DLL3 LC при ХГВ ВЭЖХ; однако при анализе с помощью ВЭЖХ СКО, очищенное bsAb HC_K64C хорошо отделено от 2-кратного ошибочного спаривания анти-DLL3 LC (фиг. 8В). Эти данные показывают, что очищенное bsAb HC_K64C не содержит примесей. Кроме того, очищенное bsAb HC_K64C представляет собой единственный вид при ГЭХ ВЭЖХ (фиг. 8С). Аналогичные наблюдения делают с bsAb HC_T120C (фиг. 9А, 9В), что указывает на высокую чистоту очищенного bsAb HC_T120C.

Очищенные биспецифические антитела bsAb HC_K64C и bsAb HC_T120C конъюгируют с различными молекулами FA. Для конъюгации, биспецифическое антитело с нокином цистеина в положении K64 или T120, концентрируют до концентрации 20-30 мг/мл и буфер заменяют на буфер TBS. Биспецифическое антитело частично восстанавливают добавлением 10 экв. TCEP, и раствор инкубируют в течение 1 ч при 37°C. Затем буфер биспецифического антитела заменяют DPBS и повторно окисляют добавлением 30 экв. дегидроаскорбиновой кислоты, и раствор инкубируют в течение 1 ч при КТ. Буфер конечного образца биспецифического антитела меняют на буфер для конъюгации (20 mM Tris, pH 8,5 + 150 mM NaCl+10% глицерина) и разводят до концентрации 10 мг/мл. Молекулу FA добавляют в количестве 12 экв. из 50 mM раствора в ДМСО и инкубируют полученную смесь при комнатной температуре в течение 1 дня. Буфер конечного продукта заменяли на буфер для конъюгации для удаления непрореагировавших молекул FA, и затем очищают с помощью ХГВ очистки. Очищенные конъюгированные биспецифические антитела анализируют с помощью ХГВ ВЭЖХ (фиг. 10А) и ГЭХ ВЭЖХ (фиг. 10В). Каждое из конъюгированных bsAb проявляется в виде отдельного пика со временем удержания, отличным от времени удержания соответствующего неконъюгированного bsAb (фиг. 10А), что свидетельствует о высокой эффективности конъюгации. Кроме того, каждое конъюгированное bsAb проявляется в виде отдельного пика на ГЭХ ВЭЖХ (фиг. 10В).

Таблица 6

Подтверждение конъюгации FA с bsAbs

bsAb	Расчетная мм	Наблюдаемая мм	Примечания
Родительское bsAb	145307,4	145310,7	Ожидаемая
bsAb HC_K64C	145282,4	145404,8	+ 1 цистеин
bsAb HC_T120C	145309,4	145433,0	+ 1 цистеин
bsAb HC_K64C_C10	145963,3	145967,4	Ожидаемая
bsAb HC_K64C_C14	146019,4	146022,5	Ожидаемая
bsAb HC_K64C_C18	146075,5	146079,1	Ожидаемая
bsAb HC_T120C_C14	146046,4	146051,2	Ожидаемая
bsAb HC_T120C_C18	146102,5	146106,6	Ожидаемая

Примечание: родительское bsAb, анти-DLL3/анти-CD3 bsAb без нокина цистеина; мм, молекулярная масса; + 1 цистеин, ожидается, что один цистеин будет ковалентно связан с нокинированным цистеином, и полученная мм соответствует ожидаемой.

Для оценки активности связывания неконъюгированных и конъюгированных биспецифических антител одновременно с DLL3 и CD3, очищенные биспецифические антитела инкубируют с клетками SHP-77 и клетками Jurkat, которые помечены различными флуоресцентными маркерами. События двойного окрашивания, индуцированные биспецифическим антителом, обнаруживают и количественно определяют с помощью проточной цитометрии. Коротко, клетки Jurkat окрашивают красителем Violet Proliferation Dye 450 (BD, кат: 562158), и клетки SHP-77 окрашивают CFSE (ThermoFisher, кат: 34554) в соответствии

с протоколом производителя. Затем меченые клетки SHP-77 и Jurkat в соотношении 1:1 инкубируют с 2 мкг/мл bsAb в присутствии или в отсутствие 1,5 мкМ блокирующего анти-DLL3 mAb или 1,5 мкМ блокирующего анти-CD3 mAb (фиг. 11). При использовании блокирующих mAb, клетки SHP-77 предварительно обрабатывают 4,5 мкМ блокирующими анти-DLL3 mAb в течение 10 мин при комнатной температуре перед инкубацией с клетками Jurkat при конечной концентрации 1,5 мкМ блокирующих анти-DLL3 mAb, или клетки Jurkat предварительно обрабатывают 4,5 мкМ блокирующего анти-CD3 mAb в течение 10 мин при комнатной температуре перед инкубацией с клетками SHP-77 при конечной концентрации 1,5 мкМ блокирующего анти-CD3 mAb. После инкубации в CO₂ инкубаторе при 37°C в течение 1 ч, клетки фиксируют 2% формальдегидом, один раз промывают TBS, ресуспендируют в буфере FACS (HBSS, 0,1% BSA, 0,05% азида натрия) и затем анализируют с помощью проточной цитометрии (Attune NxT). Поперечное сшивание двух типов клеток в присутствии bsAb обнаруживают на FACS, и сигнал для каждого bsAb (неконъюгированного и конъюгированного) ингибируют блокирующим анти-DLL3 или анти-CD3 mAb (фиг. 11). Эти данные демонстрируют, что неконъюгированные и конъюгированные bsAb могут связываться с двумя разными антигенами одновременно.

Биспецифические антитела также используют для активации Т-клеток в функциональном анализе активации Т-клеток. Используют репортерную клеточную линию люциферазы Jurkat NFAT (BPS Bioscience), которая условно экспрессирует люциферазу светлячка при активации (включая CD3-опосредованную активацию). Репортерные клетки инкубируют с клетками-мишенями SHP-77 в присутствии каждого bsAb (неконъюгированного и конъюгированного) и в присутствии блокирующего анти-DLL3 антитела или без (в конечной концентрации 500 нМ) в течение 22 ч в питательной среде при 37°C в инкубаторе с CO₂. Затем клетки анализируют на активацию с помощью реагента для обнаружения люциферазы и люминометра. Каждое из биспецифических антител индуцирует дозозависимую активацию репортерных клеток при инкубации с клеткой-мишенью SHP-77, и сигнал ингибируется блокирующим анти-DLL3 антителом (версия mAb анти-DLL3 плеча) (фиг. 12A-12B), демонстрируя привлекающую Т-клетки функцию биспецифических антител. Поскольку 0,5% FBS (фетальной бычьей сыворотки) требуется как часть культуральной среды для выживания клеток во время анализа, в анализе присутствует низкий уровень BSA (примерно 0,13 мг/мл по оценке из 0,5% FBS), что, по ожиданиям, приводит к уменьшению сигнала активации Т-клеток с помощью bsAb HC_K64C_C10, bsAb HC_K64C_C14 и bsAb HC_K64C_C18 (фиг. 12A).

Анализ активации Т-клеток с использованием репортерной клеточной линии люциферазы Jurkat NFAT также проводят в присутствии низких и высоких уровней BSA для оценки ингибирующего действия альбумина на функцию активации Т-клеток конъюгированными биспецифическими антителами. Поскольку 0,5% FBS требуется как часть культуральной среды для выживания клеток во время анализа, в каждой группе анализа имеется низкий уровень BSA (примерно 0,13 мг/мл по оценке из 0,5% FBS). Когда к анализу добавляют высокий уровень BSA (конечная концентрация 10 мг/мл BSA в дополнение к 0,5% FBS), активация Т-клеток, индуцированная конъюгированными биспецифическими bsAb HC_K64C_C14 и bsAb HC_K64C_C18, ингибируется по сравнению с контрольной группой (только 0,5% FBS) (фиг. 13A); высокий уровень BSA (10 мг/мл BSA+0,5% FBS) ингибирует активацию Т-клеток, индуцированную конъюгированными биспецифическими bsAb HC_T120C_C14 и bsAb HC_T120C_C18, по сравнению с контрольной группой (только 0,5% FBS) (фиг. 13B). Эти данные показывают, что активность анти-DLL3/анти-CD3 биспецифических антител, конъюгированных с молекулами FA, может модулироваться уровнями BSA. Фиг. 5B показывает, что конъюгация FA с mAb HC_K64C не изменяет связывание конъюгированного плеча с CD3; далее, фиг. 11 показывает, что конъюгация FA с bsAb HC_K64C не приводит к резкому изменению его биспецифической активности, предполагая, что более низкая активность bsAb HC_K64C_C10 на фиг. 13A является следствием низкого уровня BSA, переносимого 0,5% FBS, который требуется как часть культуральной среды. Аналогичные наблюдения сделаны для HC_K64C_C14 и HC_K64C_C18 (фиг. 13A). Эти наблюдения согласуются с данными на фиг. 6B и 7A-7C, которые показывают, что конъюгация FA в положении K64 влияет на связывание анти-CD3 плеча с CD3 гораздо больше, чем в положении T120 в присутствии BSA. Это также согласуется с тем фактом, что BSA, связанная с FA, конъюгированная на K64C, находится ближе к CDR и может более эффективно блокировать связывание антигена-мишени (CD3), чем на T120C.

Проводят анализ ELISA для оценки влияния BSA на антигенсвязывающую активность анти-DLL3 плеча каждого конъюгированного биспецифического антитела. 96-луночный планшет для ELISA покрывают белком DLL3 (Adipogen, кат. №: AG-40B-0151-C010) в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим блокированием 5% BSA в TBST в течение 1 ч при КТ. Планшет промывают 3 раза TBST и предварительно инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч с блокаторами или без них (200 мкг/мл анти-DLL3 F(ab')₂ или 50 мг/мл BSA (Sigma, кат. №: A4612-25G); TBST используют для групп без блокаторов). Затем планшет инкубируют с 1 мкг/мл bsAb в течение 30 мин при КТ в присутствии или в отсутствие 100 мкг/мл анти-DLL3 F(ab')₂ или 50 мг/мл BSA. После инкубации, планшет промывают, и сигнал определяют с помощью конъюгированного с HRP вторичного анти-человеческого IgG антитела (ThermoFisher, кат. №: H10007) и субстрата TMB (ThermoFisher, кат. №: 34029) с использовани-

ем спектрофотометра Envision. На фиг. 14 показано, что BSA оказывает очень незначительное влияние на антигенсвязывающую активность анти-DLL3 плеча каждого конъюгированного bsAb.

Второй набор VH и VL последовательностей анти-CD3 (№2 анти-CD3) (SEQ ID NO:27 и 28, соответственно; нумерация Kabat) также можно использовать для конструирования конъюгированных mAb и bsAb, и они перечислены в табл. 1. Кроме того, модифицированные варианты этих последовательностей также можно использовать для конструирования конъюгированных анти-DLL3/анти-CD3 биспецифических антител (табл. 5), содержащих первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:29, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:30, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:16, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:18; или первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:31, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:32, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:20, и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:22. В каждом из приведенных выше случаев, второе антигенсвязывающее плечо (Ab2) содержит область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:23, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:25, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:24 и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:26. Кроме того, каждое из упомянутых выше первых антигенсвязывающих ветвей (Ab1) можно использовать для конструирования анти-CD3 биспецифических антител и ТАА, отличных от DLL3.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отклонения от их широкой изобретательской концепции. Таким образом, следует понимать, что это изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но предназначено для охвата модификаций в пределах сущности и объема настоящего изобретения, как определено настоящим описанием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH);

б) вариабельную область легкой цепи (VL);

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном-мишенью; аминокислотный остаток в VH, VL или на расстоянии пяти (5) аминокислот от VH или VL на одном или обоих плечах заменен аминокислотным остатком, который конъюгирован с жирной кислотой (FA); при конъюгации с FA на замененном аминокислотном остатке, моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент все еще связываются с антигеном-мишенью; и

FA, конъюгированная с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, способна связывать альбумин, где связывание альбумина с FA приводит к:

(а) частичному или полному блокированию связывания антигена-мишени с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом; и/или

(б) сниженной способности активировать Т-клетки при связывании с альбумином по сравнению с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, не связанным с альбумином;

где замененный аминокислотный остаток представляет собой цистеиновый остаток или лизиновый остаток;

FA выбрана из FA с 6 атомами углерода, 8 атомами углерода, 10 атомами углерода, 12 атомами углерода, 14 атомами углерода, 16 атомами углерода или 18 атомами углерода или любым количеством атомов углерода между ними.

2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где замененный аминокислотный остаток находится в аминокислотном остатке, соответствующем:

(1) остатку 25, 27, 62, 64, 73, 76, 101, 112 или 113 последовательности SEQ ID NO:1, как определено нумерацией Кэбат;

(2) остатку 26, 27, 52, 53, 56 или 67 последовательности SEQ ID NO:2, как определено нумерацией Кэбат;

(3) остатку 119 или 120 последовательности SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12, как определено нумерацией EU или

(4) остатку 121 или 124 последовательности SEQ ID NO:13 или 14, как определено нумерацией EU.

3. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, где замененный аминокислотный остаток находится в аминокислотном остатке, соответствующем:

(1) замене K64C в последовательности SEQ ID NO:1, как определено нумерацией Кэбат;

(2) замене S26C в последовательности SEQ ID NO:2, как определено нумерацией Кэбат, или

(3) замене T120C в последовательности SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12, как определено нумерацией EU.

4. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело против модулятора иммунных клеток (ICM) или его антигенсвязывающий фрагмент и способно специфически связываться с ICM,

необязательно, где ICM выбран из группы, состоящей из CD3, CD27, CD28, CD40, CD122, OX40, CD16, 4-1BB, GITR, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT, VISTA, SIGLEC7, NKG2D, SIGLEC9, KIR, CD91, BTLA, NKp46, B7-H3, SIPR α и других иммунорегуляторных молекул клеточной поверхности.

5. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, где ICM представляет собой CD3, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, с полипептидными последовательностями SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7 и 8 соответственно; или SEQ ID NO:33, 34, 35, 36, 37 и 38 соответственно.

6. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, где замененный аминокислотный остаток находится в аминокислотном остатке, выбранном из:

(1) остатка 25, 27, 62, 64, 73, 76, 101, 112 или 113 с последовательностью SEQ ID NO:1 или 27, как определено нумерацией Кэбат;

(2) остатка 26, 27, 52, 53, 56 или 67 последовательности SEQ ID NO:2 или 28, как определено нумерацией Кэбат;

(3) остатка 119 или 120 последовательности SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12, как определено нумерацией EU; или

(4) остатка 121 или 124 последовательности SEQ ID NO:13 или 14, как определено нумерацией EU.

7. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.4-6, содержащее:

1) область CH1 с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12, с аминокислотной заменой T120C, как определено нумерацией EU, и область CL с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:13 или 14;

2) область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:1 с аминокислотной заменой K64C, как определено нумерацией Кэбат, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:2;

3) область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:27 с аминокислотной заменой K64C, как определено нумерацией Кэбат, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:28;

4) область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:1 и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:2 с аминокислотной заменой S26C, как определено нумерацией Кэбат;

5) область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:27, и область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:28 с аминокислотной заменой S26C, как определено нумерацией Кэбат;

6) область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:1, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:2, область CH1 с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12 с аминокислотной заменой T120C, как определено нумерацией EU, и область CL с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:13 или 14; или

7) область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:27, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:28, область CH1 с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12 с аминокислотной заменой T120C, как определено нумерацией EU, и область CL с полипептидной последовательностью, выбранную из SEQ ID NO:13 или 14.

8. Выделенное мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, где мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одно или несколько антигенсвязывающих плеч, содержащих замененный аминокислотный остаток, который конъюгирован с FA.

9. Мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.8, где мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий первое антигенсвязывающее плечо (Ab1) и второе антигенсвязывающее плечо (Ab2), где Ab1 и/или Ab2 содержат замененную аминокислоту, которая конъюгирована с FA.

10. Выделенное мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9, где мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где Ab1 связывает модулятор иммунных клеток (ICM),

необязательно, где ICM выбран из группы, состоящей из CD3, CD27, CD28, CD40, CD122, OX40, CD16, 4-1BB, GITR, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT, VISTA, SIGLEC7, NKG2D, SIGLEC9, KIR, CD91, BTLA, NKp46, B7-H3, SIPR α и других иммунорегуляторных молекул клеточной поверхности.

11. Выделенное мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9 или 10, где мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где Ab2 связывает опухолеассоциированный антиген (ТАА), необязательно, где ТАА представляет собой DLL3.

12. Выделенное мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.9-11, где мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

1) первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:19, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:21, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:20 и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:22;

2) первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:15, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:17, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:16 и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:18;

3) первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:29, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:30, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:16 и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:18; или

4) первое антигенсвязывающее плечо (Ab1), содержащее область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:31, область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:32, область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:20 и область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:22.

13. Выделенное мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.12, где мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

где второе антигенсвязывающее плечо (Ab2) содержит
область VH с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:23,
область VL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:25,
область CH1 с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:24 и
область CL с полипептидной последовательностью SEQ ID NO:26.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7 или выделенное мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.8-13, где FA содержит линкер для конъюгации с замененным аминокислотным остатком, где линкер выбран из пептидного линкера или полиэтиленгликолевого линкера, необязательно, где пептидный линкер состоит менее чем из 50 аминокислот.

15. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7 и 14.

16. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая выделенное мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.8-14.

17. Вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.15 или 16.

18. Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор по п.17.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7 и 14 или выделенное мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.8-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Способ лечения рака у пациента, где способ включает введение пациенту фармацевтической композиции по п.19.

21. Способ по п.20, где рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

22. Способ получения выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7 и 14, где способ включает:

культивирование клетки по п.18 в условиях продуцирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры и

конъюгацию FA с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом на замененном аминокислотном остатке.

23. Способ получения выделенного мультиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.8-14, где способ включает культивирование клетки по п.18 в условиях продуцирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и

выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры и конъюгацию FA с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом на замененном аминокислотном остатке.

24. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, где способ включает объединение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14 с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

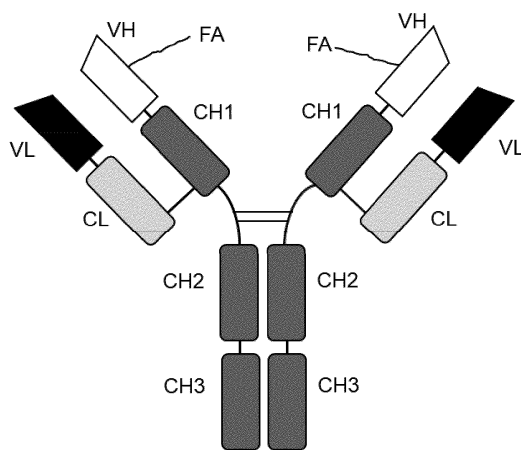
25. Способ частичного или полного блокирования связывания между антигеном-мишенью и антителом или антигенсвязывающим фрагментом, включающий приведение в контакт альбумина с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-14,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны специфически связываться с антигеном-мишенью, FA способна связываться с альбумином, и связывание альбумина с FA приводит к частичному или полному блокированию связывания антигена-мишени с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

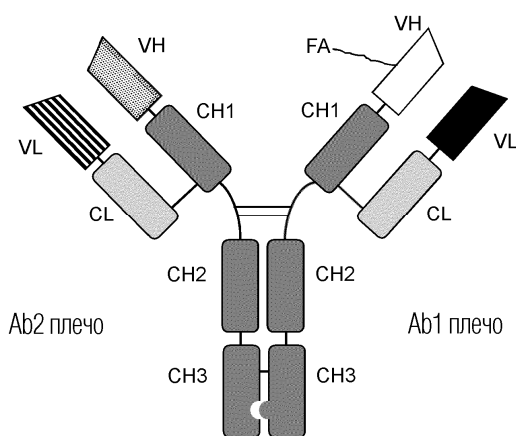
26. Способ по п.25, где стадия приведения в контакт включает введение фармацевтической композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, пациенту, нуждающемуся в лечении опухоли, где опухоль содержит антиген-мишень.

27. Способ по п.25 или 26, где альбумин имеет более высокий метаболизм в микроокружении опухоли по сравнению с циркулирующей кровью и/или присутствует в микроокружении опухоли на уровне ниже, чем уровень альбумина в циркулирующей крови субъекта.

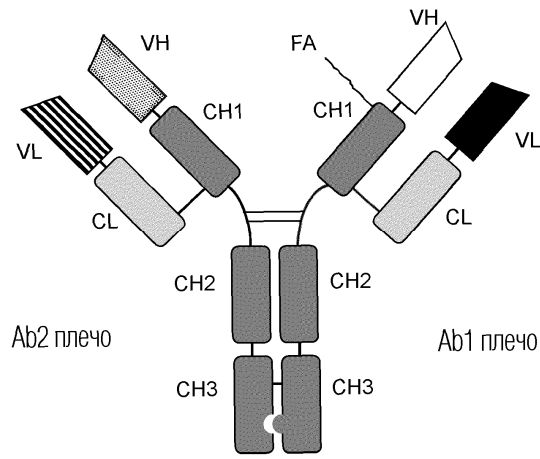
28. Способ по п.27, где более низкий уровень альбумина в микроокружении опухоли обусловлен высоким катаболизмом альбумина в микроокружении опухоли и/или высоким уровнем протеаз в микроокружении опухоли.



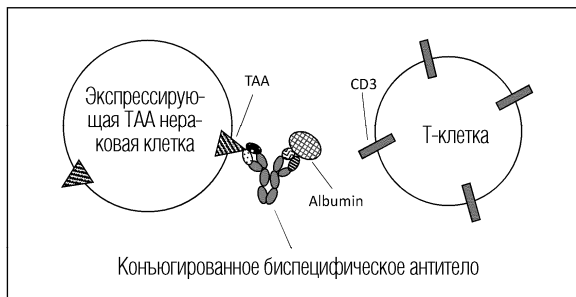
Фиг. 1А



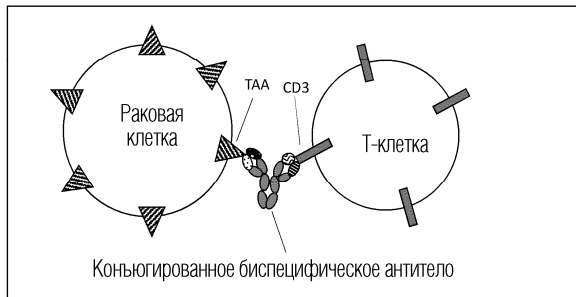
Фиг. 1В



Фиг. 1С

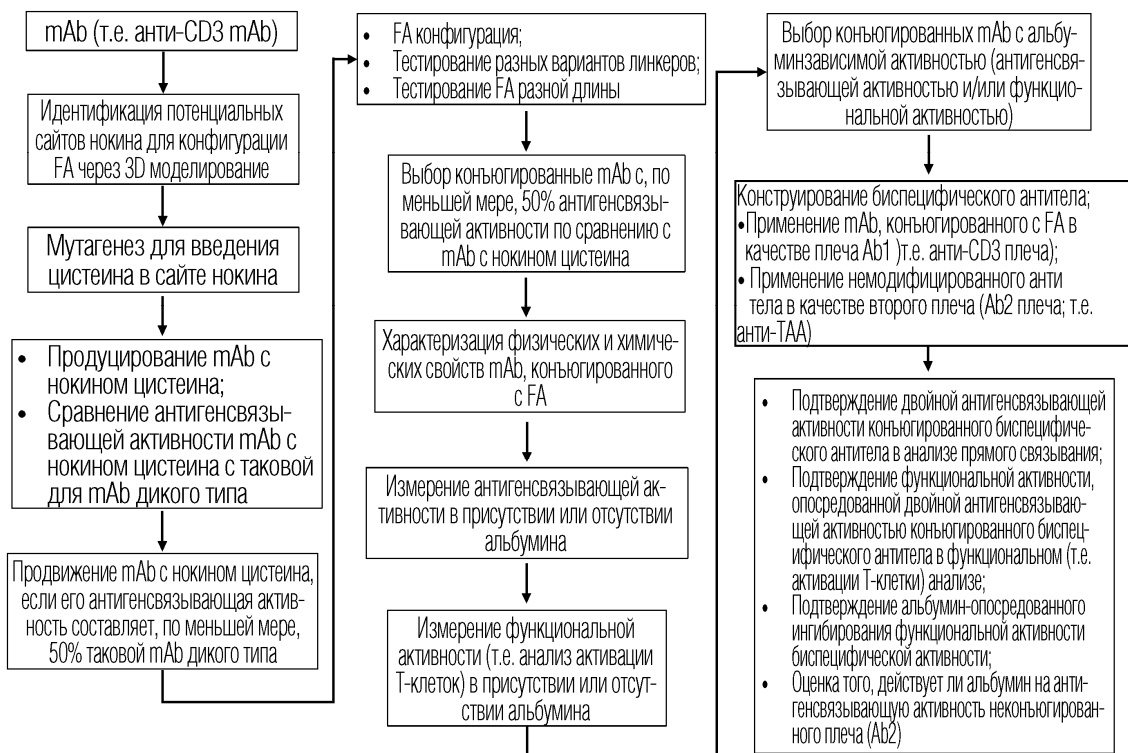


Если уровень альбумина является высоким (т.е. в циркулирующей крови).



В определенной микросреде опухоли, где метаболизм альбумина является высоким, локальный уровень альбумина является низким.

Фиг. 1D



Фиг. 1Е

ОБЛАСТЬ	FR1																							
НОМЕР ПО КАВАТ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
АНТИ-CD3 VH	D	I	K	L	Q	Q	S	G	A	E	L	A	R	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	T

ОБЛАСТЬ	FR1	CDR1										FR2												
НОМЕР ПО КАВАТ	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
АНТИ-CD3 VH	S	G	Y	T	F	T	R	Y	T	M	H	W	V	K	Q	R	F	G	Q	G	L	E	W	I

ОБЛАСТЬ	FR2	CDR2										FR3												
НОМЕР ПО КАВАТ	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
АНТИ-CD3 VH	G	Y	I	N	P	S	R	G	Y	T	N	Y	N	Q	K	F	K	D	K	A	T	L	T	T

ОБЛАСТЬ	FR3																							
НОМЕР ПО КАВАТ	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
АНТИ-CD3 VH	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C

ОБЛАСТЬ	CDR3										FR4												
НОМЕР ПО КАВАТ	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
АНТИ-CD3 VH	A	R	Y	Y	D	D	H	Y	S	L	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S

Фиг. 2А

ОБЛАСТЬ	FR1																							CDR1
НОМЕР ПО КАВАТ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
АНТИ-CD3 VL	D	I	Q	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	P	G	E	K	V	T	M	T	C	R

ОБЛАСТЬ	CDR1										FR2													
НОМЕР ПО КАВАТ	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
АНТИ-CD3 VL	A	S	S		S	V	S	Y	M	N	W	Y	Q	Q	K	S	G	T	S	P	K	R	W	I

ОБЛАСТЬ	FR2	CDR2										FR3												
НОМЕР ПО КАВАТ	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
АНТИ-CD3 VL	Y	D	T	S	K	V	A	S	G	V	P	Y	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S

ОБЛАСТЬ	FR3										CDR3													
НОМЕР ПО КАВАТ	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
АНТИ-CD3 VL	L	T	I	S	S	M	E	A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	W	S	S	N	P	L

ОБЛАСТЬ	CDR3							FR4									
НОМЕР ПО КАВАТ	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
АНТИ-CD3 VL	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K						

Фиг. 2В

ОБЛАСТЬ	CH1																							
НОМЕР ПО ЕУ	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141
IgG1	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A
IgG2	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S	T	A	A
IgG3	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S	T	A	A
IgG4	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S	T	A	A

ОБЛАСТЬ	CH1																							
НОМЕР ПО ЕУ	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
IgG1	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S
IgG2	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S
IgG3	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S
IgG4	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S

ОБЛАСТЬ	CH1																							
НОМЕР ПО ЕУ	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189
IgG1	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P
IgG2	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P*
IgG3	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S*	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P
IgG4	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P

ОБЛАСТЬ	CH1																							
НОМЕР ПО ЕУ	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213
IgG1	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K
IgG2	S	S	N*	F*	G	T	Q	T	Y	T	C	N	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K
IgG3	S	S	S*	L*	G	T	Q	T	Y	T	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K
IgG4	S	S	S	L	G	T	K	T	Y	T	C	N	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K

ОБЛАСТЬ	CH1								
НОМЕР ПО ЕУ	214	215	216	217	218		219	220	
IgG1	K*	V	E	P	K		S	C	
IgG2	T	V	E	R	K		C	C	
IgG3	R	V	E	L	K	T	P	L	G
IgG4	R	V	E	S	K	Y	G		

Фиг. 2С

ОБЛАСТЬ	CL																							
НОМЕР ПО ЕУ	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131
КАПЛА	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S
ЛЯМБДА	Q	P	K	A	A*	P	S*	V	T	L	F	P	P	S	S	E	E	L	Q	A	N	K	A	T

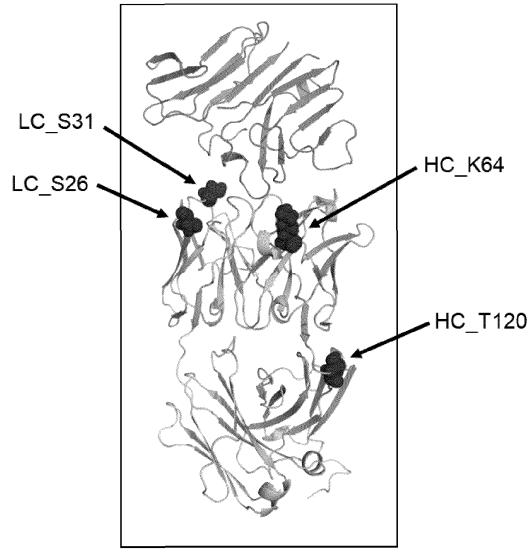
ОБЛАСТЬ	CL																							
НОМЕР ПО ЕУ	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153		154
КАПЛА	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A*		L
ЛЯМБДА	L	V	C	L	I	S	D	F	Y	P	G	A	V	T	V	A	W	K	A	D	S*	S	P	V

ОБЛАСТЬ	CL																							
НОМЕР ПО ЕУ	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178
КАПЛА	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T
ЛЯМБДА	K	A	G			V	E	T*	T	T	P	S	K	Q	S	N	N	K	Y	A	A	S	S	Y

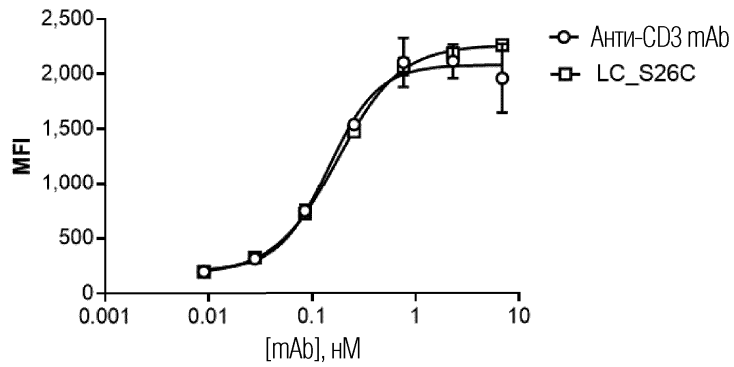
ОБЛАСТЬ	CL																							
НОМЕР ПО ЕУ	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202
КАПЛА	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V*	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S
ЛЯМБДА	L	S	L	T	P	E	Q	W	K	S	H	R*	S	Y	S	C	Q	V	T	H	E	G		

ОБЛАСТЬ	CL											
НОМЕР ПО ЕУ	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214
КАПЛА	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
ЛЯМБДА	S	T	V	E	K	T	V	A	P	T	E	C

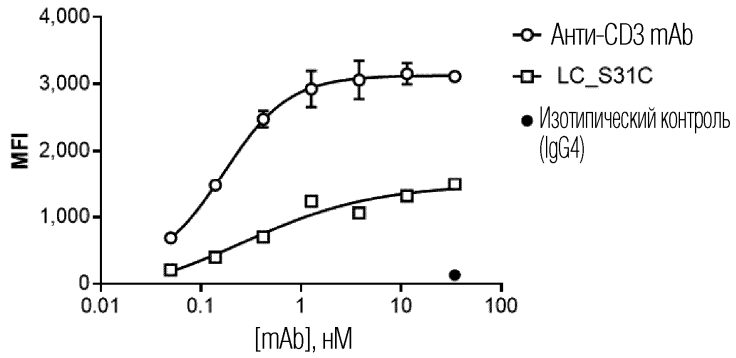
Фиг. 2D



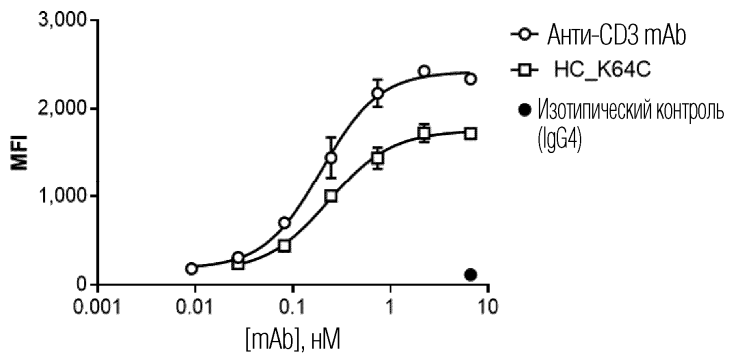
Фиг. 3А



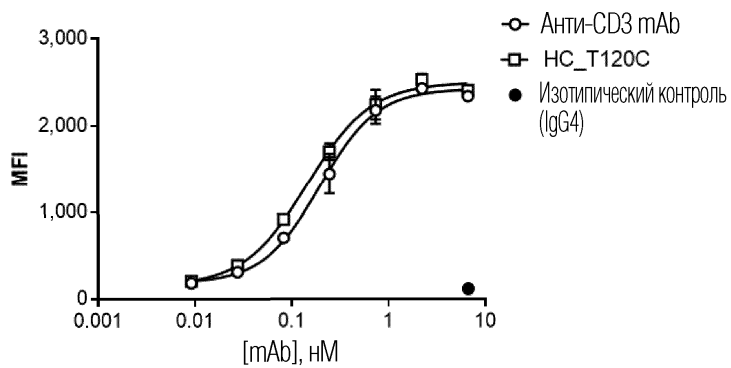
Фиг. 3В



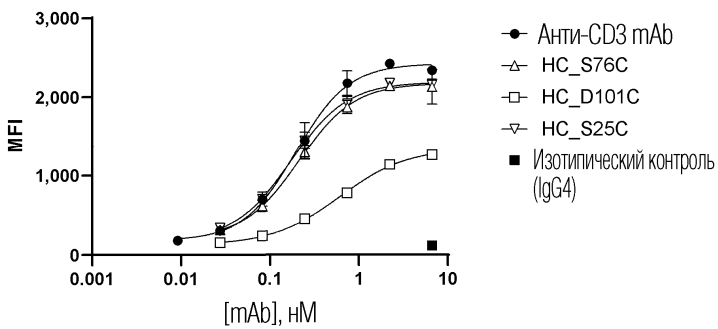
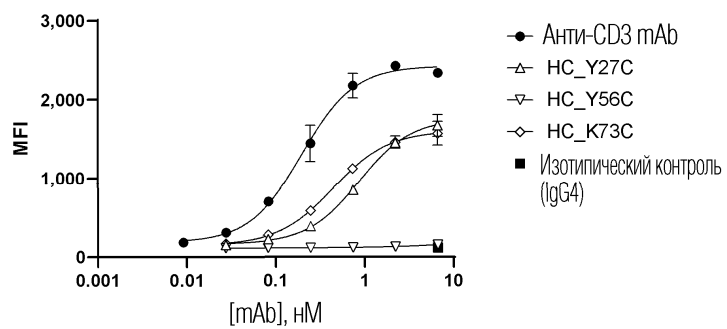
Фиг. 3С

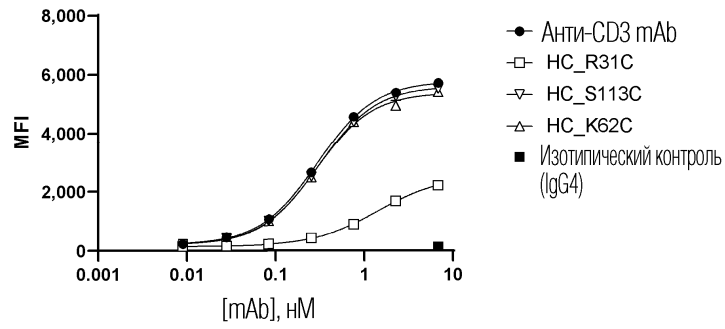
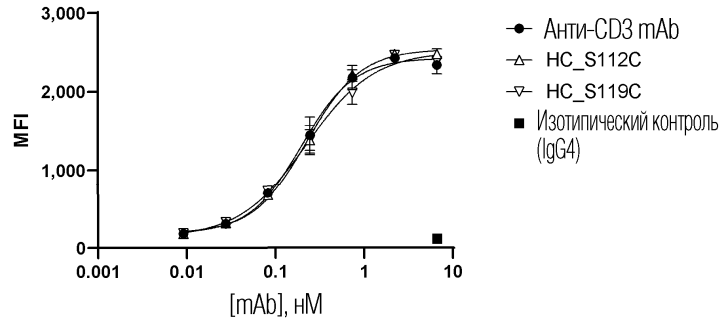


Фиг. 3D

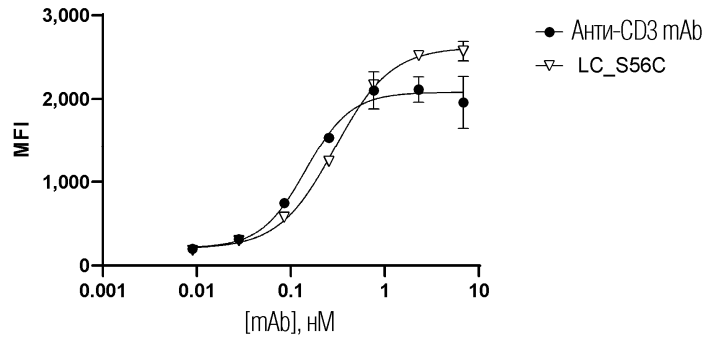
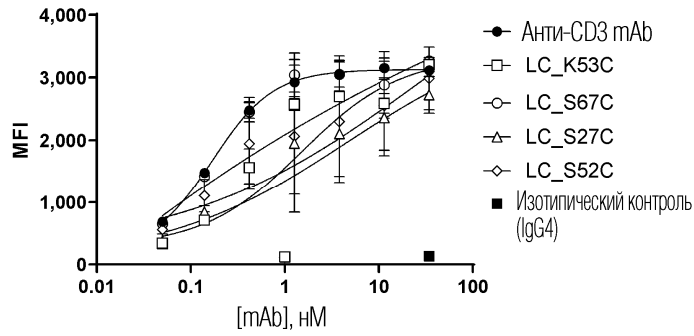


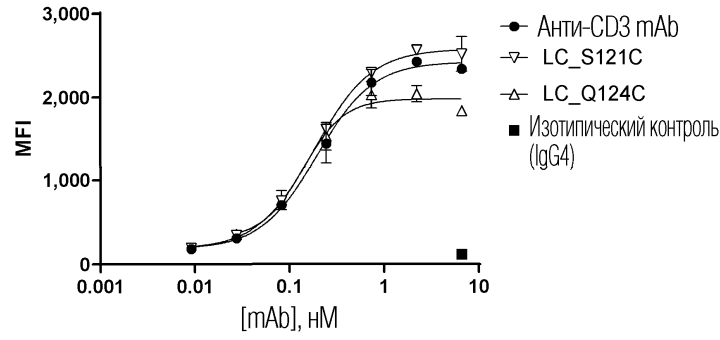
Фиг. 3Е





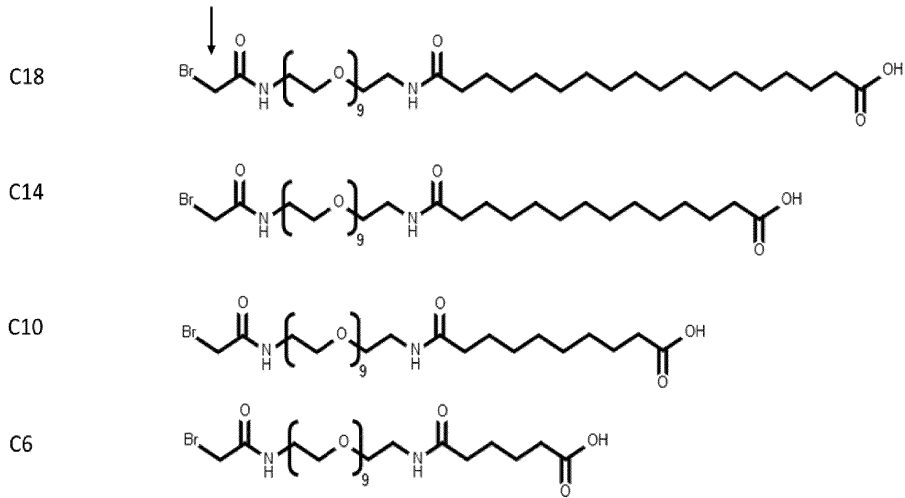
Фиг. 3F



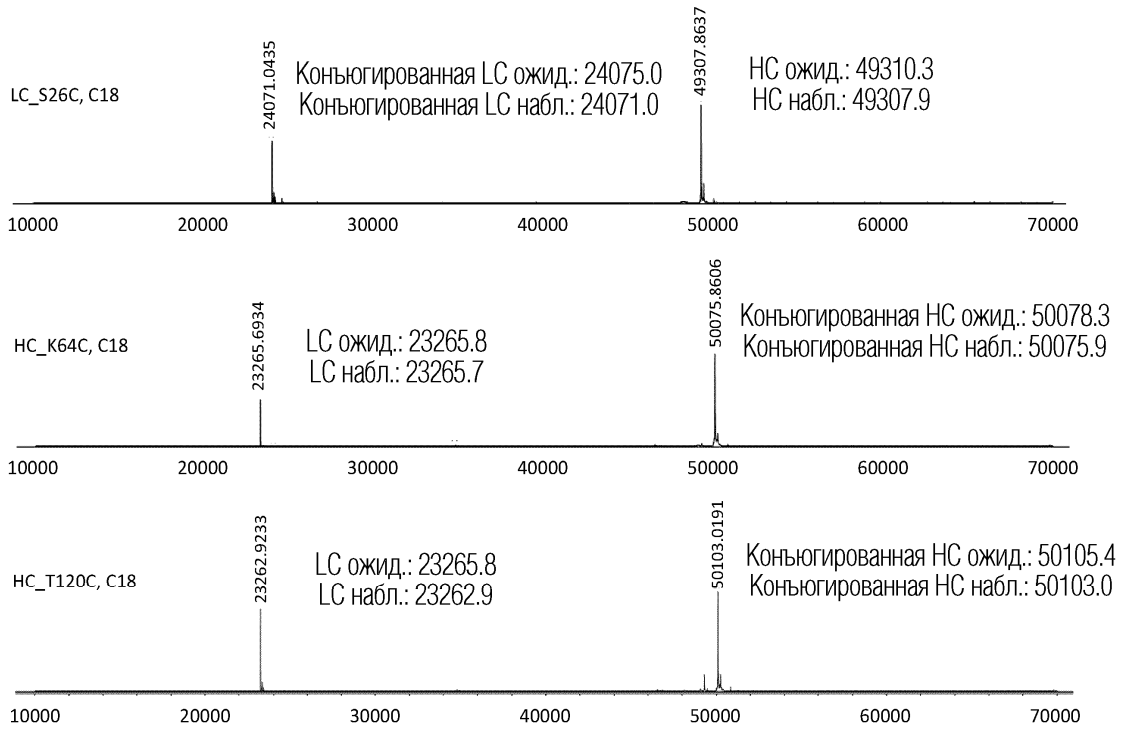


Фиг. 3G

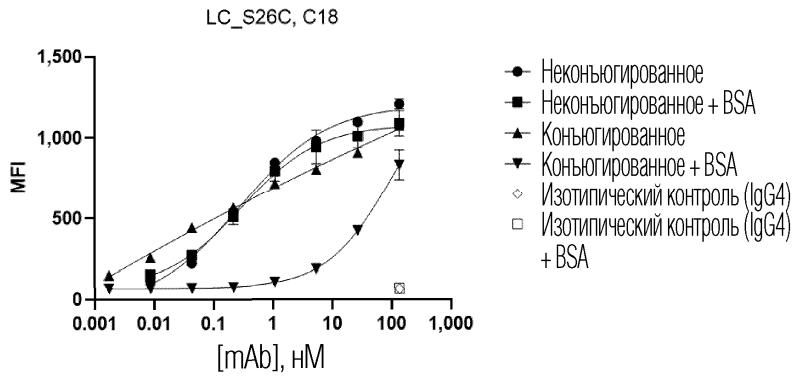
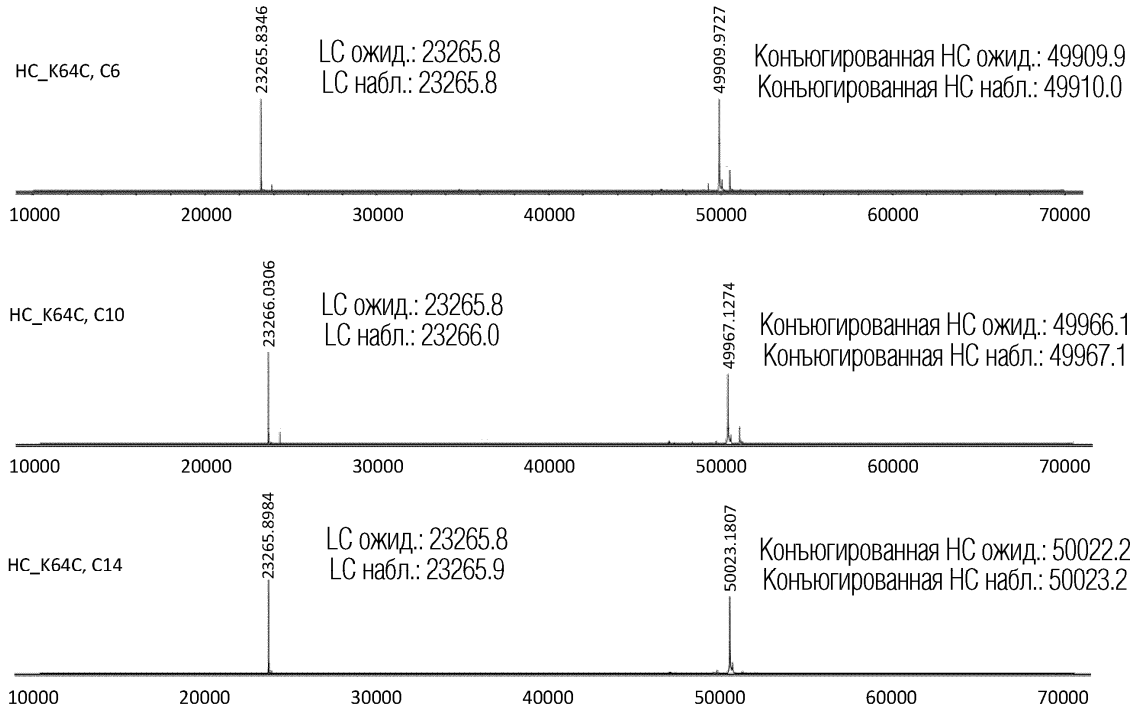
Сайт реакции конъюгирования



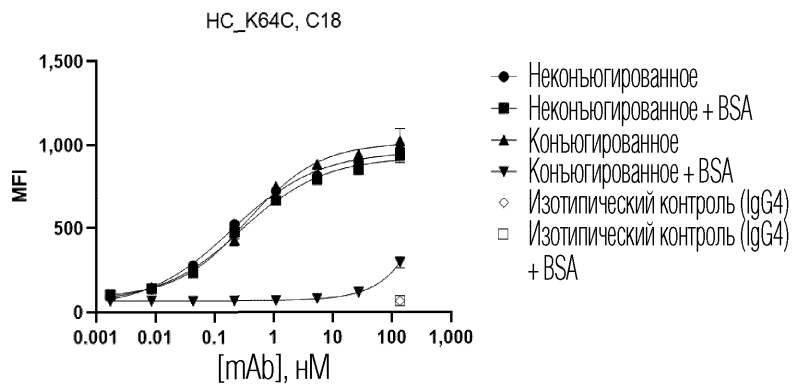
Фиг. 4A



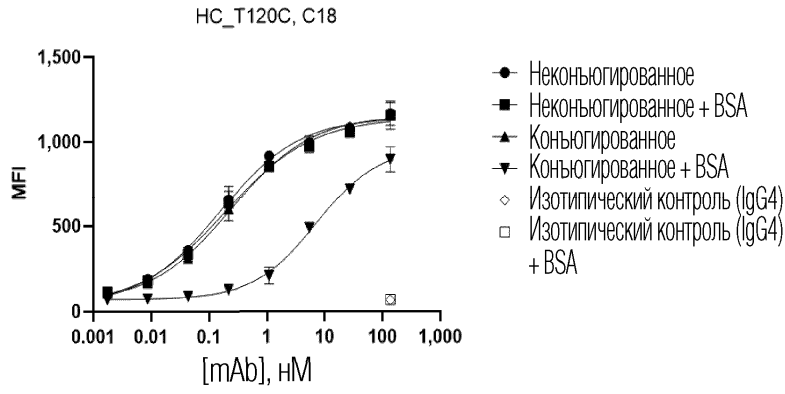
Фиг. 4B



Фиг. 5А

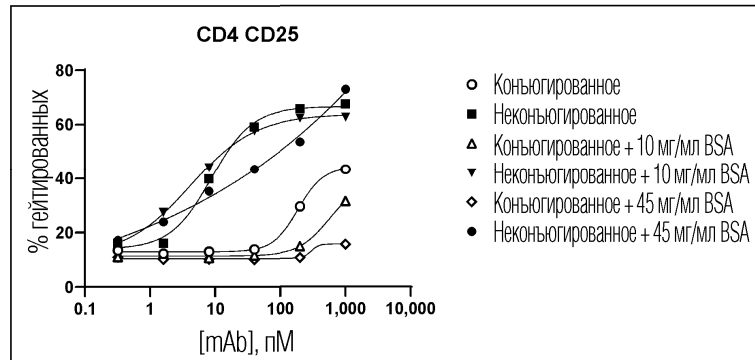
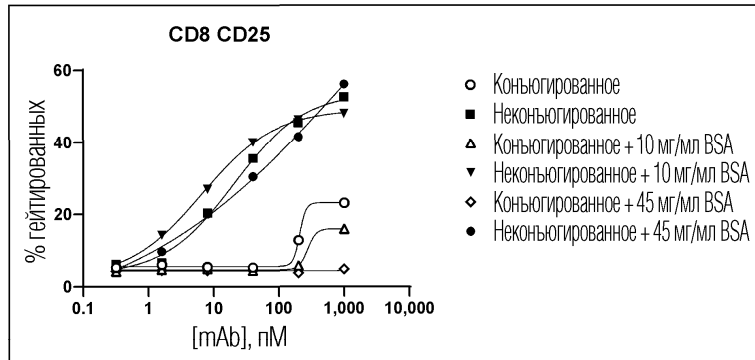


Фиг. 5В

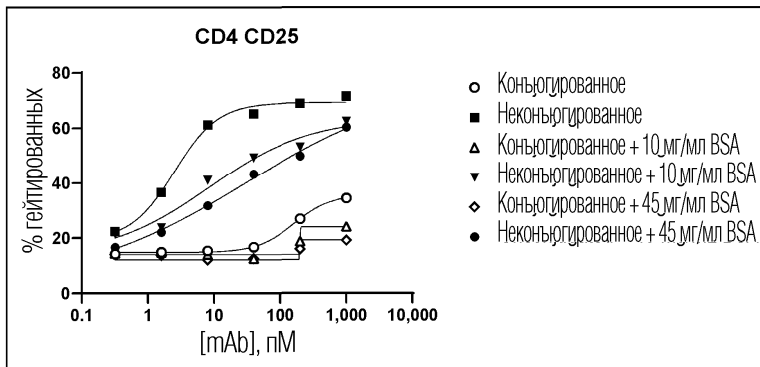
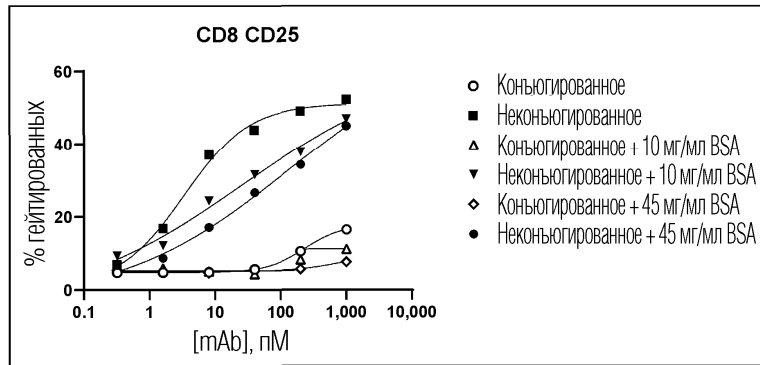


Фиг. 5С

Донор #1 (LC_S26C, C18)

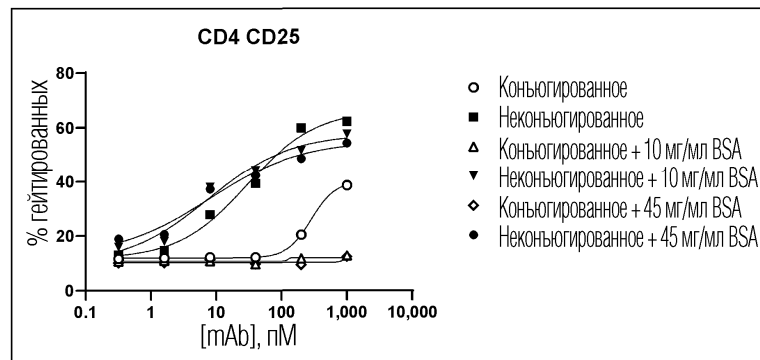
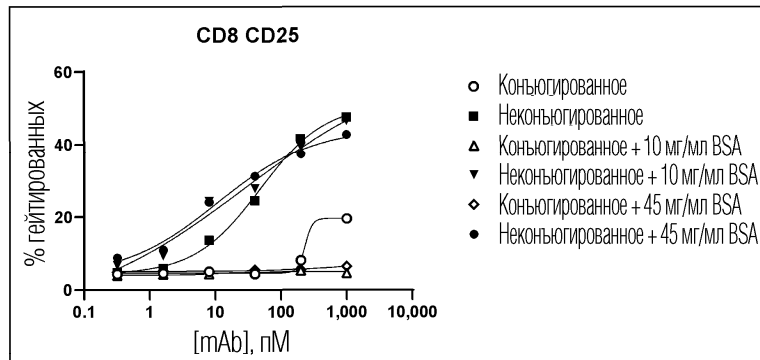


Донор #2 (LC_S26C, C18)

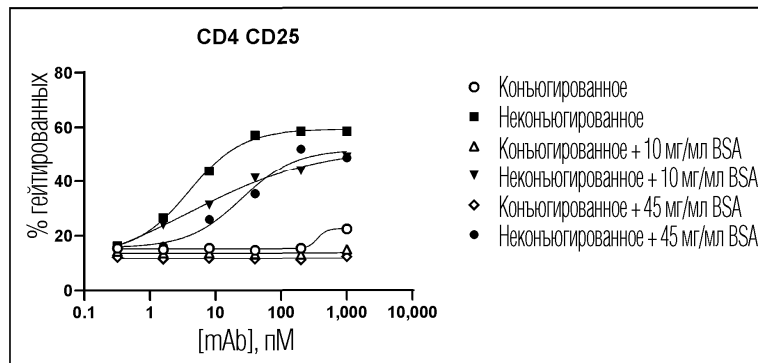
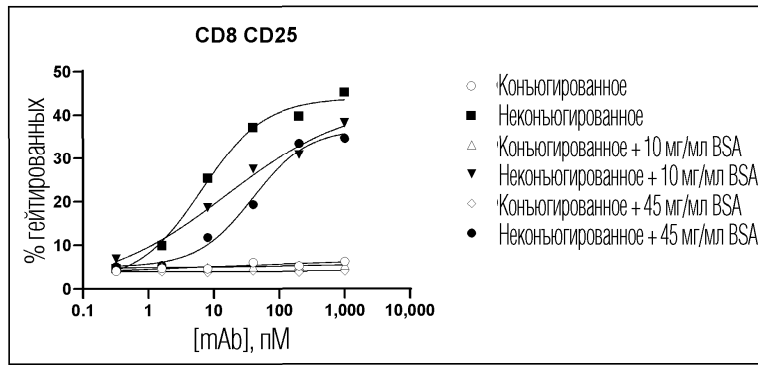


Фиг. 6А

Донор #1 (HC_K64C, C18)

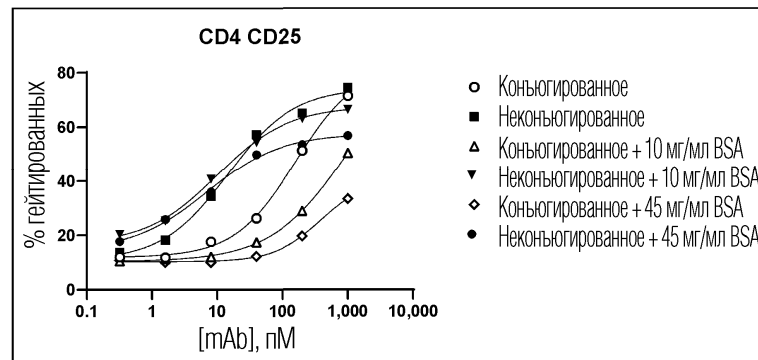
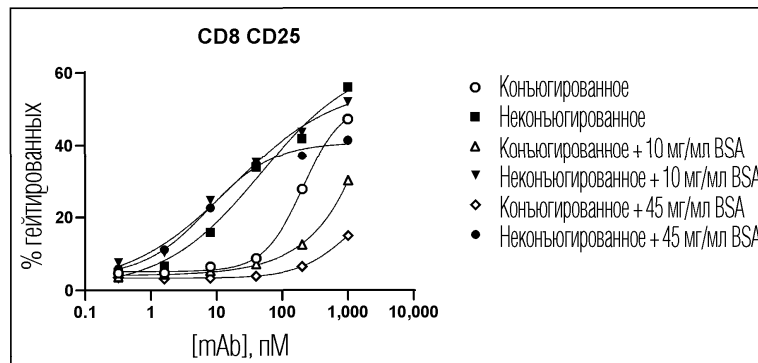


Донор #2 (НС_К64С, С18)

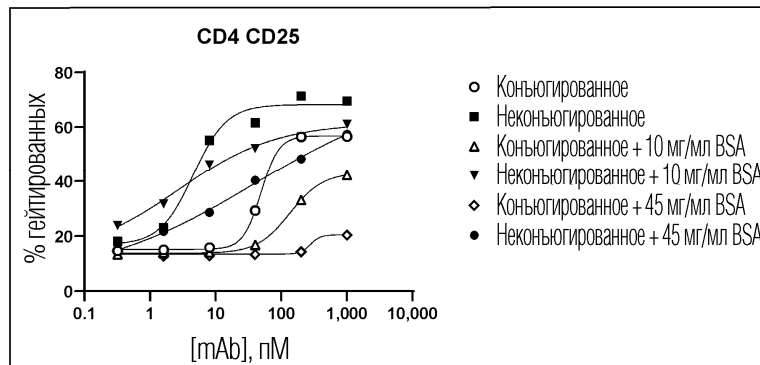
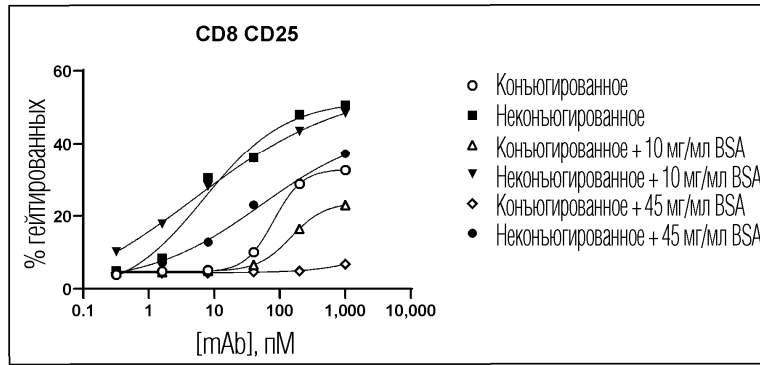


Фиг. 6В

Донор #1 (НС_Т120С, С18)

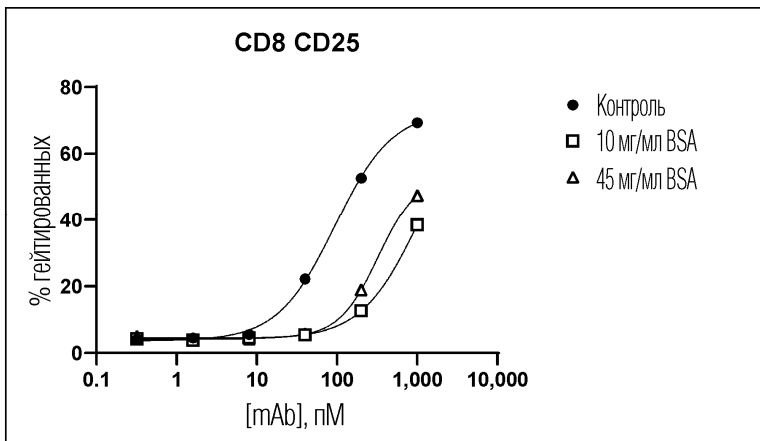
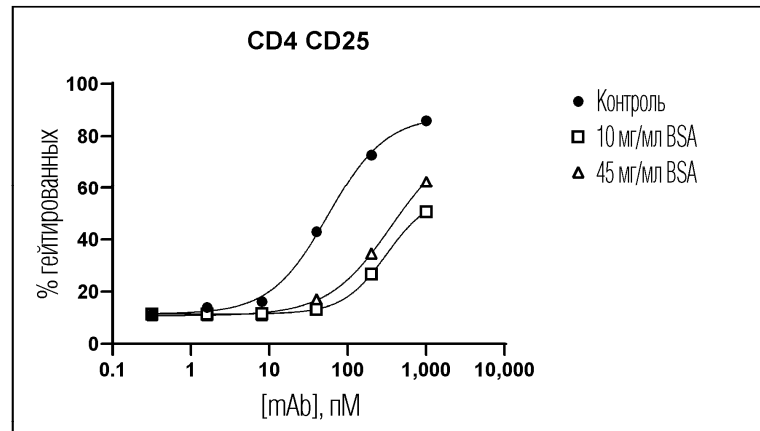


Донор #2 (НС_T120С, С18)

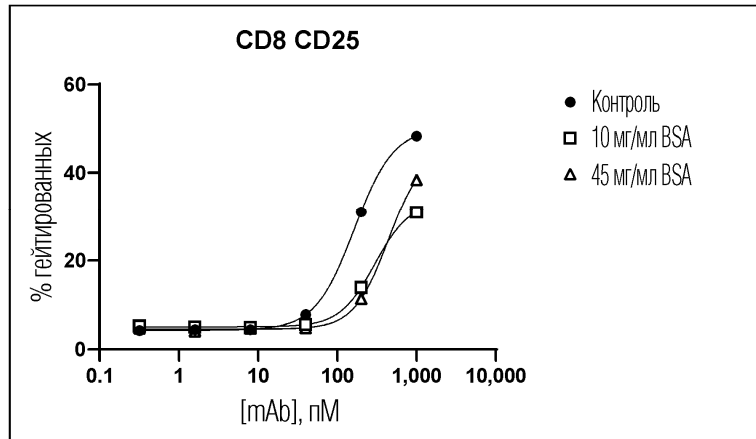
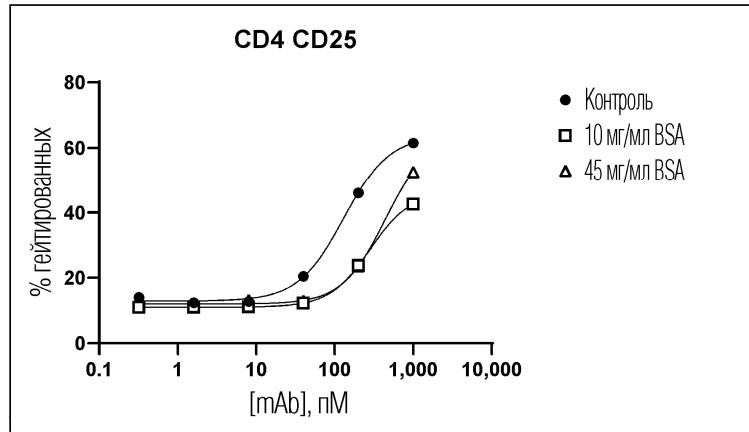


Фиг. 6С

Донор #1 (НС_K64С, С6)

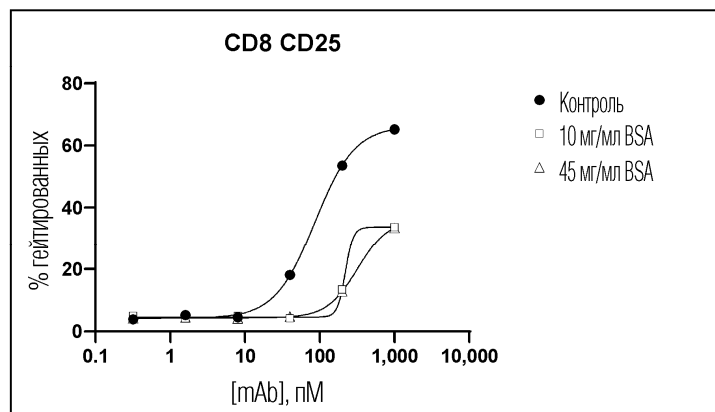
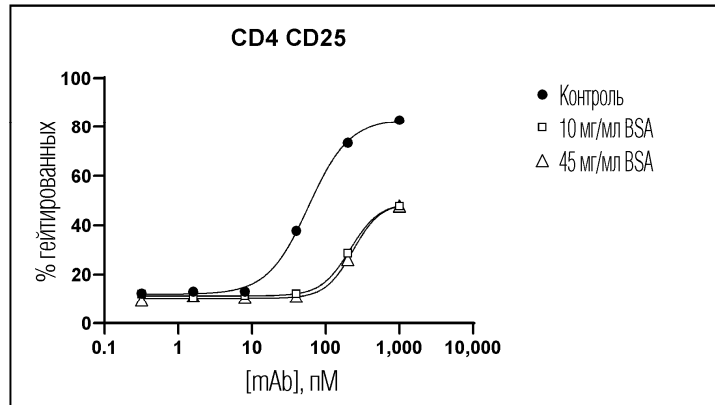


Донор #2 (НС_К64С, С6)

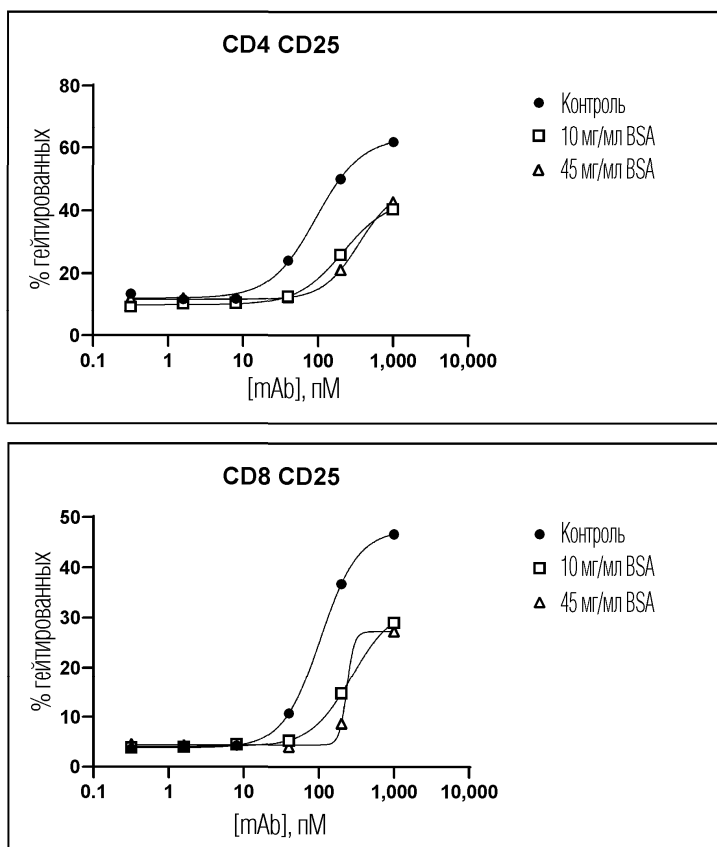


Фиг. 7А

Донор #1 (НС_К64С, С10)

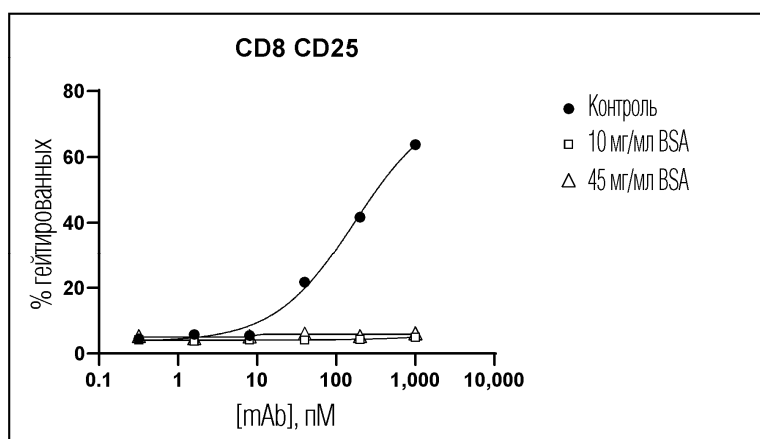
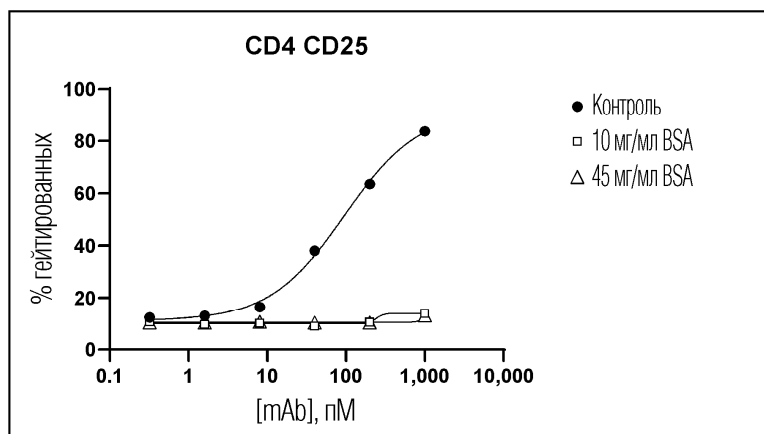


Донор #2 (НС_К64С, С10)

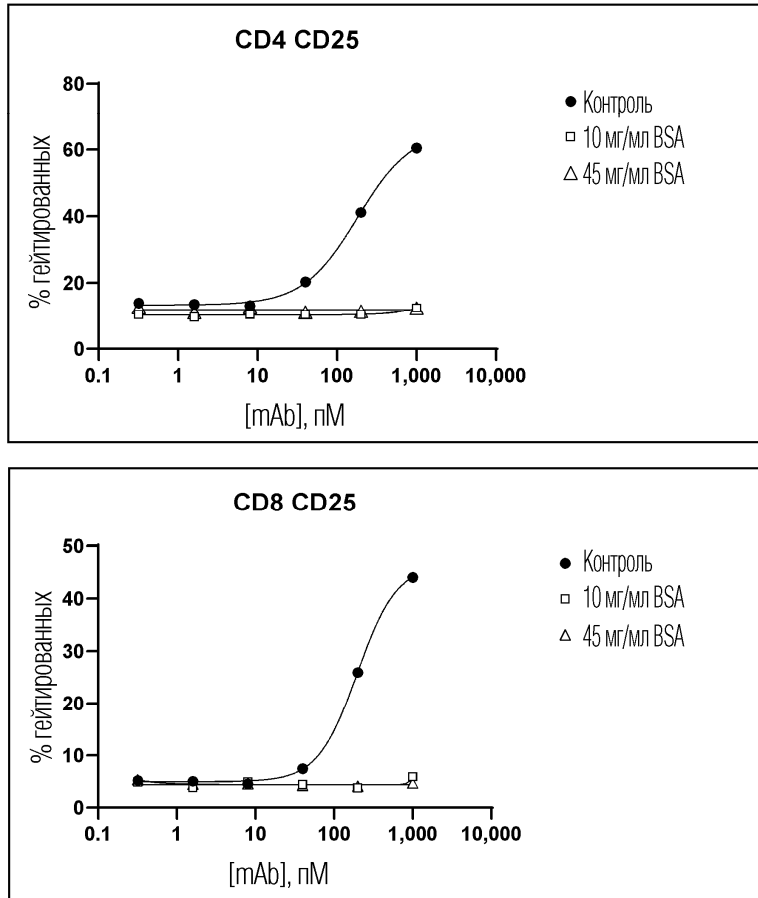


Фиг. 7В

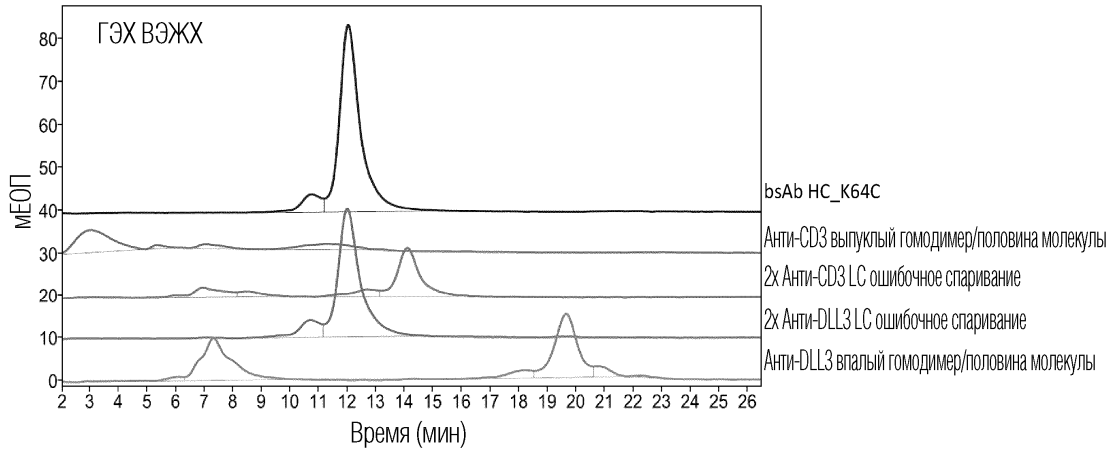
Донор #1 (НС_К64С, С14)



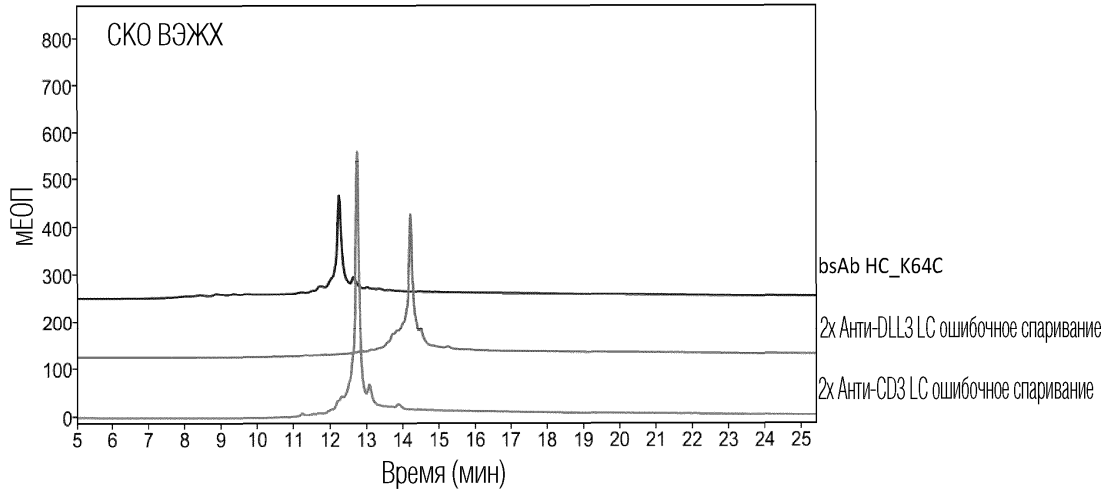
Донор #2 (НС_К64С, С14)



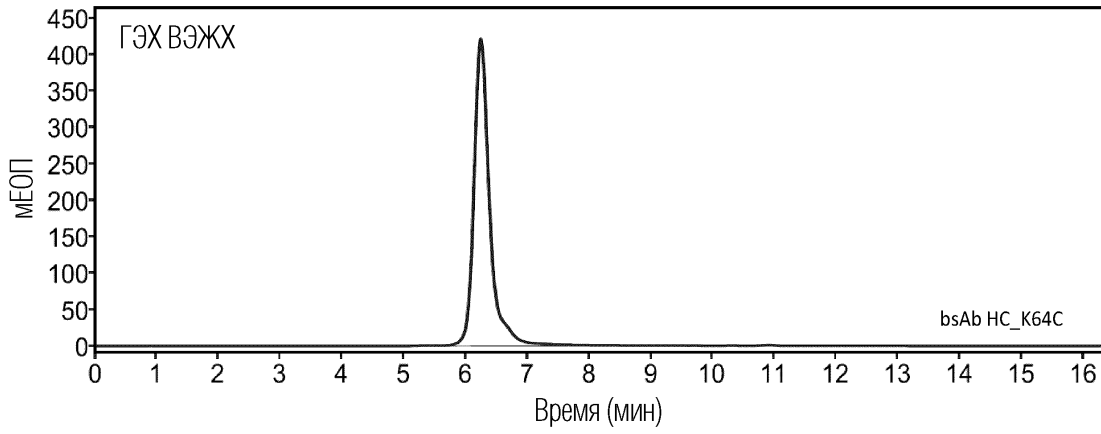
Фиг. 7С



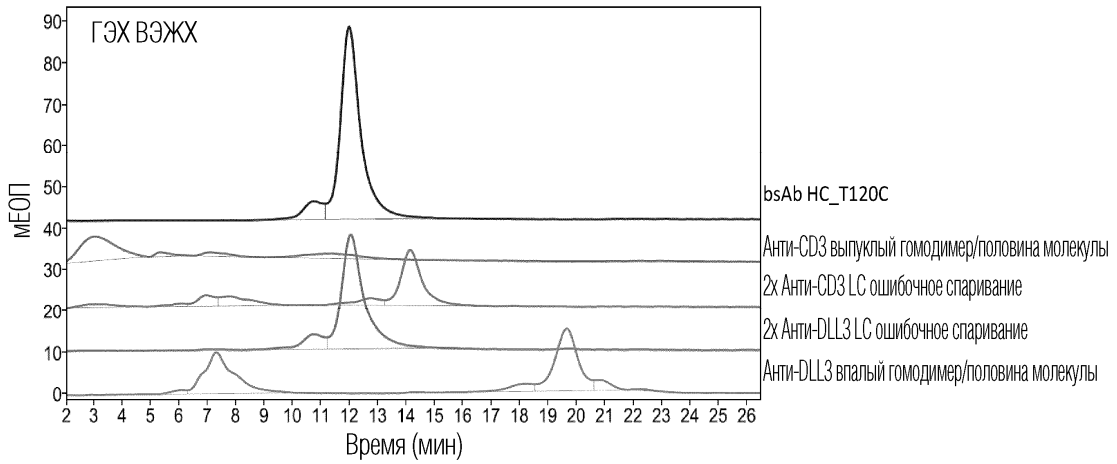
Фиг. 8А



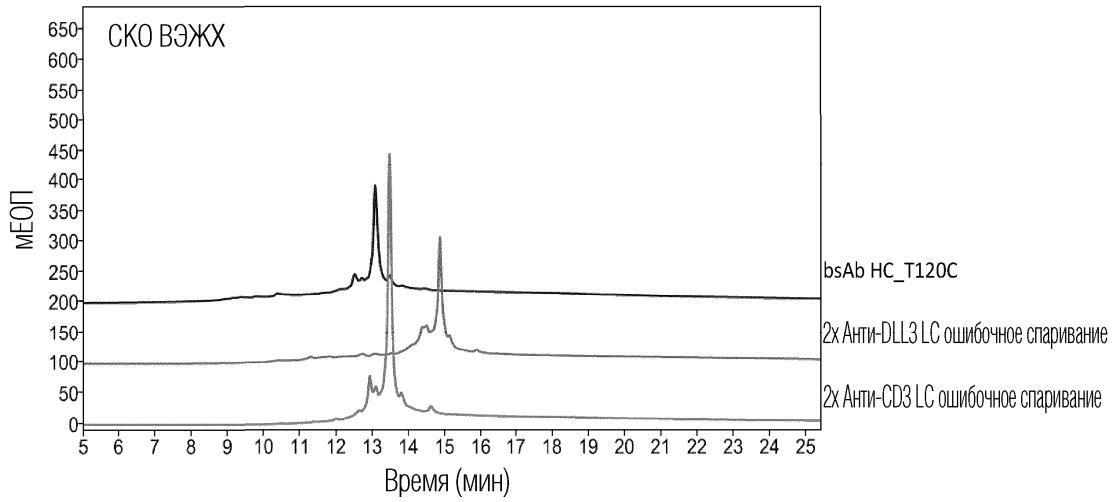
Фиг. 8В



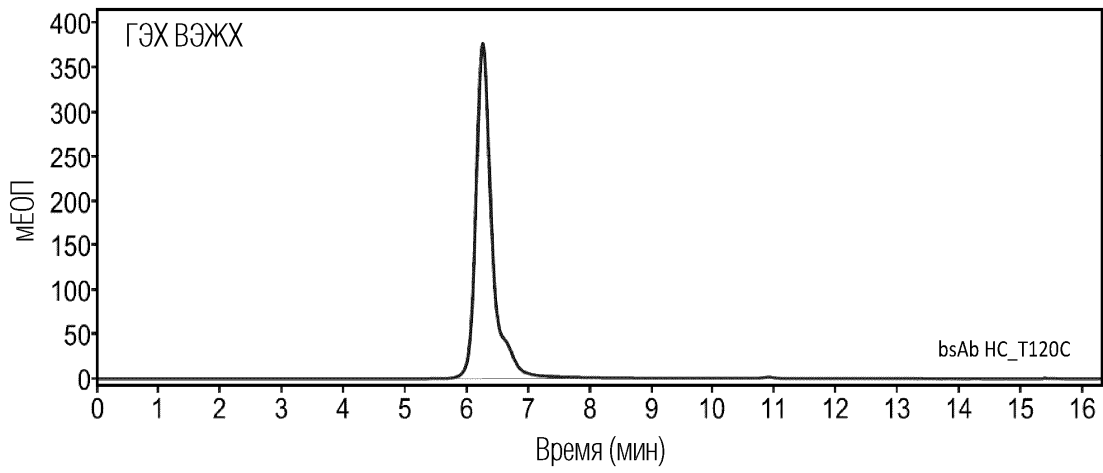
Фиг. 8С



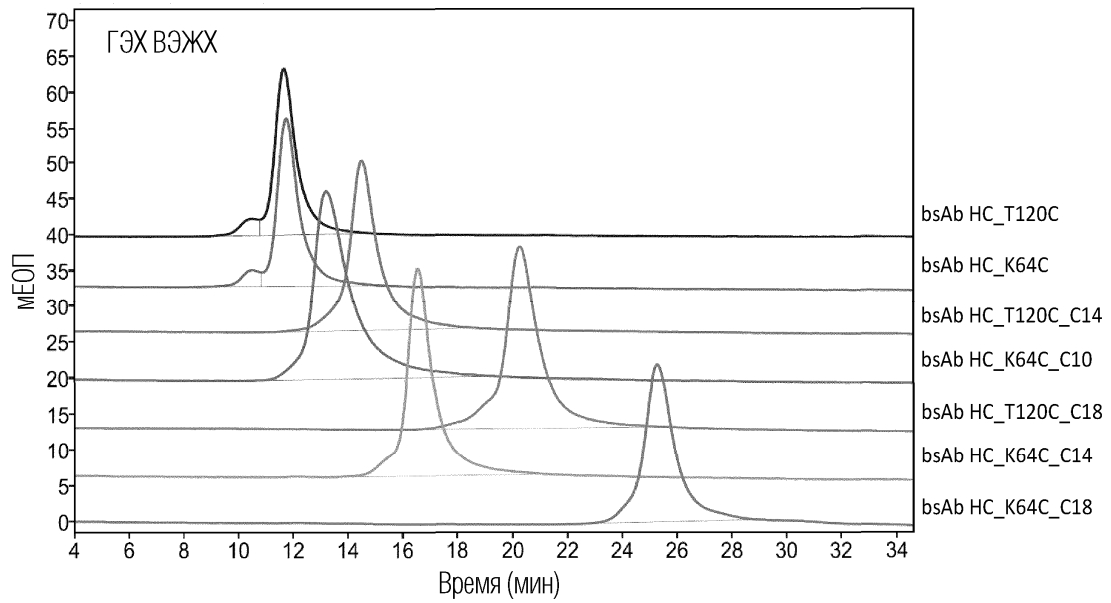
Фиг. 9А



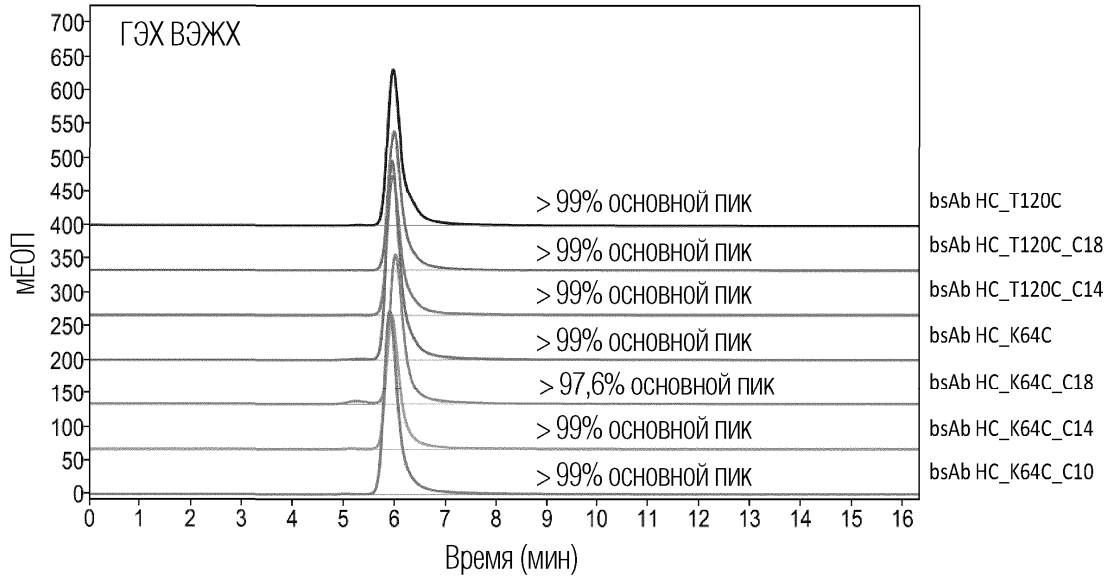
Фиг. 9В



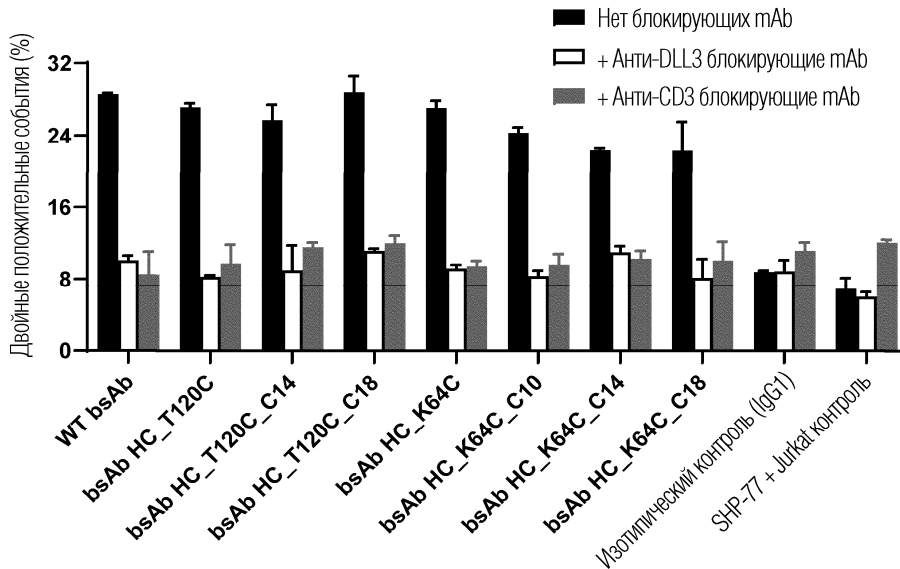
Фиг. 9С



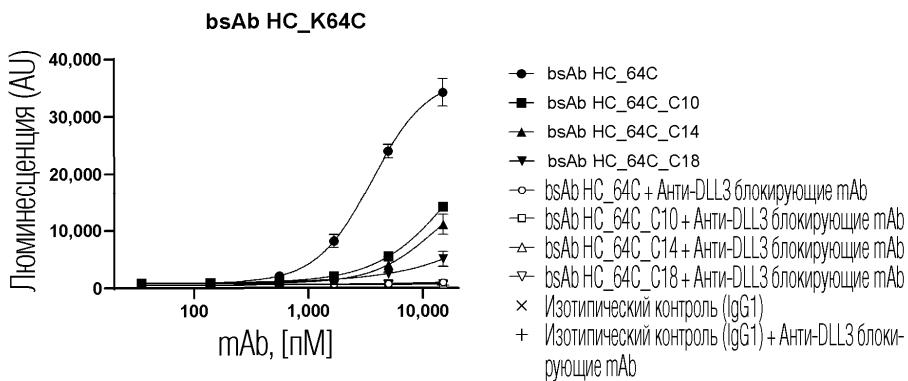
Фиг. 10А



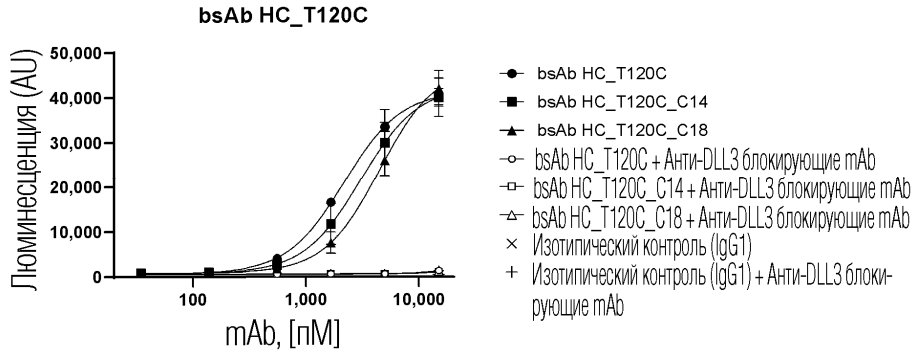
Фиг. 10В



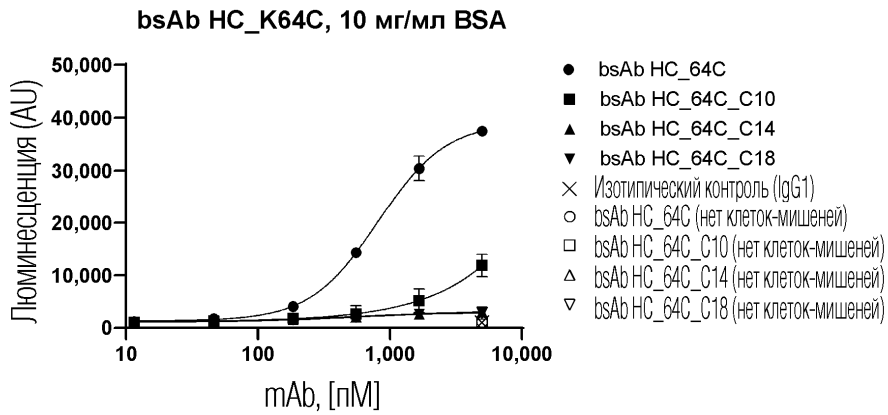
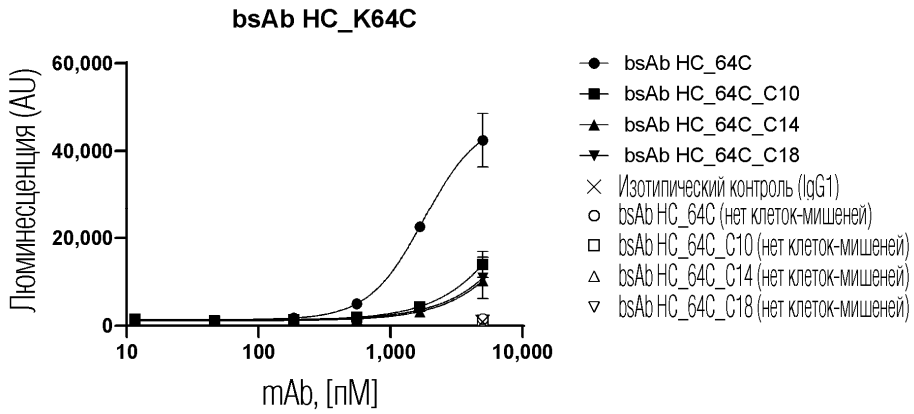
Фиг. 11



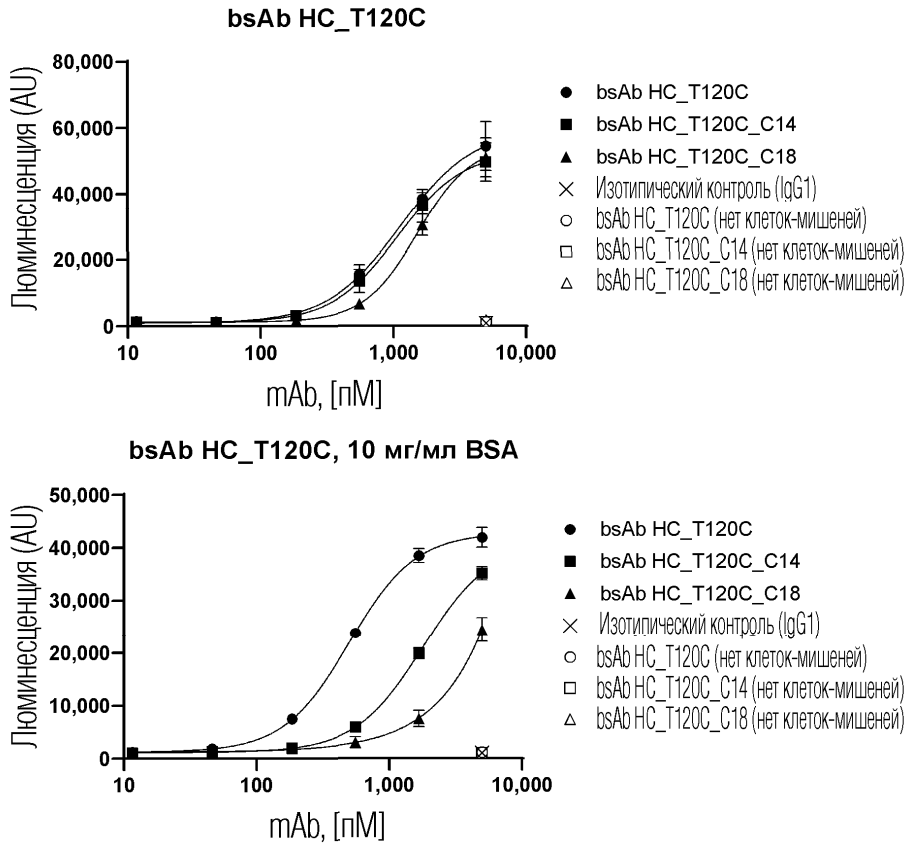
Фиг. 12А



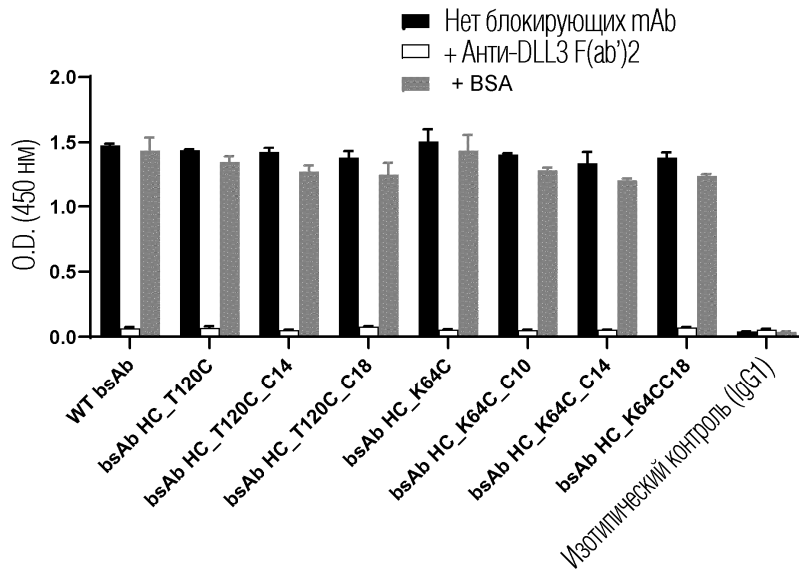
Фиг. 12В



Фиг. 13А



Фиг. 13В



Фиг. 14

