(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 048200 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.11.07

(21) Номер заявки
202190176

(22) Дата подачи заявки
2019.07.02

(51) Int. Cl. ***A61K 39/12*** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК, СВЯЗЫВАЮЩИЙ STEAP1

(31) **62/693,216; 62/800,259**
(32) **2018.07.02; 2019.02.01**
(33) **US**
(43) **2021.08.25**
(86) **PCT/US2019/040296**
(87) **WO 2020/010079 2020.01.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМДЖЕН ИНК.; КСЕНКОР, ИНК (US)

(72) Изобретатель:
Нолан-Стево Оливье, Ли Цун, Мьюроски Кристофер М., Алба Бенджамин М., Аграмал Нирадж Джагдиш, Грэхам Кевин, Стивенс Дженнитт ЛиЭнн, Мур Грегори (US)

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

(56) TAKAHIKO TAMURA ET AL: "Production of Antibodies against Multipass Membrane Proteins Expressed in Human Tumor Cells Using Dendritic Cell Immunization", JOURNAL OF BIOMEDICINE AND BIOTECHNOLOGY, vol. 60, no. 23, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 6568-9, XP055114501, ISSN: 1110-7243, DOI: 10.1155/2009/673098 the whole document

SIMON-PETER WILLIAMS ET AL: "ImmunoPET helps predicting the efficacy of antibody-drug conjugates targeting TENB2 and STEAP1", ONCOTARGET, vol. 7, no. 18, 3 May 2016 (2016-05-03), XP055622544, DOI: 10.18632/oncotarget.8390 the whole document

WO-A2-2008052187
WO-A1-2017147368
WO-A1-2019157340

(57) В настоящем изобретении предусмотрены новые антигенсвязывающие белки, которые связывают STEAP1, фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок, способ лечения рака, включающий введение фармацевтической композиции субъекту, применение антигенсвязывающего белка при получении лекарственного препарата для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный домен легкой цепи и/или вариабельный домен тяжелой цепи антигенсвязывающего белка, вектор экспрессии, содержащий антигенсвязывающий белок, биспецифический антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий белок. Кроме того, представлены гетеродимерное антитело, композиции на основе нуклеиновой кислоты, клетка-хозяин, содержащая указанную композицию, фармацевтическая композиция, содержащая гетеродимерное антитело, способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту гетеродимерного антитела, способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, и применение гетеродимерного антитела при получении лекарственного препарата для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом.

048200 B1

048200 B1

Область техники

В настоящем изобретении предусмотрен новый антигенсвязывающий белок, который связывает эпителиальный антиген 1 предстательной железы с шестью трансмембранными доменами (STEAP1), и пути его применения.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/693216, поданной 2 июля 2018 года, и предварительной заявки на патент США № 62/800259, поданной 1 февраля 2019 года, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Перечень последовательностей

Настоящее изобретение в качестве отдельной части настоящего раскрытия содержит перечень последовательностей в машиночитаемой форме (имя файла: 52601_Seqlisting.txt; размер: 298914 байтов; создан: 27 июня 2019 г.), который включен посредством ссылки во всей своей полноте.

Предпосылки изобретения

Рак предстательной железы остается одной из наиболее распространенных форм рака среди мужчин в США. U.S. Cancer Statistics Working Group. United States Cancer Statistics: 1999-2014 Incidence and Mortality Web-based Report. Atlanta (GA): Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, and National Cancer Institute; 2017. Хотя показатель выживаемости при раке предстательной железы является относительно высоким по сравнению с другими типами рака, существующие варианты лечения сопровождаются риском и нежелательными побочными эффектами. Например, операция сопровождается риском повреждения нервов и импотенции, а лучевая терапия может повысить риск развития форм рака мочевого пузыря или желудочно-кишечного тракта. Традиционная химиотерапия связана со множеством побочных эффектов, которые ограничивают качество жизни пациента во время лечения.

Терапевтические средства на основе антител оказались успешными при лечении множества заболеваний, в том числе рака и аутоиммунных/воспалительных нарушений. Считается, что рак предстательной железы особенно поддается терапии с использованием антител, что по меньшей мере частично объясняется существованием специфических раковых антигенов предстательной железы. Несмотря на недавний прогресс в выяснении биологического механизма, лежащего в основе канцерогенеза, и потенциальных биомаркеров, существует потребность в альтернативных вариантах терапии с использованием антител для лечения рака, в том числе рака предстательной железы.

Краткое описание

В настоящем изобретении предусмотрен антигенсвязывающий белок, который связывает STEAP1 под SEQ ID NO: 2 и содержит: (a) CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые отличаются не более чем на 3, 2 или 1 аминокислоту от i) vhCDR1 под SEQ ID NO: 14, vhCDR2 под SEQ ID NO: 15 или vhCDR2 под SEQ ID NO: 21 и vhCDR3 под SEQ ID NO: 16 или ii) vhCDR1 под SEQ ID NO: 33, vhCDR2 под SEQ ID NO: 34 и vhCDR3 под SEQ ID NO: 35; или (b) CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые отличаются не более чем на 3, 2 или 1 аминокислоту от i) vlCDR1 под SEQ ID NO: 11, vlCDR2 под SEQ ID NO: 12 и vlCDR3 под SEQ ID NO: 13 или ii) vlCDR1 под SEQ ID NO: 30, vlCDR2 под SEQ ID NO: 31 и vlCDR3 под SEQ ID NO: 32; или (c) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 183 или SEQ ID NO: 186; или (d) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 184 или SEQ ID NO: 185. В различных аспектах антигенсвязывающий белок содержит vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 14, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 21, vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 16, vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 11, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 12, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 13. В качестве альтернативы антигенсвязывающий белок содержит vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 33, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 34, vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 35, vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 30, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 31, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 32. В различных аспектах антигенсвязывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 182 или SEQ ID NO: 184, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 183; например, антигенсвязывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 182, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 183, или вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 184, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 183. В качестве альтернативы антигенсвязывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 185, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 186. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен антигенсвязывающий белок, содержащий тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 201, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 200; или тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 203, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 200.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрено гетеродимерное антитело, содержащее первый мономер, содержащий первую тяжелую цепь, содержащую: 1) первый вариабельный домен тяжелой цепи; 2) первую константную область тяжелой цепи, содержащую первый CH1-домен и первый

Fc-домен; и 3) scFv, который связывает CD3 человека и содержит вариабельный домен легкой цепи scFv, линкер scFv и вариабельный домен тяжелой цепи scFv; где указанный scFv ковалентно присоединен между С-концом указанного CH1-домена и N-концом указанного первого Fc-домена с помощью линкера(линкеров) для доменов. Гетеродимерное антитело дополнительно содержит второй мономер, содержащий вторую тяжелую цепь, содержащую второй вариабельный домен тяжелой цепи и вторую константную область тяжелой цепи, содержащую второй Fc-домен; и общую легкую цепь, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. Первый вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи связывают STEAP1 человека, второй вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи связывают STEAP1 человека, и при этом (i) первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые отличаются не более чем на 3, 2 или 1 аминокислоту от vhCDR1 под SEQ ID NO: 14, vhCDR2 под SEQ ID NO: 15 или vhCDR2 под SEQ ID NO: 21 и vhCDR3 под SEQ ID NO: 16, и вариабельный домен легкой цепи содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые отличаются не более чем на 3, 2 или 1 аминокислоту от vlCDR1 под SEQ ID NO: 11, vlCDR2 под SEQ ID NO: 12 и vlCDR3 под SEQ ID NO: 13; или (ii) первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые отличаются не более чем на 3, 2 или 1 аминокислоту от vhCDR1 под SEQ ID NO: 33, vhCDR2 под SEQ ID NO: 34 и vhCDR3 под SEQ ID NO: 35, и вариабельный домен легкой цепи содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые отличаются не более чем на 3, 2 или 1 аминокислоту от vlCDR1 под SEQ ID NO: 30, vlCDR2 под SEQ ID NO: 31 и vlCDR3 под SEQ ID NO: 32; или (iii) первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 182 или SEQ ID NO: 184, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 183; или (iv) первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 185, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 186. В различных аспектах первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат следующие последовательности CDR: vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 14, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 21, и vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 16; и вариабельный домен легкой цепи содержит следующие последовательности CDR: vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 11, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 12, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 13. В различных аспектах первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат следующие последовательности CDR: vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 33, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 34, и vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 35; и вариабельный домен легкой цепи содержит следующие последовательности CDR: vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 30, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 31, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 32. В различных аспектах первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 182 или SEQ ID NO: 184, и вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 183 (например, SEQ ID NO: 182 и 183 или SEQ ID NO: 184 и 183), или первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 185, и вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 186. ScFv содержит CDR, содержащие: vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 170, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 171, vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 172, vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 174, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 175, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 176; или вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 169 и SEQ ID NO: 173.

Также предусмотрены способы лечения рака, такого как рак предстательной железы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, антигенсвязывающего белка, описанного в данном документе.

Заголовки разделов используются в данном документе только для удобства чтения и сами по себе не предназначены для ограничения. Весь документ предназначен для рассмотрения в качестве единого раскрытия, и следует понимать, что предусмотрены все комбинации описанных в данном документе признаков.

Если в данном документе не определено иное, научные и технические термины, используемые в рамках настоящего изобретения, будут иметь значения, которые общеизвестны рядовым специалистам в данной области. Кроме того, если контекст не предусматривает иное, термины в единственном числе будут включать их формы во множественном числе, а термины во множественном числе будут включать их формы в единственном числе. Термины "предусматривающий", "имеющий", "включающий" и "содержащий" следует истолковывать как открытые термины, если не указано иное. Если аспекты настоящего изобретения описаны как "содержащие" признак, варианты осуществления также рассматриваются как "состоящие из" или "состоящие по существу из" признака. Применение любых возможных примеров или иллюстративных формулировок (например, "такой как"), предусмотренных в данном документе, предназначено исключительно для лучшей иллюстрации настоящего изобретения и не накладывает ог-

раничений на объем настоящего изобретения, если не заявлено иное. Ни одна формулировка в настоящем описании не должна толковаться как указывающая на какой-либо незаявленный элемент как существенный для практической реализации настоящего изобретения. За исключением рабочих примеров или в случае, когда указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов или условия реакций, применяемые в данном документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях с помощью термина "приблизительно" таким образом, как этот термин будет интерпретироваться специалистом в соответствующей области техники.

Предусматривается, что упоминание диапазонов значений в данном документе служит исключительно в качестве способа сокращения отдельного указания каждого отдельного значения, входящего в данный диапазон, и каждой конечной точки, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение и конечная точка включены в настоящее описание, как если бы они были отдельно упомянуты в данном документе.

Как правило, терминология и методики, относящиеся к культивированию клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетике, химии белков и нуклеиновых кислот, производству, составлению, фармакологии и медицине, которые описаны в данном документе, хорошо известны и широко применяются в данной области техники. Способы и методики из настоящего изобретения в целом осуществляются в соответствии с традиционными способами, общеизвестными в данной области техники и описанными в различных общих и более специализированных литературных источниках, которые цитируются и обсуждаются на протяжении всего настоящего изобретения, если не указано иное. См., например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), и Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), которые включены в данный документ посредством ссылки. Ферментативные реакции и методики очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как обычно выполняется в данной области техники или как описано в данном документе. Терминология, используемая применительно к аналитической химии, синтетической органической химии, а также медицинской и фармацевтической химии, и лабораторные процедуры и методики, относящиеся к ним, которые описаны в данном документе, хорошо известны и широко применяются в данной области техники. Стандартные методики можно применять для химических синтезов, химических анализов, получения, составления и доставки фармацевтических средств, а также лечения пациентов. Процент идентичности рассчитывается с использованием методологии, обычно используемой в данной области техники, включая методологию, описанную, например, в публикации заявки на патент США № 2017/0342155, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и, в частности, в отношении параграфов [0075]-[0083].

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображено биспецифическое антитело по настоящему изобретению.

На фиг. 2 изображена последовательность эпсилон-цепи CD3 человека (SEQ ID NO: 1).

На фиг. 3 изображена последовательность STEAP1 человека (SEQ ID NO: 2). Подчеркнуты последовательности внеклеточных петель.

На фиг. 4A-4E изображены применимые пары наборов вариантов гетеродимеризации (включая асимметричные и pi-варианты).

На фиг. 5 изображен перечень константных областей изостерических вариантов антител и их соответствующих замен. pI_(-) обозначает варианты с более низким значением pI, тогда как pI_(+) обозначает варианты с более высоким значением pI. Они могут необязательно и независимо комбинироваться с другими вариантами гетеродимеризации по настоящему изобретению (а также с другими типами вариантов, как описано в данном документе).

На фиг. 6 изображены применимые варианты с устранением связывания, в которых устранено связывание с FcγR (которые иногда называются вариантами с "нокаутом" или "KO").

Фиг. 7 описывает два варианта осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 8A и 8B изображены применимые линкеры, в том числе заряженные линкеры scFv и линкеры для доменов, которые можно использовать в форматах антигенсвязывающих белков и гетеродимерных антител, предусмотренных в данном документе. Заряженные линкеры в различных аспектах настоящего изобретения применимы для, например, увеличения или уменьшения pI гетеродимерных антител, в которых в качестве компонента используется один или несколько scFv. Один линкер scFv с единичным зарядом из предшествующего уровня техники упоминается как "Whitlow" из Whitlow et al., Protein Engineering 6(8): 989-995 (1993). Данный линкер использовали для снижения агрегации и повышения протеолитической стабильности в scFv.

На фиг. 9 изображен перечень сконструированных гетеродимерных асимметричных Fc-вариантов с выходом гетеродимеров (определенным с помощью HPLC-CIEX) и показателями термостабильности (определенными с помощью DSC). Не определенная термостабильность обозначена "n.d.". Дополнительная информация представлена в патенте США № 9822186, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

На фиг. 10A и 10B изображены оптимизированные по стабильности гуманизированные варианты scFv, связывающиеся с CD3. Замены указаны по отношению к последовательности scFv H1_L1.4. Нумерация аминокислот представляет собой нумерацию по Kabat. Отмечены специфические вариабельные области легких цепей и вариабельные области тяжелых цепей; перечисленные замены могут быть использованы для вариабельных областей легких цепей и вариабельных областей тяжелых цепей, отличных от конкретно перечисленных. Дополнительная информация представлена в международной публикации заявки на патент № 2017/091656, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

На фиг. 11A и 11B показано специфическое выявление STEAP1 на поверхности клеток C4-2B-luc с помощью мышиного антитела Ab-Am к STEAP1.

На фиг. 12A-12C показано специфическое выявление STEAP1 на раковых клетках предстательной железы C4-2B-luc с помощью мышиного антитела Ab-Am к STEAP1 (фиг. 12A); Ab-A1 XmAb (●) или Ab-A1 $XmAb^{2+1}$ (■) в течение 1 часа при 4°C (фиг. 12B) и антитела Ab-A1 $XmAb^{2+1}$ (фиг. 12C).

На фиг. 13 показано специфическое выявление STEAP1 на раковых клетках предстательной железы C4-2B-luc с помощью антитела Ab-Bx к STEAP1 (Ab-B1 XmAb).

На фиг. 14A-14C показано, что антитело Ab-Ax к STEAP1 (фиг. 14A), антитело Ab-A1 $XmAb^{2+1}$ к STEAP1 (фиг. 14B) и антитело Ab-A2(N67Q) $XmAb^{2+1}$ к STEAP1 (фиг. 14C) опосредуют лизис клеток-мишеней из линии опухолевых клеток человека C4-2B-luc посредством T-клеток человека.

На фиг. 15 показано, что антитела Ab-A1 $XmAb^{2+1}$ и Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ к STEAP1 опосредуют дозозависимый лизис клеток-мишеней из линии опухолевых клеток человека C4-2B-luc, но не клеток C4-2B-luc STEAP1 KO, посредством T-клеток человека.

На фиг. 16A-16B показано, что мышиное антитело Ab-Am к STEAP1 выявляет STEAP1, экспрессируемый анализируемыми T-клетками 293. На фиг. 16C показано, что средство Ab-A2(N67Q) $XmAb^{2+1}$, связывающее STEAP1, опосредовало дозозависимый лизис клеток-мишеней из линии клеток 293T человека, стабильно трансфицированной STEAP1 человека, но не исходной линии клеток 293T человека.

На фиг. 17A показано, что Ab-Bx (Ab-B1-XmAb) и Ab-B1 $XmAb^{2+1}$ опосредуют лизис клеток-мишеней в отношении раковых клеток предстательной железы C4-2B-luc. На фиг. 17B показано, что варианты $XmAb^{2+1}$ Ab-B1 (т.е. Ab-Bl-G37A, Ab-B1-S39A и Ab-B1-G37A/S39A) опосредуют лизис клеток-мишеней в отношении раковых клеток предстательной железы C4-2B-luc. На фиг. 17C показано, что варианты $XmAb^{2+1}$ Ab-B1 (т.е. Ab-B1-G37A, Ab-B1-S39A и Ab-B1-G37A/S39A) не опосредуют лизис клеток-мишеней в отношении раковых клеток предстательной железы C4-2B-luc с нокаутом STEAP1.

На фиг. 18A-18I изображены несколько форматов антигенсвязывающих белков: формат "открывалка", mAb-Fv, mAb-scFv, белок с центральным scFv, белок с центральным Fv, одноплечевой белок с центральным scFv, mAb с одним scFv, scFv-mAb и белок с двумя scFv. Все изображенные scFv-домены могут иметь структуру в направлении от N до C-конца типа вариабельный домен тяжелой цепи-(необязательный линкер)-вариабельный домен легкой цепи либо обратную ей. Кроме того, в одноплечевом mAb с scFv scFv может быть присоединен либо к N-концу мономерной тяжелой цепи, либо к N-концу легкой цепи.

На фиг. 19 представлены последовательности CDR, вариабельных доменов тяжелой цепи, вариабельных доменов легкой цепи, scFv, линкерные последовательности и мономерные последовательности по настоящему изобретению. Подчеркивание в последовательностях вариабельной области обозначает последовательности CDR.

Фиг. 20A и 20B иллюстрируют результаты анализа T-клеточно-зависимой цитотоксичности, описанного в примере 9. Фиг. 20A представляет собой график, иллюстрирующий специфическую цитотоксичность (%), опосредованную Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ в отдельности (незакрашенные круги) и Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ в комбинации с антителом к PD-1 (закрашенные круги) у одного иллюстративного донора T-клеток (ось Y=log (пМ)). Фиг. 20B иллюстрирует EC50 (пМ) Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ в отдельности (слева) и Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ в комбинации с антителом к PD-1 (справа) у четырех различных доноров T-клеток.

Фиг. 21A-21C представляют собой линейные графики, иллюстрирующие экспрессию PD-1 (% CD3+) в общей популяции T-клеток (фиг. 21A), в $CD8^+$ T-клетках (фиг. 21B) и $CD4^+$ T-клетках (фиг. 21C), подвергшихся воздействию различных количеств Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$. Круги и квадраты на графике обозначают разных доноров T-клеток. Экспрессия PD-1 увеличивается в T-клетках, подвергнутых воздействию гетеродимерного антитела по настоящему изобретению.

Фиг. 22 представляет собой линейный график, иллюстрирующий объем опухоли ($мм^3$; ось y) с течением времени (дни исследования, ось x). Клетки SK-N-MC человека (5×10^6 клеток/мышь) инъецировали подкожно в правую боковую часть спины самок сублетально облученных мышей NOD/SCID в день 1. В день 8 CD3+ T-клетки человека (2×10^7 клеток/мышь) инъецировали в брюшную полость всех животных, кроме группы 1. Среду-носитель (группы 1 и 2) или Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ на уровнях доз 1,0, 0,1 или 0,01 мг/кг (группы 3, 4, 5 соответственно) вводили путем внутривенных болюсных инъекций в дни 12, 19 и 26 (стрелки вверху графика). Объем опухолей определяли три раза в неделю с помощью электронного

штангенциркуля. Показан средний объем опухоли в группе [мм^3] ±SEM. Звездочки на фигуре обозначают статистически значимые различия (однофакторный ANOVA; * = p <0,05; *** = p <0,001) между группами, которых обрабатывали с помощью среды-носителя (группа 2) и с помощью Ab-A2(N67Q) XmAb^{2+1}.

Фиг. 23. Средние и медианные объемы опухоли для нейробластомы человека SK-N-MC у самок мышей NOD/SCID.

Подробное описание

STEAP1 представляет собой белок из 339 аминокислот, содержащий шесть трансмембранных доменов, что приводит к образованию трех внеклеточных петель и двух внутриклеточных петель. Аминокислотная последовательность STEAP1 человека представлена в данном документе под SEQ ID NO: 2. Предполагаемые положения внеклеточных петель представляют собой аминокислоты 92-118 (внеклеточная петля 1), аминокислоты 185-217 (внеклеточная петля 2) и аминокислоты 279-290 (внеклеточная петля 3). STEAP1 дифференциально экспрессируется при раке предстательной железы по сравнению с нормальными тканями, и наблюдалась повышенная экспрессия в метастатических очагах рака предстательной железы в костях и лимфатических узлах по сравнению с образцами с первичным раком предстательной железы. STEAP1 представляет собой превосходную мишень для диагностики и средств терапии на основе антител, таких как биспецифическое антитело к STEAP1/CD3, привлекающее Т-клетки, например, для запуска Т-клеточно-зависимой клеточной цитотоксичности или перенаправленного лизиса раковых клеток предстательной железы. В настоящем изобретении предусмотрены антигенсвязывающие белки, которые связывают STEAP1, как дополнительно описано в данном документе.

Антигенсвязывающий белок.

"Антигенсвязывающий белок" представляет собой белок, содержащий часть, которая связывает указанный антиген-мишень (такой как STEAP1). Антигенсвязывающий белок содержит остов или каркасную часть, которые позволяют антигенсвязывающему белку принимать конформацию, которая способствует связыванию антигенсвязывающего белка с антигеном. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок представляет собой антитело или иммуноглобулин (например, гетеродимерное и/или биспецифическое антитело), или антигенсвязывающий фрагмент антитела, или белковый продукт на основе антитела.

Термин "антитело" относится к интактному антигенсвязывающему иммуноглобулину. "Антитело" представляет собой тип антигенсвязывающего белка. Антитело может представлять собой антитело IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, в том числе любое из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В различных вариантах осуществления интактное антитело содержит две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи. Антитело имеет вариабельную область и константную область. В форматах IgG вариабельная область обычно содержит приблизительно 100-110 или больше аминокислот, содержит три области, определяющие комплементарность (CDR), несет основную ответственность за распознавание антигена и существенно варьируется среди других антител, которые связываются с различными антигенами. Вариабельная область, как правило, содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепей (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.; см., также Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883) в пределах каркасной области (обозначенной как каркасные области 1-4 -FR1, FR2, FR3 и FR4 - по Kabat et al., 1991; см. также Chothia and Lesk, 1987, выше). Константная область позволяет антителу привлекать клетки и молекулы иммунной системы.

В различных аспектах антитело представляет собой моноклональное антитело. В определенных аспектах антитело представляет собой антитело человека. В определенных аспектах антитело (или другой антигенсвязывающий белок) является химерным или гуманизированным. Термин "химерное" относится к антителу, содержащему домены из двух или более различных антител. Химерное антитело может, например, содержать константные домены от одного вида и вариабельные домены от второго или, в более общем случае, может содержать участки аминокислотной последовательности от по меньшей мере двух видов. Как "химерное", так и "гуманизированное" часто относятся к антигенсвязывающим белкам, в которых объединены области из более чем одного вида. Химерное антитело также может содержать домены двух или более различных антител от одного и того же вида. В одном варианте осуществления химерное антитело представляет собой антитело с привитой CDR.

Термин "гуманизированное" при использовании в отношении антигенсвязывающих белков относится к антигенсвязывающим белкам (например, антителам), содержащим по меньшей мере область CDR из источника, отличного от человека, и сконструированным таким образом, что они характеризуются структурой и иммунологической функцией, более сходными с таковыми у настоящих антител человека, чем у антител из исходного источника. Например, гуманизация может включать прививание CDR из антитела, отличного от антитела человека, такого как антитело мыши, на каркасную область человека. Как правило, в гуманизированном антителе все антитело за исключением CDR кодируется полинуклеотидом человеческого происхождения или идентично такому антителу за исключением его CDR. CDR, некоторые или все из которых кодируются нуклеиновыми кислотами, происходящими из организма, отличного

от человека, прививают на бета-складчатый каркас вариабельной области антитела человека для создания антитела, специфичность которого определяется привитыми CDR. Создание таких антител описано, например, в международной публикации заявки на патент № WO 92/11018; Jones, 1986, Nature 321: 522-525; и Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534-1536, все из которых полностью включены посредством ссылки. "Обратная мутация" выбранных акцепторных остатков каркасной области в соответствующие донорные остатки часто используется для восстановления аффинности, которая теряется в исходной привитой конструкции (см., например, патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693761; 5693762; 6180370; 5859205; 5821337; 6054297 и 6407213, все из которых полностью включены посредством ссылки). Гуманизированное антитело в оптимальном случае также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека, и, таким образом, как правило, будет содержать Fc-область человека.

В данной области техники хорошо известны различные методики и способы создания химерных антител, гуманизированных антител и реконструирования антител, отличных от антител человека. См. Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), и цитируемые там литературные источники; Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332: 323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89: 4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20): 4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11: 321-8, публикация заявки на патент США № 20030039649; патенты США №№ 5869619, 5225539, 5821337, 5859205; Padlan et al., 1995, FASEB J. 9:133-39; и Tamura et al., 2000, J. Immunol. 164:1432-41, все из которых полностью включены посредством ссылки. Гуманизация или другие способы снижения иммуногенности вариабельных областей антител, отличных от антител человека, могут включать в себя способы восстановления поверхности, как описано, например, в Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973, полностью включенной посредством ссылки. Исходное антитело может характеризоваться созревшей аффинностью, что хорошо известно в данной области техники. Структурные способы можно использовать для гуманизации и созревания аффинности, например, как описано в публикации заявки на патент США № 20060008883. Способы на основе отбора можно использовать для гуманизации и/или созревания аффинности вариабельных областей антител, в том числе без ограничения способы, описанные в Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16): 10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10): 753-759, все из которых полностью включены посредством ссылки. Гуманизация также может включать селективные аминокислотные замены для получения последовательности, отличной от последовательности человека, более сходной с последовательностью человека. Другие способы гуманизации могут включать прививание только частей CDR, в том числе без ограничения способы, описанные в Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084, все из которых полностью включены посредством ссылки.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела, т.е. фрагмент антитела, в котором отсутствуют часть легких цепей антитела или они все и/или часть тяжелых цепей антитела или они все. Фрагменты антител могут быть получены рекомбинантным путем или могут быть получены посредством расщепления интактного антитела с помощью ферментов, таких как, например, папаин и пепсин. Папаин расщепляет антитело с образованием двух Fab-фрагментов и одного Fc-фрагмента. Пепсин расщепляет антитело с образованием $F(ab')_2$-фрагмента и pFc'-фрагмента. В иллюстративных примерах антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой Fab-фрагмент или $F(ab')_2$-фрагмент. Fab-фрагмент представляет собой одновалентный фрагмент, содержащий VL-, VH-, CL- и CH1-домены. Fab может относиться к этой области в отдельности или к этой области в качестве составной части полноразмерного антитела, фрагмента антитела и т.д. $F(ab')_2$-фрагмент представляет собой двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области.

Архитектуру антител использовали для создания растущего спектра альтернативных форматов, который охватывает диапазон молекулярных масс по меньшей мере приблизительно 12-150 кДа и характеризуется диапазоном валентности (n) от мономерных (n=1) до димерных (n=2), до тримерных (n=3), до тетрамерных (n=4) и потенциально более высокого порядка; такие альтернативные форматы в данном документе называются "белковыми продуктами на основе антител" и являются примерами антигенсвязывающих белков. Белковые продукты на основе антител включают белковые продукты на основе структуры полного антитела и белковые продукты, которые имитируют фрагменты антитела, сохраняющие полную антигенсвязывающую способность, например, scFv и VHH/VH (обсуждаемые ниже). Одноцепочечное антитело (scFv) представляет собой антитело, в котором VL-область и VH-область соединены с помощью линкера (например, с помощью синтетической последовательности аминокислотных остатков, обычно длиной приблизительно 15 аминокислот) с образованием непрерывной белковой цепи, в которой линкер является достаточно длинным, чтобы обеспечить для белковой цепи возможность самосворачивания и образования одновалентного антигенсвязывающего участка (см., например, Bird et al., 1988, Sci-

ence 242:423-26 и Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83).

Антигенсвязывающий фрагмент, который сохраняет свой полный антигенсвязывающий участок, представляет собой Fv-фрагмент, который полностью состоит из вариабельной (V) области (VL- и VH-доменов одного антитела). Растворимый гибкий аминокислотный пептидный линкер часто применяют для присоединения V-областей к scFv-фрагменту (одноцепочечному вариабельному фрагменту) для стабилизации молекулы, или константный (C) домен добавляют к V-областям для получения Fab-фрагмента (антигенсвязывающего фрагмента). scFv- и Fab-фрагменты могут быть легко получены в клетках-хозяевах, например, в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах. Другие белковые продукты на основе антител включают scFv (ds-scFv), стабилизированный дисульфидными связями, одноцепочечный Fab (scFab), одноцепочечное антитело (SCA), доменные антитела (dAb) (например, пептиды, содержащие VH-домен, VL-домен или антигенсвязывающий фрагмент VH-домена или VL-домена), пептиды, содержащие Fd-фрагмент (содержащий VH- и CH1-домены), фрагменты области, определяющей комплементарность (CDR), а также ди- и мультимерные форматы антител, такие как диа-, триа- и тетратела, или миниантитела (мини-Ab), которые содержат различные форматы, состоящие из scFv, связанных с олигомеризационными доменами. Наименьшие фрагменты представляют собой VHH/VH из тяжелой цепи Ab верблюдовых, а также однодоменные Ab (sdAb). Пептитело или продукт слияния пептид-Fc представляет собой еще один белковый продукт на основе антитела. Структура пептитела состоит из биологически активного пептида, привитого на Fc-домен. Пептитела подробнее описаны в уровне техники. См., например, Shimamoto et al., mAbs 4(5): 586-591 (2012).

В качестве альтернативы белковый продукт на основе антитела может содержать, например, альтернативный белковый остов или искусственный остов с привитыми CDR или производными CDR. Такие остовы включают без ограничения остовы, полученные из антител, содержащие мутации, введенные, например, для стабилизации трехмерной структуры антигенсвязывающего белка, а также полностью синтетические остовы, содержащие, например, биосовместимый полимер. См., например, Korndorfer et al., 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volume 53, Issue 1: 121-129; Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20: 639-654. Кроме того, можно применять пептидные миметики антител ("PAM"), а также остовы на основе миметиков антител, в которых используются фибронектиновые компоненты в качестве остова.

В различных аспектах антигенсвязывающий белок содержит CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые отличаются не более чем на 3, 2 или 1 аминокислоту от i) vhCDR1 под SEQ ID NO: 14, vhCDR2 под SEQ ID NO: 15 или vhCDR2 под SEQ ID NO: 21 и vhCDR3 под SEQ ID NO: 16 или ii) vhCDR1 под SEQ ID NO: 33, vhCDR2 под SEQ ID NO: 34 и vhCDR3 под SEQ ID NO: 35; и/или CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые отличаются не более чем на 3, 2 или 1 аминокислоту от i) vlCDR1 под SEQ ID NO: 11, vlCDR2 под SEQ ID NO: 12 и vlCDR3 под SEQ ID NO: 13 или ii) vlCDR1 под SEQ ID NO: 30, vlCDR2 под SEQ ID NO: 31 и vlCDR3 под SEQ ID NO: 32. Каждое такое различие в последовательностях независимо представляет собой делецию, вставку или замену, хотя замены (например, консервативные замены) являются предпочтительными. Примеры консервативных замен включают без ограничения замены в пределах следующих групп: небольшие алифатические неполярные или слабополярные остатки - Ala, Ser, Thr, Pro, Gly; полярные отрицательно заряженные остатки и их амиды и сложные эфиры - Asp, Asn, Glu, Gln, цистеиновая кислота и гомоцистеиновая кислота; полярные положительно заряженные остатки - His, Arg, Lys, орнитин (Orn); крупные алифатические неполярные остатки - Met, Leu, Ile, Val, Cys, норлейцин (Nle), гомоцистеин; а также крупные ароматические остатки: Phe, Tyr, Trp, ацетилфенилаланин.

В различных аспектах антигенсвязывающий белок содержит следующие последовательности CDR: a) vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 14, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 21, и vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 16; или b) vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 33, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 34, и vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 35. В качестве альтернативы или дополнительно, антигенсвязывающий белок содержит следующие последовательности CDR: a) vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 11, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 12, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 13; или b) vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 30, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 32, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 33.

Таким образом, в различных аспектах антигенсвязывающий белок содержит vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 14, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 21, vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 16, vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 11, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 12, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 13. В альтернативных аспектах антигенсвязывающий белок содержит vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 33, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 34, vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 35, vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 30, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 31, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 32.

В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную (например, на по меньшей мере 95% идентичную или на 100% идентичную) SEQ ID NO: 183 или SEQ ID NO: 186; и/или вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность,

на по меньшей мере 90% идентичную (например, на по меньшей мере 95% идентичную или на 100% идентичную) SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 184 или SEQ ID NO: 185. Например, антигенсвязывающий белок может содержать (i) SEQ ID NO: 183 и SEQ ID NO: 182; (ii) SEQ ID NO: 184 и SEQ ID NO: 183 или (iii) SEQ ID NO: 185 и SEQ ID NO: 186. В различных аспектах антигенсвязывающий белок содержит вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая отличается от вышеупомянутых аминокислотных последовательностей только на 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 остаток, где каждое такое различие в последовательностях независимо представляет собой делецию, вставку или замену (например, консервативную замену). В различных аспектах различие (различия) в последовательностях находятся за пределами CDR (например, в каркасной области).

В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90% идентичную (например, на по меньшей мере 95% идентичную или на 100% идентичную) SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 36; и/или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную (например, на по меньшей мере 95% идентичную или на 100% идентичную) SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 199 или SEQ ID NO: 37. Например, антигенсвязывающий белок может содержать (i) SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18; (ii) SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 199 или (iii) SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37.

В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90% идентичную (например, на по меньшей мере 95% идентичную или на 100% идентичную) SEQ ID NO: 200 или SEQ ID NO: 204; и/или тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90% идентичную (например, на по меньшей мере 95% идентичную или на 100% идентичную) SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203 или SEQ ID NO: 205. Например, антигенсвязывающий белок может содержать (i) SEQ ID NO: 200 и SEQ ID NO: 201; (ii) SEQ ID NO: 200 или SEQ ID NO: 203; (iii) SEQ ID NO: 204 и SEQ ID NO: 205.

Конкуренция, эпитоп, аффинность связывания.

Антигенсвязывающий белок связывает STEAP1 под SEQ ID NO: 2. Специфичное связывание (т.е. связывание со STEAP1, которое заметно отличается от неспецифичного взаимодействия) можно определить, например, путем определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая обычно представляет собой молекулу со сходной структурой, которая не обладает связывающей активностью. Например, специфичное связывание можно определить по конкуренции с контрольной молекулой, сходной с мишенью.

Аффинность связывания антигенсвязывающего белка со STEAP1 можно описать с точки зрения константы диссоциации (Kd). В иллюстративных аспектах Kd антигенсвязывающих белков, предусмотренных в данном документе, является микромолярной, наномолярной, пикомолярной или фемтомолярной. Как правило, антигенсвязывающий белок, который специфично связывает антиген, будет иметь Kd, которая является в 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или более раз более высокой для контрольной молекулы по сравнению с антигеном- или эпитопом-мишенью. Кроме того, специфичное связывание для конкретного антигена может быть продемонстрировано, например, антителом, имеющим КА или Ка для антигена или эпитопа, которая является в по меньшей мере 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или более раз выше для эпитопа по сравнению с контролем, где КА или Ка относится к скорости ассоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген. В иллюстративных аспектах KD антигенсвязывающего белка, предусмотренного в данном документе, в отношении STEAP1 равна 10^{-7} М или меньше, равна 10^{-8} М или меньше, равна 10^{-9} М или меньше, равна 10^{-10} М или меньше, равна 10^{-11} М или равна 10^{-12} М или меньше. Например, KD антигенсвязывающего белка необязательно находится в диапазоне от приблизительно 10^{-4} до 10^{-6} М, или от приблизительно 10^{-7} до 10^{-9} М, или от приблизительно 10^{-10} до 10^{-12} М, или от приблизительно 10^{-7} до 10^{-12}, или от приблизительно 10^{-9} до 10^{-12}, или от приблизительно 10^{-13} до 10^{-15} М. В качестве альтернативы (или дополнительно) антигенсвязывающий белок имеет низкую скорость диссоциации от STEAP1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок имеет K_{off}, составляющую 1×10^{4} c^{-1} или меньше. В другом варианте осуществления K_{off} составляет 5×10^{-5} c^{-1} или меньше. В различных аспектах антигенсвязывающий белок различает клетки-мишени, экспрессирующие STEAP1 на высоком уровне, и клетки, не являющиеся мишенями, в которых представлено меньше STEAP1. Например, в различных аспектах антигенсвязывающий белок предпочтительно связывает клетки, содержащие от более чем приблизительно 100000 рецепторов STEAP на клетку (например, приблизительно 200000 рецепторов STEAP1 на клетку) до приблизительно 10000 рецепторов STEAP1 на клетку. Следует понимать, что раскрытие, касающееся конкуренции, аффинности связывания и специфичности связывания в отношении STEAP1, также применимо к связыванию полиспецифического антигенсвязывающего белка со вторым или третьим антигеном (например, CD3) или другим антителом, которое используется в сочетании с антигенсвязывающим белком, связывающим STEAP1. Например, в иллюстративных аспектах Kd антигенсвязывающего белка, предусмотренного в данном документе, в отношении CD3 (или PD-1, как описано ниже) равна 10^{-7} М или меньше, равна 10^{-8} М или меньше, равна 10^{-9} М или меньше, равна 10^{-10} М или меньше, равна 10^{-11} М или меньше или равна 10^{-12} М или меньше. Например, Kd антигенсвязывающего белка необязательно находится в диапазоне от приблизительно 10^{-4}

до 10^{-6} М, или от приблизительно 10^{-7} до 10^{-9} М, или от приблизительно 10^{-10} до 10^{-12} М, или от приблизительно 10^{-7} до 10^{-12}, или от приблизительно 10^{-9} до 10^{-12}, или от приблизительно 10^{-13} до 10^{-15} М. В качестве альтернативы (или дополнительно) антигенсвязывающий белок имеет низкую скорость диссоциации от CD3. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок имеет K_{off}, составляющую 1×10^{-4} c^{-1} или меньше. В другом варианте осуществления K_{off} в отношении CD3 составляет 5×10^{-5} c^{-1} или меньше.

В настоящем изобретении также предусмотрен антигенсвязывающий белок (например, антитело), который конкурирует за связывание со STEAP1 с любым из антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе (например, Ab-A, Ab-A1, Ab-A2, Ab-B или Ab-B1, в том числе в формате $XmAb^{2+1}$, описанном в данном документе). Другими словами, в настоящем изобретении предусмотрен антигенсвязывающий белок, который перекрестно блокирует связывание эталонного антигенсвязывающего белка, описанного в данном документе, со STEAP1 или связывание которого со STEAP1 перекрестно блокирует эталонный антигенсвязывающий белок. Под "конкуренцией" подразумевается, что один антигенсвязывающий белок предотвращает, снижает или ингибирует связывание эталонного антигенсвязывающего белка со STEAP1. Можно применять многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например, поверхностный плазмонный резонанс, твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см., например, Stahli et al., 1983, Methods in Enzymology 9: 242-253), твердофазный прямой EIA с комплексом биотин-авидин (см., например, Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137:3614-3619), твердофазный анализ с применением прямого мечения, твердофазный сэндвич-анализ с применением прямого мечения (см., например, Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press), твердофазный RIA с применением прямого мечения с использованием в качестве метки I-125 (см., например, Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25: 7-15), твердофазный прямой EIA с комплексом биотин-авидин (см., например, Cheung, et al., 1990, Virology 176: 546-552) и RIA с применением прямого мечения (Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32: 77-82). Как правило, такой анализ включает применение очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью или доступного на клетках, немеченого анализируемого антигенсвязывающего белка и меченого эталонного антигенсвязывающего белка. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связывающейся с твердой поверхностью или клетками в присутствии анализируемого антигенсвязывающего белка. Обычно анализируемый антигенсвязывающий белок присутствует в избытке. Антигенсвязывающие белки, идентифицируемые с помощью конкурентного анализа (конкурирующие антигенсвязывающие белки), включают в себя антигенсвязывающие белки, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонные антигенсвязывающие белки, эпитопом, который перекрывается с эпитопом, распознаваемым эталонным антигенсвязывающим белком, и эпитопами, которые не перекрываются, но обеспечивают образование стерического несоответствия между анализируемым и эталонным антигенсвязывающими белками. Обычно, если конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избытке, он будет ингибировать связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном на по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или 75%. В некоторых случаях связывание ингибируется на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 97% или больше. По меньшей мере в одном аспекте антигенсвязывающий белок (например, антитело) конкурирует с эталонным антигенсвязывающим белком (например, Ab-A, Ab-A1, Ab-A2, Ab-B или Ab-B1, описанными в данном документе, необязательно в формате биспецифического антитела, таком как формат биспецифического антитела, описанный в примерах (например, $XmAb^{2+1}$)), так что связывание эталонного антигенсвязывающего белка со STEAP1 снижается на по меньшей мере 80% или на по меньшей мере 90%.

Антигенсвязывающий белок связывает STEAP1 под SEQ ID NO: 2. Конкурирующий (или перекрестно блокирующий) антигенсвязывающий белок может связывать эпитоп, который перекрывается с эпитопом, распознаваемым эталонным антигенсвязывающим белком, или эпитоп, который не перекрывается, но обеспечивает образование стерического несоответствия между анализируемым и эталонным антигенсвязывающими белками. В различных аспектах антигенсвязывающий белок связывается с тем же эпитопом, что и эталонный антигенсвязывающий белок, такой как Ab-A, Ab-A1, Ab-A2 (N67Q), Ab-B или Ab-B1 или их биспецифические или гетеродимерные варианты (например, Ab-A1 $XmAb^{2+1}$, Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ или Ab-B1 $XmAb^{2+1}$), описанные в данном документе. Например, антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению необязательно связывает STEAP1 в области за пределами второй внеклеточной петли. Антигенсвязывающий белок по меньшей мере в одном варианте осуществления связывает область STEAP1 в пределах аминокислот 92-118 (внеклеточная петля 1) и/или аминокислот 279-290 (внеклеточная петля 3). В различных аспектах настоящего изобретения предусмотрен антигенсвязывающий белок, связывающий область STEAP1 в пределах аминокислот 92-118 и аминокислот 279-290. Также необязательно антигенсвязывающий белок не связывает STEAP2 (UniProtKB № Q8NFT2; SEQ ID NO: 177). При необходимости эпитоп эталонного антигенсвязывающего белка и/или анализируемого антигенсвязывающего белка может быть определен посредством рентгенографической расшифровки кристаллической структуры антигенсвязывающего белка, связанного со STEAP1, или его части. В одном таком варианте осуществления эпитоп определяется как те остатки во внеклеточной части STEAP1, ко-

торые демонстрируют по меньшей мере 10% снижение доступности для растворителя, когда антигенсвязывающий белок (эталонный или анализируемый) связан с ними, по сравнению с тем, когда он не связан с ними.

Способы получения антигенсвязывающих белков.

Подходящие способы получения антигенсвязывающих белков (например, антител, антигенсвязывающих фрагментов антител и белковых продуктов на основе антител) известны из уровня техники. Например, стандартные гибридомные способы получения антител описаны, например, в Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), и CA. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). Способы с применением EBV-трансформированной гибридомы и систем экспрессии на основе бактериофаговых векторов описаны, например, в Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984), Roder et al., Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986) и Huse et al., Science, 246, 1275-81 (1989)). Способы получения антител от животных, отличных от человека, описаны, например, в патентах США № 5545806, 5569825, 5714352 и 5814318; и публикации заявки на патент США № 2002/0197266 (все из которых включены в данный документ посредством ссылки). В определенных аспектах предусмотрен рекомбинантный антигенсвязывающий белок, который связывает STEAP1. В данном контексте "рекомбинантный белок" представляет собой белок, полученный с применением рекомбинантных методик, например, посредством экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Способы и методики получения рекомбинантных белков хорошо известны из уровня техники.

Молекулярная эволюция CDR в сайте связывания также использовалась для создания антигенсвязывающих белков (например, антител) с повышенной аффинностью, например, антител, характеризующихся повышенной аффинностью к c-erbB-2, как описали Schier et al., 1996, J. Mol. Biol. 263: 551. Такие методики применимы при получении антигенсвязывающих белков, связывающих STEAP1 (или других антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе).

Способы тестирования антигенсвязывающих белков в отношении способности к связыванию с антигеном, таким как STEAP1, известны из уровня техники и включают, например, радиоиммунологический анализ (RIA), ELISA, вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, поверхностный плазмонный резонанс (например, BIAcore®) и анализы конкурентного ингибирования (см., например, Janeway et al., ниже; публикацию заявки на патент США № 2002/0197266 и патент США № 7872106, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и, в частности, в отношении раскрытия конкурентных анализов). Действительно, анализы, в которых тестируют способность антигенсвязывающего белка конкурировать со вторым антигенсвязывающим белком за связывание с антигеном или с его эпитопом, известны из уровня техники и могут применяться для тестирования способности антитела связываться, например, со STEAP1. См., например, публикацию заявки на патент США № 2014/0178905, Chand et al., Biologicals 46: 168-171 (2017); Liu et al., Anal Biochem 525: 89-91 (2017); и Goolia et al., J Vet Diagn Invest 29(2): 250-253 (2017). Поверхностный плазмонный резонанс можно использовать для определения констант связывания антигенсвязывающего белка и второго антигенсвязывающего белка, и можно сравнить две константы связывания.

Полиспецифические антигенсвязывающие белки.

Постоянной проблемой в технологиях с использованием антител является стремление к получению биспецифических (и/или полиспецифических) антител, которые связываются с двумя (или больше) различными антигенами одновременно, что в целом позволяет сблизить различные антигены и приводит к получению новых функциональных свойств и новых средств терапии. В настоящем изобретении предусмотрен новый полиспецифический антигенсвязывающий белок, который связывает STEAP1 и один или несколько дополнительных антигенов-мишеней. В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен новый биспецифический антигенсвязывающий белок (например, биспецифическое антитело), содержащий домен, связывающий STEAP1, как описано выше, и связывающую область, которая связывает второй антиген-мишень (который может представлять собой другой эпитоп STEAP1, но обычно является другим антигеном). В различных аспектах второй антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, присутствующую на эффекторной клетке, т.е. лейкоците, который экспрессирует один или несколько FcR (например, FcγRIII) и выполняет одну или несколько эффекторных функций, обусловленных Fc-областью антитела.

Примеры эффекторных функций включают без ограничения связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание Fc-рецептора, антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, подавление экспрессии рецепторов клеточной поверхности и активацию B-клеток. Примеры эффекторных клеток, участвующих в ADCC, включают без ограничения цитотоксические T-клетки, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), естественные клетки-киллеры (NK), моноциты и нейтрофилы. В различных аспектах настоящего изобретения предусмотрен биспецифический антигенсвязывающий белок (например, биспецифическое антитело), который связывается как с CD3 (например, SEQ ID NO: 1), так и со STEAP1 (SEQ ID NO: 2). В различных аспектах настоящего изобретения предусмотрен биспецифический антигенсвязывающий белок (например, биспецифическое антитело), который связывается как с CD3, так и с внеклеточными петлями 1 и 3 STEAP1.

В различных аспектах полиспецифический антигенсвязывающий белок различает клетки-мишени, экспрессирующие STEAP1 на высоком уровне, и клетки, не являющиеся мишенями, в которых представлено меньше STEAP1. В этом отношении в некоторых вариантах осуществления биспецифический антигенсвязывающий белок (например, гетеродимерное антитело) по настоящему изобретению способен предпочтительно опосредовать Т-клеточно-зависимое уничтожение опухолевых клеток, демонстрируя пониженные "нецелевые" эффекты. Например, в некоторых аспектах биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающий белок, связывающий STEAP1, описанный в данном документе, наряду с антигенсвязывающей областью, связывающей CD3, предпочтительно опосредует Т-клеточно-зависимое уничтожение клеток с плотностью STEAP1 на поверхности, составляющей более 10000 (например, EC90 является по меньшей мере в 10 раз меньшей для клеток с плотностью STEAP1 на поверхности, составляющей более 10000, по сравнению с клетками с плотностью STEAP1 на поверхности, составляющей менее 10000).

В настоящем изобретении предусмотрен биспецифический антигенсвязывающий белок, содержащий новые последовательности, связывающие CD3, в том числе наборы CDR и полные вариабельные легкие и тяжелые цепи. В некоторых аспектах CD3-связывающий домен (необязательно scFv, как обсуждается ниже) биспецифической конструкции содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые отличаются не более чем на 3, 2 или 1 аминокислоту от vhCDR1 под SEQ ID NO: 170, vhCDR2 под SEQ ID NO: 171 и vhCDR3 под SEQ ID NO: 172, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, которые отличаются не более чем на 3, 2 или 1 аминокислоту от vlCDR1 под SEQ ID NO: 174, vlCDR2 под SEQ ID NO: 175 и vlCDR3 под SEQ ID NO: 176. Например, в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая (например, биспецифическая) конструкция, содержащая вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную (например, на по меньшей мере 95% идентичную или на 100% идентичную) SEQ ID NO: 169, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную (например, на по меньшей мере 95% идентичную или на 100% идентичную) SEQ ID NO: 173.

Например, часть, связывающая CD3, необязательно содержит следующие последовательности CDR: vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 170, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 171, vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 172, vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 174, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 175, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 176. В этом отношении CD3-связывающая область необязательно содержит вариабельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 169 и вариабельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 173.

Биспецифические антигенсвязывающие белки могут содержать два антигенсвязывающих домена (например, каждый антиген связывается одновалентно) или три (или более) антигенсвязывающих домена (например, один антиген связывается двухвалентно, а другой связывается одновалентно), такие как домены, связывающие STEAP1 и CD3, описанные в данном документе. Биспецифические антитела включают без ограничения традиционные биспецифические иммуноглобулины (например, BsIgG), IgG, содержащий присоединенный антигенсвязывающий домен (например, амино- или карбокси-концы легкой или тяжелой цепей соединены с дополнительными антигенсвязывающими доменами, такими как однодоменные антитела или спаренные вариабельные домены антител (например, Fv или scFv)), фрагменты BsAb (например, биспецифические одноцепочечные антитела), биспецифические слитые белки (например, антигенсвязывающие домены, слитые с эффекторным фрагментом) и конъюгаты BsAb. См., например, Spiess et al., Molecular Immunology 67(2) Part A: 97-106 (2015), в которой описаны различные биспецифические форматы и которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры биспецифических конструкций включают без ограничения диатела, одноцепочечные диатела, тандемные scFv и биспецифические Fab_2, а также разработанные конструкции, содержащие полноразмерные антитела. См, например, Chames & Baty, 2009, mAbs 1[6]: 1-9; и Holliger & Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23[9]: 1126-1136; Wu et al., 2007, Nature Biotechnology 25[11]: 1290-1297; Michaelson et al., 2009, mAbs 1[2]:128-141; международные публикации заявок на патент № 2009032782 и 2006020258; Zuo et al., 2000, Protein Engineering 13[5]:361-367; публикацию заявки на патент США № 20020103345; Shen et al., 2006, J Biol Chem 281[16]:10706-10714; Lu et al., 2005, J Biol Chem 280[20]: 19665-19672; и Kontermann, 2012 MAbs 4(2): 182, все из которых в явной форме включены в данный документ.

В различных аспектах биспецифический антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифическое одноцепочечное антитело (BiScFv). Вариабельная область легкой цепи и вариабельная область тяжелой цепи соединены друг с другом в виде одной цепи в качестве первого антигенсвязывающего домена, который соединен со вторым антигенсвязывающим доменом сходной структуры, необязательно с помощью линкера. В случае применения линкера данный линкер предпочтительно имеет длину и последовательность, достаточную для обеспечения того, чтобы каждый из первого и второго антигенсвязывающих доменов мог независимо от другого сохранять свою отличающуюся специфичность связывания. Биспецифические одноцепочечные молекулы известны из уровня техники и дополнительно описаны в патенте США № 7635472, международной публикации заявки на патент № WO 99/54440; Mack, J. Immu-

nol. (1997), 158, 3965-3970; Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025; Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197; Loffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103; Bruhl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426; и Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56, все их которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Альтернативные биспецифические антигенсвязывающие форматы описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2011/0054151, включенной в данный документ посредством ссылки. Например, биспецифический антигенсвязывающий белок может включать формат mAb-Fv, где антитело IgG слито на С-конце с Fv-фрагментом. В качестве альтернативы можно использовать формат mAb-Fab, где антитело IgG слито на С-конце с Fab. Конструкция mAb-Fab содержит константные CH- и CL-домены, расположенные со стороны С-конца по отношению к С-концевому слитому Fv, тогда как mAb-Fv не содержит их. См. фиг. 8 в публикации заявки на патент США № 2011/0054151. N-концевая связывающая область конструкций mAb-Fv и mAb-Fab необязательно лишена легкой цепи и CH1-домена (т. е. содержит однодоменную VHH-область). Конструкции mAb-Fv и mAb-Fab содержат три вариабельные области, так что они связывают первый антиген двухвалентно, а второй антиген - одновалентно. Подходящие биспецифические антигенсвязывающие форматы также включают конструкции Fab-Fv и Fab-Fab, описанные в публикации заявки на патент США № 2011/0054151. Иммуноглобулины Fab-Fv и Fab-Fab содержат N-концевой Fab-фрагмент, который связывает первый антиген, а С-концевой Fv- или Fab-фрагмент связывает второй антиген.

В одном аспекте настоящее изобретение направлено на создание гетеродимерных антител, которые совместно взаимодействуют с антигенами и в основе которых лежат аминокислотные варианты в константных областях, которые различаются в каждой цепи, для способствования образованию гетеродимеров и/или обеспечения легкой очистки гетеродимеров от гомодимеров. В целом, биспецифические антитела получают путем включения генов для каждой тяжелой и легкой цепи в клетки-хозяева. Это обычно приводит к образованию желаемого гетеродимера (A-B), а также двух гомодимеров (A-A и B-B). Однако основным препятствием в образовании полиспецифических антител является трудность очистки гетеродимерных антител от гомодимерных антител и/или смещения в сторону образования гетеродимеров вместо образования гомодимеров.

В настоящем изобретении предусмотрены форматы гетеродимерных антител, которые преодолевают преграды, связанные с предыдущими технологиями. Кроме того, в случае с биспецифическими антигенсвязывающими белками, связывающими STEAP1/CD3, гетеродимерное антитело по настоящему изобретению допускает одновалентное связывание CD3. Активация Т-клеток с помощью CD3 происходит только тогда, когда ассоциированный с ним Т-клеточный рецептор (TCR) взаимодействует с молекулой MHC, нагруженной антигеном, на антигенпрезентирующих клетках в высокоавидном межклеточном синапсе (Kuhns et al., 2006, Immunity 24: 133-139). Неспецифическое двухвалентное перекрестное связывание CD3 с использованием антитела к CD3 вызывает цитокиновый шторм и токсичность (Perruche et al., 2009, J Immunol 183[2]: 953-61; Chatenoud & Bluestone, 2007, Nature Reviews Immunology 7: 622-632; которые в явной форме включены посредством ссылки). Таким образом, для практического клинического применения предпочтительным режимом совместного взаимодействия с CD3 для перенаправленного уничтожения клеток-мишеней является одновалентное связывание, которое приводит к активации только при взаимодействии с совместно взаимодействующей мишенью. Таким образом, в одном варианте осуществления гетеродимерное антитело по настоящему изобретению обеспечивает преимущество одновалентного связывания с CD3 и двухвалентного связывания со STEAP1 в формате, который обеспечивает эффективное получение антител.

Иллюстративным является формат гетеродимерного антитела, содержащий одну тяжелую цепь, содержащую одноцепочечный Fv (scFv), и вторую тяжелую цепь в "обычном" Fab-формате, т.е. содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и легкую цепь. Другими словами, гетеродимерное антитело содержит a) первую тяжелую цепь, содержащую первый вариабельный Fc-домен и одноцепочечную Fv-область (scFv), которая связывает первый антиген (необязательно CD3); b) вторую тяжелую цепь, содержащую второй вариабельный Fc-домен и первый вариабельный домен тяжелой цепи; и c) первую легкую цепь, содержащую первый вариабельный домен легкой цепи и первый константный домен легкой цепи, где первый вариабельный домен тяжелой цепи и первый вариабельный домен легкой цепи связываются со вторым антигеном (необязательно STEAP1). Для иллюстрации, конструкция содержит один мономер со структурой область scFv-линкер для доменов-Fc-домен и второй мономер со структурой VH-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 и связанной легкой цепью, необязательно с вариантами гетеродимеризации, в том числе стерическими вариантами и pI-вариантами, Fc- и FcRn-вариантами, и дополнительными антигенсвязывающими доменами (с необязательными линкерами), включенными в эти области. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой шарнирную область или ее фрагмент. Эта структура иногда упоминается в данном документе как формат XmAb, формат "тройной F" (scFv-FAb-Fc) или формат "открывалка". Две цепи предпочтительно объединяют путем применения аминокислотных вариантов в константных областях (например, Fc-домене и/или шарнирной области), которые способствуют образованию гетеродимерных антител, как более подробно описано ниже. scFv предпочтительно связывает CD3 и необязательно содержит положительно заряженный линкер scFv. В качестве

альтернативы scFv связывает STEAP1. Формат "тройной F" дополнительно описан в патенте США № 9822186, включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и, в частности, в отношении раскрытия структуры гетеродимерного антитела.

В другом аспекте биспецифический антигенсвязывающий белок представляет собой гетеродимерное антитело, содержащее первый мономер, содержащий первую тяжелую цепь, содержащую первый вариабельный домен тяжелой цепи, первую константную область тяжелой цепи, содержащую первый CH1-домен и первый Fc-домен, при этом scFv содержит вариабельный домен легкой цепи scFv, линкер scFv и вариабельный домен тяжелой цепи scFv. scFv ковалентно присоединен между С-концом CH1-домена константного домена тяжелой цепи и N-концом первого Fc-домена с помощью линкера(линкеров) для доменов, и scFv связывает CD3. Гетеродимерное антитело дополнительно содержит второй мономер, содержащий вторую тяжелую цепь, содержащую второй вариабельный домен тяжелой цепи и вторую константную область тяжелой цепи, содержащую второй Fc-домен. В гетеродимерном антителе дополнительно используется общая легкая цепь, содержащая вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, которая соединяется с тяжелыми цепями с образованием двух идентичных Fab, которые связывают STEAP1. Этот формат иногда упоминается в данном документе как формат "$XmAb^{2+1}$" ввиду двухвалентного связывания с одним антигеном-мишенью. Таким образом, в одном варианте осуществления гетеродимерное антитело по настоящему изобретению обеспечивает преимущество одновалентного связывания с CD3 и двухвалентного связывания со STEAP1 в формате, который обеспечивает эффективное получение антител.

Как дополнительно описано ниже, гетеродимерное антитело может также включать мутации для получения асимметричных вариантов, pI-вариантов, вариантов с устранением связывания, дополнительных Fc-вариантов и т.д. Например, в различных аспектах первый и указанный второй Fc-домены имеют набор аминокислотных замен, выбранный из группы, состоящей из S364K/E357Q:L368D/K370S; L368D/K370S:S364K; L368E/K370S:S364K; T411T/E360E/Q362E:D401K; L368D/K370S:S364K/E357L и K370S:S364K/E357Q.

Иллюстрация формата $XmAb^{2+1}$ гетеродимерного антитела по настоящему изобретению представлена на фиг. 1. ScFv-домен и две предоставленные Fab-части образуют три антигенсвязывающих домена, где Fab-части двух мономеров связывают STEAP1, а scFv-домен связывает CD3. ScFv-домен вставлен между Fc-доменом и областью CH1-Fv одного из мономеров.

Гетеродимерное антитело предпочтительно относится к классу IgG, который имеет несколько подклассов, в том числе без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, хотя также предусматриваются IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Следует понимать, что антитела также могут включать в себя гибриды различных изотипов и/или подклассов. Например, pI-конструирование гибридов IgG1/G2, как показано в публикации заявки на патент США № 2009/0163699, включенной посредством ссылки, предусмотрено как часть настоящего изобретения.

Существует ряд механизмов, которые могут быть использованы для создания гетеродимеров по настоящему изобретению. Кроме того, как будет понятно специалистам в данной области и как более подробно описано ниже, эти механизмы можно комбинировать для обеспечения высокой гетеродимеризации.

Также может быть необязательно использован один из механизмов, обычно упоминаемый в данной области техники как "выступы и впадины" ("KIH"), относящийся к конструированию аминокислот, при котором создаются стерические воздействия, благоприятные для образования гетеродимеров и неблагоприятные для образования гомодимеров; его иногда называют "выступами и впадинами", как описано в публикации заявки на патент США № 20130205756, Ridgway et al., Protein Engineering 9(7):617 (1996); Atwell et al., J. Mol. Biol. 1997 270: 26; и в патенте США № 8216805, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, в частности, в отношении раскрытия получения гетеродимерных антител. Кроме того, как описано в Merchant et al., Nature Biotech. 16:677 (1998), эти мутации по типу "выступов и впадин" можно комбинировать с дисульфидными связями для обеспечения асимметрии образования в сторону гетеродимеризации. Пример мутаций включает T366S/L368A/Y407V в паре с T366W, а также этот вариант с дисульфидным мостиком -T366S/L368A/Y407V/Y349C в паре с T366W/S354C, особенно в комбинации с другими вариантами гетеродимеризации, включая pi-варианты, как описано ниже.

Дополнительный механизм, который находит применение при создании гетеродимеров, иногда называют "электростатическим наведением", как описано в Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285 (25): 19637 (2010), включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Это иногда упоминается в данном документе как "зарядовые пары". В этом варианте осуществления используют электростатические взаимодействия для обеспечения асимметрии образования в сторону гетеродимеризации. Как будет понятно специалистам в данной области, они могут также оказывать влияние на pI и, следовательно, на очистку, и поэтому в некоторых случаях также могут рассматриваться в качестве pi-вариантов. Однако поскольку их создавали для усиления гетеродимеризации и не использовали в качестве инструментов для очистки, их классифицируют как "стерические варианты". Они включают без ограничения D221E/P228E/L368E в паре с D221R/P228R/K409R (т.е. они представляют собой соответствующие моно-

мерам наборы) и C220E/P228E/368E в паре с C220R/E224R/P228R/K409R. В некоторых вариантах осуществления каркасных областей в результате мутации в положении 220 удаляется цистеин, который больше не нужен для образования дисульфидных связей между тяжелыми и легкими цепями. "Стерические варианты" представляют собой необязательный вариант осуществления настоящего изобретения.

Существует несколько механизмов, которые могут приводить к легкой очистке гетеродимерных белков; один основан на применении pI-вариантов, так как каждый мономер имеет свое значение pI, что позволяет проводить изоэлектрическую очистку димерных белков A-A, A-B и B-B. В качестве альтернативы разделение может быть выполнено по размеру. Также возможно обеспечение асимметрии образования гетеродимеров по сравнению с гомодимерами, как это в общих чертах описано ниже. Таким образом, комбинация вариантов стерической гетеродимеризации и pI-вариантов или вариантов зарядовых пар может применяться в контексте настоящего изобретения. Кроме того, scFv может содержать заряженный линкер scFv (положительный или отрицательный), который дает дополнительное повышение pI для целей очистки. Как будет понятно специалистам в данной области, некоторые форматы "тройной F" применимы только лишь с заряженными линкерами scFv и без каких-либо дополнительных регулировок pI, хотя настоящее изобретение в действительности также предусматривает применение асимметричных вариантов с заряженными линкерами scFv (и комбинаций Fc-, FcRn- и KO-вариантов, обсуждаемых в данном документе).

В варианте осуществления, в котором используется pI в качестве механизма разделения, аминокислотные варианты можно вводить в один или оба мономерных полипептида; то есть pI одного из мономеров (называемого в данном документе для простоты "мономером A") можно сконструировать отдельно от мономера B или можно изменить заряд как мономера A, так и мономера B с увеличением pI мономера A и уменьшением pI мономера B. Изменения pI одного или обоих мономеров можно выполнить путем удаления или добавления заряженного остатка (например, нейтральную аминокислоту заменяют положительно или отрицательно заряженным аминокислотным остатком, например, глицин заменяют на глутаминовую кислоту), замены заряженного остатка с положительного или отрицательного на противоположный заряд (например, замены аспарагиновой кислоты на лизин) или замены заряженного остатка на нейтральный остаток (например, с потерей заряда; замены лизина на серин). Кроме того, подходящими pI-вариантами для применения в создании гетеродимерных антител в данном документе являются те, которые являются изотипическими, например, при внесении pI-вариантов из различных изотипов IgG таким образом, что pI изменяется без придания значительной иммуногенности; см. фиг. 29 из публикации заявки на патент США № 20140288275, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Соответственно, этот вариант осуществления обеспечивает создание достаточного изменения pI по меньшей мере в одном из мономеров, так что гетеродимеры можно отделить от гомодимеров. Этого можно достигнуть с использованием константной области тяжелой цепи "дикого типа" и области-варианта, которая была сконструирована так, чтобы увеличить или уменьшить ее pI (wt A- +B или wt A- -B), или путем увеличения pI одной области и уменьшения pI другой области (A+ -B- или A- B+). Следует отметить, что в этом обсуждении не имеет значения, какой мономер содержит scFv, а какой содержит Fab. Схема, связанная с использованием pI-вариантов, представлена на фигуре 34 патента США № 9822186 (включенного в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и, в частности, в отношении обсуждения вариантов гетеродимерных антител и последовательностей, связывающих CD3). pI-варианты можно комбинировать с асимметричными вариантами в формате "подключай и работай", так как эффекты вариантов легко переносятся в различные антитела с различными Fv-областями и являются очень стабильными.

Таким образом, в целом, аспект настоящего изобретения включает аминокислотные варианты в константных областях антител, которые направлены на изменение изоэлектрической точки (pI) по меньшей мере одного, если не обоих, из мономеров антитела с образованием "pI-гетеродимеров" (т.е. "pI-антител") путем включения аминокислотных замен ("pI-вариантов" или "pI-замен") в один или оба мономера. Отделение гетеродимеров от двух гомодимеров может быть достигнуто, если pI двух мономеров отличаются всего на 0,1 единицы pH, например, если разница составляет 0,2, 0,3, 0,4 и 0,5 pH или больше.

Количество pI-вариантов, которые должны быть включены в каждый мономер или оба мономера для достижения желаемого разделения, будет частично зависеть от начальной pI scFv и Fab. То есть для того, чтобы определить, какой мономер необходимо сконструировать или в каком "направлении" (например, с более положительным или более отрицательным зарядом), рассчитывают Fv-последовательности для двух антигенов-мишеней и на основании этого принимают решение. Как известно из уровня техники, разные Fv будут иметь разные используемые начальные pI. В целом pI конструируют таким образом, чтобы получить общую разность pI для каждого мономера, составляющую по меньшей мере приблизительно 0,1 log, при этом предпочтительной является 0,2-0,5.

Кроме того, в некоторых случаях (в зависимости от формата) гетеродимеры можно отделить от гомодимеров по размеру (например, по молекулярной массе). Например, как показано в некоторых вариантах осуществления на фиг. 18A-I, некоторые форматы приводят к образованию гомодимеров и гетеродимеров с разными размерами (например, для "открывалок" один гомодимер имеет формат "с двумя scFv",

один гомодимер представляет собой стандартное антитело, а гетеродимер имеет один Fab и один scFv). Кроме того, как показано на фиг. 18A-I, возможно, чтобы некоторые антигены связывались двухвалентно (например, два антигенсвязывающих участка связываются с одним антигеном). Следует понимать, что для достижения желаемого результата и комбинаций можно использовать любую комбинацию Fab и scFv.

В случае, когда pI-варианты используют для достижения гетеродимеризации, при использовании константной (константных) области (областей) тяжелой (тяжелых) цепи (цепей) предусматривается более модульный подход к разработке и очистке полиспецифических белков, включая антитела. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления варианты гетеродимеризации (в том числе асимметричные и очищаемые варианты гетеродимеризации) не включены в вариабельные области, так что каждое отдельное антитело должно быть сконструировано. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления вероятность иммуногенности, обусловленной использованием pI-вариантов, значительно снижается при внесении pI-вариантов из разных изотипов IgG, так что pI изменяется без введения значительной иммуногенности. Таким образом, дополнительной проблемой, которая должна быть решена, является выяснение информации о константных доменах с низким значением pI и высоким содержанием последовательностей человека, например, сведение к минимуму или устранение остатков, не являющихся остатками человека, в любом конкретном положении.

Дополнительным преимуществом, которое может проявиться при pI-конструировании, является также увеличение периода полужизни в сыворотке крови и повышение связывания с FcRn. То есть, как описано в публикации заявки на патент США № 20120028304 (включенной посредством ссылки во всей своей полноте), снижение pI константных доменов антитела (в том числе доменов, обнаруживаемых в антителах и продуктах слияния с Fc) может приводить к более длительному удержанию в сыворотке крови in vivo. Эти pI-варианты для увеличения периода полужизни в сыворотке крови также содействуют изменению pI для очистки.

Гетеродимерные слитые белки по настоящему изобретению могут принимать различные конфигурации, как в общем изображено на фиг. 18A-I. На некоторых фигурах изображены "односторонние" конфигурации, где на одном "плече" молекулы существует один тип специфичности, а на другом "плече" молекулы существует другой тип специфичности. На других фигурах изображены "двусторонние" конфигурации, когда существует по меньшей мере один тип специфичности на "вершине" молекулы и один или несколько других типов специфичности у "основания" молекулы. Один гетеродимерный остов, который находит применение в настоящем изобретении, представляет собой остов формата "тройной F" или "открывалка", как изображено на фиг. 18A и описано выше. Имеется несколько очевидных преимуществ формата "тройной F". Аналоги антител, в основе которых лежат две конструкции scFv, часто имеют проблемы со стабильностью и агрегацией, которые можно облегчить с помощью конструкции, описанной в данном документе, путем добавления "обычного" спаривания тяжелой и легкой цепей. Кроме того, в отличие от форматов, в основе которых лежат две тяжелые цепи и две легкие цепи, отсутствуют проблемы с неправильным спариванием тяжелых и легких цепей (например, если 1-я тяжелая спаривается со 2-й легкой и т.д.). Дополнительные применимые форматы антигенсвязывающих белков описаны ниже.

В различных аспектах scFv гетеродимерного антитела содержит последовательности CDR, связывающие CD3, описанные в данном документе. Например, в различных аспектах scFv содержит vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 170, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 171, vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 172, vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 174, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 175, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 176. Например, scFv необязательно содержит вариабельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 169 и вариабельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 173. В различных аспектах scFv содержит последовательность под SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 19, например, аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 44. Последовательности, представленные на фиг. 19, обеспечивают антигенсвязывающие домены с различной аффинностью. При некоторых показаниях может быть предпочтительна более сильная аффинность, тогда как при других может найти применение меньшая аффинность. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены гетеродимерные антитела, содержащие антигенсвязывающие домены, связывающие CD3, которые являются "сильными" или "высокоаффинными" средствами, связывающими CD3 (например, один из примеров представляет собой вариабельные домены тяжелой и легкой цепей, изображенные как H1.30_L1.47 (необязательно содержащие соответствующий заряженный линкер)). В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены гетеродимерные антитела, содержащие антигенсвязывающие домены, связывающие CD3, которые являются "слабыми" или "низкоаффинными" средствами, связывающими CD3.

Типичные линкеры scFv хорошо известны из уровня техники и обычно имеют длину от 10 до 25 аминокислот и содержат глициновые и сериновые остатки. Под "заряженным линкером scFv" подразумевается линкер scFv, в котором используются заряженные аминокислоты для применения в создании и очистке гетеродимерных антител, которые содержат по меньшей мере один scFv. Подходящие заряжен-

ные линкеры scFv показаны на фиг. 8A, 8B и 19, хотя можно использовать и другие. В целом, заряженные линкеры scFv, предусмотренные для применения в контексте настоящего изобретения, характеризуются изменением заряда с 3 до 8 (при этом возможны все из 3, 4, 5, 6, 7 или 8) по сравнению со стандартными незаряженными линкерами scFv, такими как традиционно используемые последовательности (GGGGS)3-5 (SEQ ID NO: 179) (с отрицательным или положительным зарядом). Заряженный scFv необязательно содержит аминокислотную последовательность, выбранную из IRPRAIGGSKPRVA (SEQ ID NO: 145), GKGGSGKGGSGKGGS (SEQ ID NO: 146), GGKGSGGKGSGGKGS (SEQ ID NO: 147), GGGKSGGGKSGGGKS (SEQ ID NO: 148), GKGKSGKGKSGKGKS (SEQ ID NO: 149), GGGKSGGKGSGKGGS (SEQ ID NO: 150), GKPGSGKPGSGKPGS (SEQ ID NO: 151), GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS (SEQ ID NO: 152) или GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS (SEQ ID NO: 153). В различных аспектах scFv содержит аминокислотную последовательность GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS (SEQ ID NO: 152).

В иллюстративных аспектах scFv содержит последовательности CDR, последовательности вариабельной области, последовательность линкера scFv или последовательность scFv, характеризующиеся по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризующиеся более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с любой из последовательностей, предусмотренных в данном документе (например, последовательностями CDR под любым одним или несколькими из SEQ ID NO: 4-6, 8-10, 11-17, 21, 23-25, 27-29, 30-35, 170-173 и 174-176, последовательностями вариабельной области под любым одним или несколькими из SEQ ID NO: 3, 7, 22, 26, 41, 42, 45, 46, 49, 50, 53, 54, 57, 58, 61, 62, 65, 66, 69, 70, 73, 74, 77, 78, 81, 82, 85, 86, 89, 90, 93, 94, 97, 98, 101, 102, 105, 106, 109, 110, 113, 114, 117, 118, 121, 122, 125, 126, 129, 130, 133, 134, 137, 138, 141, 142, 169, 173 и 182-186; последовательностью линкера scFv под любым из SEQ ID NO: 143-168 и/или последовательностью scFv под любым из SEQ ID NO: 19, 20, 38, 40, 43, 44, 47, 48, 51, 52, 55, 56, 59, 60, 63, 64, 67, 68, 71, 72, 75, 76, 79, 80, 83, 84, 87, 88, 91, 92, 95, 96, 99, 100, 104, 104, 107, 108, 111, 112, 115, 116, 119, 120, 123, 124, 127, 128, 131, 132, 135, 136, 139 и 140). Например, scFv может содержать последовательности CDR, представленные под любым одним или несколькими из SEQ ID NO: 4-6, 8-10, 11-17, 21, 23-25, 21-29, 30-35, 170-173 и 174-176, но содержащие одну или две аминокислотные замены. В качестве альтернативы в различных аспектах scFv может содержать последовательности вариабельной области, модифицированные по отношению к SEQ ID NO: 3, 7, 22, 26, 41, 42, 45, 46, 49, 50, 53, 54, 57, 58, 61, 62, 65, 66, 69, 70, 73, 74, 77, 78, 81, 82, 85, 86, 89, 90, 93, 94, 97, 98, 101, 102, 105, 106, 109, 110, 113, 114, 117, 118, 121, 122, 125, 126, 129, 130, 133, 134, 137, 138, 141, 142, 169, 173 или 182-186, где модификации находятся за пределами последовательностей CDR.

Первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи гетеродимерного антитела в различных аспектах содержат CDR или последовательности вариабельной области, связывающие STEAP1, описанные в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи гетеродимерного антитела содержат vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 14, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 21, и vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 16, и вариабельный домен легкой цепи содержит vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 11, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 12, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 13. В качестве альтернативы первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 33, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 34, и vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 35, и вариабельный домен легкой цепи содержит vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 30, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 31, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 32. В предпочтительных вариантах осуществления первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 182 или SEQ ID NO: 184, и вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 183. В качестве альтернативы первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 185, и вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 186.

В различных аспектах настоящего изобретения гетеродимерное антитело содержит a) первый мономер, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 19 или 20, второй мономер, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 18, и общую легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 17; или b) первый мономер, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 38, второй мономер, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 37, и общую легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 36.

В различных аспектах настоящего изобретения гетеродимерное антитело содержит первый мономер, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 202 или 207, второй мономер, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 201 или 203, и общую легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 200 (например, первый мономер, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 202, второй мономер, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 201, и легкую цепь, содержащую после-

довательность под SEQ ID NO: 200; или первый мономер, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 207, второй мономер, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 203, и легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 200). В качестве альтернативы гетеродимерное антитело может содержать первый мономер, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 206, второй мономер, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 205, и общую легкую цепь, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 204.

В иллюстративных аспектах первый и/или второй вариабельные домены тяжелой цепи могут содержать последовательности CDR или последовательности вариабельной области, характеризующиеся по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризующиеся более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с любой из последовательностей, предусмотренных в данном документе (например, последовательностями CDR под любым одним или несколькими из SEQ ID NO: 4-6, 14-17, 21, 23-25, 33-35 и 170-172 или последовательностями вариабельной области под любым из SEQ ID NO: 3, 22, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 141, 169, 182, 184 и 185). Например, первый и/или второй вариабельный домен тяжелой цепи может содержать последовательности CDR, представленные под любым одним или несколькими из SEQ ID NO: 4-6, 14-17, 21, 23-25, 33-35 и 170-172, но содержащие одну или две аминокислотные замены. В качестве альтернативы в различных аспектах первый и/или второй вариабельный домен тяжелой цепи может содержать последовательности вариабельной области, модифицированные по отношению к SEQ ID NO: 3, 22, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 141, 169, 182, 184 или 185, где модификации находятся за пределами последовательностей CDR. Аналогичным образом, вариабельный домен легкой цепи может содержать последовательности CDR или последовательности вариабельной области, характеризующиеся по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризующиеся более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с любой из последовательностей, предусмотренных в данном документе (например, последовательностями CDR под любым одним или несколькими из SEQ ID NO: 8-10, 11-13, 27-29, 30-32 и 174-176 или последовательностями вариабельной области под любым из SEQ ID NO: 7, 26, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142, 173, 183 и 186) в различных аспектах. Например, вариабельный домен легкой цепи может содержать последовательности CDR, представленные под любым одним или несколькими из SEQ ID NO: 8-10, 11-13, 27-29, 30-32 и 174-176, но содержащие одну или две аминокислотные замены. В качестве альтернативы в различных аспектах вариабельный домен легкой цепи может содержать последовательности вариабельной области, модифицированные по отношению к SEQ ID NO: 7, 26, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142, 173, 183 или 186, где модификации находятся за пределами последовательностей CDR. При необходимости первый мономер может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризующуюся более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с любой из последовательностей, предусмотренных в данном документе (SEQ ID NO: 19, 20, 38, 202, 206 или 207); второй мономер может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризующуюся более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с любой из последовательностей, предусмотренных в данном документе (SEQ ID NO: 18, 199 или 37 или SEQ ID NO: 202, 207 или 206); и/или общая легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризующуюся более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с любой из последовательностей, предусмотренных в данном документе (SEQ ID NO: 17, 36, 200 или 204).

В некоторых вариантах осуществления используют полноразмерное гетеродимерное антитело. Под "полноразмерной" подразумевается структура, которая составляет естественную биологическую форму

антитела, в том числе вариабельные и константные области, включающие одну или несколько модификаций, как описано в данном документе. Гетеродимерное антитело по настоящему изобретению может быть моноклональным, синтетическим, химерным и/или гуманизированным. Фрагменты антигенсвязывающего антитела в качестве составной части гетеродимерного антитела содержат по меньшей мере один константный домен, который может быть сконструирован для получения гетеродимеров, как, например, путем pI-конструирования. Другие фрагменты антител включают фрагменты, которые содержат один или несколько из CH1-, CH2-, CH3-, шарнирных и CL-доменов по настоящему изобретению, которые были получены путем pI-конструирования. Например, продукты слияния Fc представляют собой продукты слияния Fc-области (CH2 и CH3, необязательно с шарнирной областью) с другим белком. Ряд продуктов слияния Fc известен из уровня техники и может быть улучшен с помощью добавления вариантов гетеродимеризации по настоящему изобретению. Могут быть получены продукты слияния на основе антител, содержащие CH1; CH1, CH2 и CH3; CH2; CH3; CH2 и CH3; CH1 и CH3, любой или все из которых могут быть получены необязательно с шарнирной областью с использованием любой комбинации вариантов гетеродимеризации, описанных в данном документе.

Антигенсвязывающие белки, в том числе гетеродимерные антитела, по настоящему изобретению, как правило, являются выделенными или рекомбинантными. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полное гетеродимерное антитело, описанное в данном документе, или его часть, векторы и клетки-хозяева описаны в данном документе и рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Модификации структуры антитела/Fc-области.

Настоящее изобретение включает антитела с модифицированными Fc-вариантами, имеющими аминокислотные модификации по отношению к последовательности антитела дикого типа. Варианты определяются в соответствии с аминокислотными модификациями, которые их образуют. Таким образом, например, N434S или 434S представляет собой Fc-вариант с замещающим серином в положении 434 по отношению к исходному Fc-полипептиду, где нумерация соответствует EU-индексу. Аналогично, M428L/N434S обозначает Fc-вариант с заменами M428L и N434S по отношению к исходному Fc-полипептиду. Идентичность аминокислоты дикого типа может не быть определена, и в таком случае указанный выше вариант упоминается как 428L/434S. Порядок, в котором представляются замены, является произвольным, то есть, например, 428L/434S представляет собой тот же Fc-вариант, что и M428L/N434S, и так далее. Модификация может представлять собой добавление, делецию или замену. Замены могут включать встречающиеся в природе аминокислоты и, в некоторых случаях, синтетические аминокислоты. Примеры включают патент США № 6586207; публикацию заявки на патент США № 20040214988; международные публикации заявок на патент №№ WO 98/48032, WO 03/073238; WO 05/35727A2 и WO 05/74524A2; J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), Chem. BioChem. 11: 1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), PICAS United States of America 99: 11020-11024; и L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. 1-10, все из которых полностью включены посредством ссылки.

Для всех положений, обсуждаемых в настоящем изобретении, которые относятся к антителам и другим антигенсвязывающим белкам, если не указано иное, нумерация аминокислотных положений соответствует EU-индексу. EU-индекс, или EU-индекс по Kabat, или схема нумерации EU относится к нумерации антитела EU (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63: 78-85, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). Например, понятно, что каждая вариабельная область тяжелой цепи (VH) и вариабельная область легкой цепи (VL) состоит из трех гипервариабельных областей ("областей, определяющих комплементарность", "CDR") и четырех FR, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Гипервариабельная область обычно охватывает аминокислотные остатки приблизительно из аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1; "L" обозначает легкую цепь), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в вариабельной области легкой цепи и около приблизительно 31-35B (HCDR1; "H" обозначает тяжелую цепь), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в вариабельной области тяжелой цепи; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), и/или те остатки, которые образуют гипервариабельную петлю (например, остатки 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3) в вариабельной области легкой цепи и 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) и 96-101 (HCDR3) в вариабельной области тяжелой цепи; Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917).

Как будет понятно специалистам в данной области, точная нумерация и размещение CDR могут отличаться в разных системах нумерации. Однако следует понимать, что раскрытие последовательности вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи включает раскрытие соответствующих (присущих им) CDR. Соответственно, раскрытие каждой вариабельной области тяжелой цепи представляет собой раскрытие vhCDR (например, vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3), и раскрытие каждой вариабельной области легкой цепи представляет собой раскрытие vlCDR (например, vlCDR1, vlCDR2 и vlCDR3). Применимое сравнение нумерации CDR приведено ниже, см. Lafranc et al, Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77 (2003):

	Kabat+ Chothia	IMGT	Kabat	AM	Chothia	Контактирующие
vhCDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
vhCDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
vhCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
vlCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
vlCDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
vlCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

Во всем настоящем описании обычно используется система нумерации Kabat, когда она относится к остатку в вариабельном домене (примерно остатки 1-107 вариабельной области легкой цепи и остатки 1-113 вариабельной области тяжелой цепи) (например, Kabat et al., выше (1991)).

Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, которая несет основную ответственность за эффекторную функцию. Kabat et al. собрали многочисленные первичные последовательности вариабельных областей тяжелых цепей и легких цепей. Исходя из степени консервативности последовательностей, они классифицировали отдельные первичные последовательности на CDR и каркасную область и составили их перечень (см. SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et al., которая полностью включена посредством ссылки).

Подкласс иммуноглобулинов IgG характеризуется наличием нескольких доменов иммуноглобулина в тяжелой цепи. Под "доменом иммуноглобулина (Ig)" в данном документе подразумевается область иммуноглобулина, характеризующаяся четкой третичной структурой. Представляют интерес домены тяжелой цепи, в том числе константные домены тяжелой цепи (CH) и шарнирные домены. В случае с антителами IgG каждый изотип IgG имеет три CH-области. Соответственно, "CH"-домены в случае с IgG являются следующими: "CH1" относится к положениям 118-220 согласно EU-индексу по Kabat. "CH2" относится к положениям 237-340 согласно EU-индексу по Kabat, а "CH3" относится к положениям 341-447 согласно EU-индексу по Kabat. Как показано в данном документе и описано ниже, одна или несколько CH-областей, а также шарнирная область могут содержать pI-варианты, как обсуждается ниже. В различных аспектах изображенные в данном документе последовательности начинаются в CH1-области, положение 118; вариабельные области не включены, если не указано иное.

Другой тип домена тяжелой цепи Ig представляет собой шарнирную область. Под "шарниром", или "шарнирной областью", или "шарнирной областью антитела", или "шарнирной областью иммуноглобулина" в данном документе подразумевается гибкий полипептид, содержащий аминокислоты между первым и вторым константными доменами антитела. В структурном отношении CH1-домен IgG заканчивается в положении EU 220, а CH2-домен IgG начинается в положении остатка EU 237. Таким образом, в случае с IgG шарнирная область антитела определяется в данном документе как включающая положения с 221 (D221 в IgG1) до 236 (G236 в IgG1), где нумерация соответствует EU-индексу по Kabat. В некоторых вариантах осуществления, например, в случае с Fc-областью, включена нижняя шарнирная область, причем "нижняя шарнирная область", как правило, относится к положениям 226 или 230. Как отмечено в данном документе, pI-варианты также могут быть получены в шарнирной области.

Под "Fc", или "Fc-областью", или "Fc-доменом", используемыми в данном документе, подразумевается полипептид, содержащий константную область антитела за исключением первого домена константной области иммуноглобулина и, в некоторых случаях, части шарнирной области. Таким образом, Fc относится к последним двум доменам константной области иммуноглобулинов IgA, IgD и IgG, последним трем доменам константной области иммуноглобулинов IgE и IgM и гибкой шарнирной области, расположенной со стороны N-конца по отношению к этим доменам. В случае с IgA и IgM Fc может содержать J-цепь. В случае с IgG Fc-домен содержит домены иммуноглобулинов Cγ2 и Cγ3 (Cγ2 и Cγ3) и нижнюю шарнирную область между Cγ1 (Cγ1) и Cγ2 (Cγ2). Хотя границы Fc-области могут варьироваться, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяется с включением остатков C226 или P230 в ее карбоксильный конец, где нумерация соответствует EU-индексу по Kabat.

Аминокислотные варианты могут быть введены в антигенсвязывающий белок (например, биспецифическое антитело) по настоящему изобретению для добавления дополнительных функциональных свойств. Например, могут быть добавлены аминокислотные изменения в Fc-области (либо в одном мономере, либо в обоих) для содействия усилению ADCC или CDC (например, измененному связыванию с рецепторами Fcγ), для обеспечения или увеличения выхода добавленных токсинов и лекарственных средств (например, для ADC), а также для увеличения связывания с FcRn и/или увеличения периода полужизни образующихся молекул в сыворотке крови. Эффекторные функции, которые можно регулировать путем изменения аминокислотной последовательности, включают без ограничения ADCC, ADCP и CDC. Любые возможные варианты, описанные в данном документе, могут необязательно и независимо комбинироваться с другими вариантами.

Под термином "FcRn" или "неонатальный Fc-рецептор" подразумевается белок, который связывается с Fc-областью антитела IgG и по меньшей мере частично кодируется геном FcRn. FcRn может происходить из любого организма, включая без ограничения людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Как известно из уровня техники, функциональный белок FcRn содержит два полипептида, часто называемых

тяжелой цепью и легкой цепью. Легкая цепь представляет собой бета-2-микроглобулин, а тяжелая цепь кодируется геном FcRn. Если в данном документе не указано иное, FcRn или белок FcRn относятся к комплексу тяжелой цепи FcRn с бета-2-микроглобулином. Различные варианты FcRn используются для повышения связывания с рецептором FcRn и, в некоторых случаях, для увеличения периода полужизни в сыворотке крови. Fc-варианты, обеспечивающие повышенное связывание с рецептором FcRn и соответствующее увеличение периода полужизни в сыворотке крови, включают без ограничения 434A, 434S, 428L, 3O8F, 259I, 428L/434S, 259I/308F, 436I/428L, 436I или V/434S, 436V/428L, 252Y, 252Y/254T/256E и 259I/308F/428L. Для ясности, поскольку каждая тяжелая цепь отличается от других, FcRn-варианты (а также Fc-варианты) могут находиться в одном или обоих мономерах.

Другой категорией функциональных вариантов являются "варианты с устранением связывания с FcγR" или "варианты с нокаутом Fc (FcKO или KO)". В этих вариантах осуществления для некоторых терапевтических путей применения желательно снизить или устранить нормальное связывание Fc-домена с одним или несколькими или всеми из Fcγ-рецепторов (например, FcγR1, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa и т.д.), чтобы избежать дополнительных механизмов действия. Под термином "Fc-гамма-рецептор", "FcγR" или "Fc-гамма-R" подразумевается любой представитель семейства белков, который связывает Fc-область антитела IgG и кодируется геном FcγR. У человека это семейство включает без ограничения FcγRI (CD64), в том числе изоформы FcγRIa, FcγRIb и FcγRIc; FcγRII (CD32), в том числе изоформы FcγRIIa (включая аллотипы H131 и R131), FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2) и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), в том числе изоформы FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и FcγRIIIb (включая аллотипы FcγRIIb-NA1 и FcγRIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65, полностью включенная посредством ссылки). FcγR может происходить из любого организма, включая без ограничения людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. FcγR мыши включают без ограничения FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) и FcγRIII-2 (CD16-2). Во многих вариантах осуществления обычно желательно устранить связывание с FcγRIIIa для исключения или значительного снижения активности ADCC. На фиг. 36 патента США № 9822186 показано применение варианта с нокаутом Fc (или варианта с устранением связывания), который сохраняет стабильность дикого типа, но в котором полностью устранено связывание с FcγR.

Иллюстративные варианты с устранением связывания включают варианты, выбранные из группы, состоящей из G236R/L328R, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G и E233P/L234V/L235A/G236del. Следует отметить, что в вариантах с устранением связывания, упоминаемых в данном документе, устранено связывание с FcγR, но, как правило, не связывание с FcRn.

Как известно из уровня техники, Fc-домен IgG1 человека характеризуется наиболее высоким связыванием с Fcγ-рецепторами и, таким образом, можно использовать варианты с устранением связывания, если константный домен (или Fc-домен) в остове гетеродимерного антитела представляет собой IgG1. В качестве альтернативы или в дополнение к вариантам с устранением связывания в окружении IgG1, мутации в положении гликозилирования 297 (обычно по типу замены на A или S) могут, например, приводить к значительному устранению связывания с FcγRIIIa. IgG2 и IgG4 человека обладают естественным пониженным связыванием с Fcγ-рецепторами и, таким образом, эти остовы можно использовать с вариантами с устранением связывания или без них.

Дезамидирование может серьезно повлиять на активность и стабильность антител. В различных аспектах гетеродимерное антитело содержит одну или несколько замен для удаления сайтов дезамидирования. В этом отношении гетеродимерное антитело необязательно содержит замену в положении N67, такую как замена N67Q.

Константные области тяжелой цепи гетеродимерных антител.

В настоящем изобретении предусмотрены гетеродимерные антитела, в основе которых лежит использование мономеров, содержащих варианты константных областей тяжелой цепи в качестве первого домена. Под "мономером" в данном документе подразумевается половина гетеродимерного белка. Следует отметить, что традиционные антитела фактически являются тетрамерными (две тяжелые цепи и две легкие цепи). Для простоты ссылки в контексте настоящего изобретения пара, содержащая тяжелую цепь и легкую цепь, рассматривается как "мономер". Область тяжелой цепи, содержащая scFv (и в некоторых случаях Fab), рассматривается как мономер. По существу, каждый мономер содержит константную область тяжелой цепи, достаточную для обеспечения возможности конструирования гетеродимеризации, будь то вся константная область, например, CH1-шарнирная область-CH2-CH3, Fc-область (CH2-CH3) или только CH3-домен.

Варианты константных областей тяжелой цепи могут включать всю константную область тяжелой цепи или ее часть, в том числе полноразмерную конструкцию CH1-шарнирная область-CH2-CH3 или ее части, в том числе, например, CH2-CH3 или только CH3. Кроме того, область тяжелой цепи каждого мономера может иметь один и тот же остов (CH1-шарнирная область-CH2-CH3 или CH2-CH3) или разные остовы. N- и C-концевые усечения и добавления также включены в определение; например, некоторые

pI-варианты включают добавление заряженных аминокислот к С-концу домена тяжелой цепи.

В дополнение к вариантам гетеродимеризации (например, стерическим вариантам и pI-вариантам), описанным в данном документе, области тяжелой цепи могут также содержать дополнительные аминокислотные замены, в том числе замены для изменения связывания с FcγR и FcRn.

Варианты гетеродимеризации включают ряд различных типов вариантов, в том числе без ограничения стерические варианты (включая варианты, отличающиеся зарядами) и pI-варианты, которые можно необязательно и независимо комбинировать с любыми другими вариантами. В данных вариантах осуществления важно привести в соответствие "мономер А" с "мономером В", иными словами, если в основе гетеродимерного белка лежат как стерические варианты, так и pI-варианты, они должны быть правильно соответствовать каждому мономеру, например, набор функционирующих стерических вариантов (1 набор на мономер А, 1 набор на мономер В) комбинируется с наборами pI-вариантов (1 набор на мономер А, 1 набор на мономер В), так что варианты для каждого мономера предназначены для достижения желаемой функции. В случае, например, когда стерические варианты также могут изменять заряд, правильные наборы должны соответствовать правильному мономеру.

Варианты гетеродимеризации, описанные в данном документе (например, в том числе без ограничения варианты, показанные на фигурах), могут быть необязательно и независимо комбинироваться с любыми другими вариантами и с любым другим мономером. Что важно для гетеродимеризации, так это то, что существуют "наборы" вариантов - один набор для одного мономера и один набор для другого. Не имеет значения, комбинируются ли они 1 к 1 (например, могут сочетаться списки для мономера 1) или перекрестно (pI-варианты мономера 1 со стерическими вариантами мономера 2). Тем не менее, при создании комбинаций, описанных выше, должна сохраняться "переплетенность", чтобы гетеродимеризация была предпочтительной; например, варианты, отличающиеся зарядами, которые увеличивают pI, следует использовать с вариантами с увеличенным значением pI и/или линкером scFv с увеличенным значением pI и т.д. Под "переплетенностью" в случае с мономерами гетеродимерных белков понимается то, что аналогично двум нитям ДНК, которые "соответствуют" друг другу, варианты гетеродимеризации включаются в каждый мономер таким образом, чтобы сохранить способность к "соответствию" друг другу с образованием гетеродимеров. Например, если некоторые pI-варианты встроены в мономер А (например, что повышает pI), тогда стерические варианты, являющиеся "зарядовыми парами", которые также могут использоваться, не препятствуют pI-вариантам, например, варианты, отличающиеся зарядами, которые повышают pI, помещают на одну и ту же "нить" или "мономер" для сохранения обоих функциональных свойств. Кроме того, в случае с дополнительными Fc-вариантами (как, например, в случае с вариантами связывания с FcγR, связывания с FcRn, вариантами с устранением связывания и т.д.) любой из мономеров либо оба мономера могут независимо и необязательно содержать любой из перечисленных вариантов. В некоторых случаях оба мономера имеют дополнительные варианты, а в некоторых только один мономер имеет дополнительные варианты, или они могут комбинироваться.

Стерические варианты.

В некоторых вариантах осуществления образование гетеродимеров облегчается путем добавления стерических вариантов. Иными словами, при изменении аминокислот в каждой тяжелой цепи разные тяжелые цепи с большей вероятностью связываются с образованием гетеродимерной структуры, чем с образованием гомодимеров с теми же самыми аминокислотными последовательностями Fc. Иллюстративные подходящие стерические варианты показаны на фигурах.

Одним из механизмов получения стерических вариантов является описанный выше механизм "выступов и впадин". Дополнительный механизм, который находит применение при создании гетеродимеров, иногда называют "электростатическим наведением", как описано в Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285(25): 19637 (2010), включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Это иногда упоминается в данном документе как "зарядовые пары". В этом варианте осуществления используют электростатические взаимодействия для обеспечения асимметрии образования в сторону гетеродимеризации. Они могут также оказывать влияние на pI и, следовательно, на очистку, и поэтому в некоторых случаях также могут рассматриваться в качестве pI-вариантов. Однако поскольку их создавали для усиления гетеродимеризации и не использовали в качестве инструментов для очистки, их классифицируют как "стерические варианты". Они включают без ограничения варианты, приводящие к более чем 75% гетеродимеризации, такие как D221E/P228E/L368E в паре с D221R/P228R/K409R (например, они представляют собой "соответствующие мономерам наборы") и C220E/P228E/368E в паре с C220R/E224R/P228R/K409R.

В некоторых вариантах осуществления асимметричные варианты преимущественно и одновременно способствуют гетеродимеризации, основанной как на механизме "выступов и впадин", так и на механизме "электростатического наведения". Эти варианты доступны в "парах" "наборов". То есть один набор из пары включается в первый мономер, а другой набор из пары включается во второй мономер. Следует отметить, что эти наборы не обязательно ведут себя как варианты по типу "выступов во впадинах" с соответствием один к одному между остатком в одном мономере и остатком в другом. То есть эти пары наборов могут вместо этого образовывать область контакта между двумя мономерами, которая способст-

вует образованию гетеродимеров и препятствует образованию гомодимеров, что позволяет получить процентную долю гетеродимеров, которые спонтанно образуются в биологических условиях, составляющую более 90%, а не ожидаемые 50% (25% гомодимера A/A:50% гетеродимера A/B:25% гомодимера B/B). Типичные "асимметричные" варианты гетеродимеризации изображены на фиг. 4. Примеры таких асимметричных вариантов включают пары наборов мутаций, включающих без ограничения S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L, K370S: S364K/E357Q и T366S/L368A/Y407V: T366W (необязательно включая дисульфидный мостик - T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C).

Дополнительные варианты мономера A и мономера B, которые можно комбинировать с другими вариантами, необязательно и независимо в любом количестве, такими как pI-варианты, приведенные в данном документе, или другие стерические варианты, которые показаны на фиг. 37 публикации заявки на патент США № 2012/0149876, фигура и условные обозначения из которой в явной форме включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе стерические варианты могут быть необязательно и независимо включены с любыми вариантами гетеродимеризации, в том числе с pI-вариантами (или другими вариантами, такими как Fc-варианты, FcRn-варианты, варианты с устранением связывания и т.д.), в один или оба мономера.

pI-варианты (варианты с измененной изоэлектрической точкой) для гетеродимеров.

В целом, существуют две категории pI-вариантов: те, которые повышают pI белка (основные изменения) и те, которые понижают pI белка (кислые изменения). Как описано в данном документе, могут быть осуществлены все комбинации этих вариантов: один мономер может относиться к дикому типу или может представлять собой вариант, который не демонстрирует существенных отличий pI от дикого типа, а другой может быть либо более щелочным, либо более кислым. В качестве альтернативы изменяют каждый мономер, один на более основный, а другой на более кислый. Иллюстративные комбинации pI-вариантов показаны на фигурах.

В различных вариантах осуществления, например, в форматах на фиг. 18A, E, F, G, H и I, предпочтительная комбинация pI-вариантов имеет один мономер (отрицательная Fab-сторона), содержащий варианты 208D/295E/384D/418E/421D (N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D по отношению к IgG1 человека), и второй мономер (положительная scFv-сторона), содержащий положительно заряженный линкер scFv, в том числе $(GKPGS)_4$. Однако, как будет понятно специалистам в данной области, первый мономер содержит CH1-домен, в том числе положение 208. Соответственно, в конструкциях, которые не содержат CH1-домен (например, в случае с антителами, в которых не используется CH1-домен в качестве одного из доменов, например, в формате с двумя scFv или в "одноплечевом" формате, таком как те, что изображены на фиг. 18B, C или D), предпочтительный набор отрицательных pI-вариантов Fc включает варианты 295E/384D/418E/421D (Q295E/N384D/Q418E/N421D по отношению к IgG1 человека).

Кислые изменения pI.

Если один мономер, содержащий вариант константного домена тяжелой цепи, необходимо сделать более положительно заряженным (например, снизить pI), то в контексте настоящего изобретения подходят одна или несколько из следующих модификаций (например, замен): S119E, K133E, K133Q, T164E, K205E, K205Q, N208D, K210E, K210Q, K274E, K320E, K322E, K326E, K334E, R355E, K392E, делеция K447, добавление пептида DEDE на C-конце, G137E, N203D, K274Q, R355Q, K392N и Q419E. Эти изменения описаны применительно к IgG1, но таким образом можно изменить все изотипы, а также гибриды изотипов. В случае, когда константный домен тяжелой цепи получен из IgG2-4, можно также использовать R133E и R133Q.

Основные изменения pI.

Если один мономер, содержащий вариант константного домена тяжелой цепи, необходимо сделать более отрицательно заряженным (например, повысить pI), то в контексте настоящего изобретения подходят одна или несколько из следующих иллюстративных замен: Q196K, P217R, P228R, N276K и H435R. Эти изменения описаны применительно к IgG1, но таким образом можно изменить все изотипы, а также гибриды изотипов.

Варианты легкой цепи гетеродимерного антитела.

pI-варианты также могут быть получены в легкой цепи антитела. Аминокислотные модификации для снижения pI легкой цепи включают без ограничения K126E, K126Q, K145E, K145Q, N152D, S156E, K169E, S202E, K207E и добавление пептида DEDE на C-конце легкой цепи. Изменения в этой категории, производимые исходя из константного домена легкой лямбда-цепи, включают без ограничения одну или несколько из замен R108Q, Q124E, K126Q, N138D, K145T и Q199E. Кроме того, повышение pI легкой цепи также возможно и предусмотрено в различных аспектах настоящего изобретения.

Изотипические варианты.

Кроме того, различные варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают "внесение" pI-аминокислот в определенных положениях из одного изотипа IgG в другой, что тем самым приводит к снижению или устранению возможности введения нежелательной иммуногенности в варианты. Ряд них показан на фиг. 21 публикации заявки на патент США № 2014/0370013, включенной в данный доку-

мент посредством ссылки. Иными словами, IgG1 является распространенным изотипом для терапевтических антител по множеству причин, включая высокую эффекторную функцию. Однако константный участок тяжелой цепи IgG1 характеризуется более высокой pI, чем у IgG2 (8,10 по сравнению с 7,31). Путем введения остатков IgG2 в определенных положениях в остов IgG1 pI полученного мономера снижается (или повышается), и дополнительно проявляется более длительный период полужизни в сыворотке крови. Например, IgG1 содержит глицин (pI 5,97) в положении 137, а IgG2 содержит глутаминовую кислоту (pI 3,22); внесение глутаминовой кислоты будет влиять на pI полученного белка. Обычно требуется ряд аминокислотных замен, чтобы оказать значительное влияние на pI варианта антитела. Однако следует отметить, как обсуждается ниже, что даже изменения в молекулах IgG2 позволяют увеличить период полужизни в сыворотке крови.

В других вариантах осуществления осуществляют неизотипические аминокислотные замены для снижения общего зарядового состояния получаемого белка (например, посредством замены аминокислоты с более высокой pI на аминокислоту с более низкой pI) либо для обеспечения приспособленности структуры для целей стабильности и т.п.

Кроме того, при pI-конструировании константных доменов как тяжелых, так и легких цепей можно наблюдать значительные изменения в каждом мономере гетеродимера. Как обсуждается в данном документе, если pI двух мономеров отличается по меньшей мере на 0,5, это может обеспечивать возможность разделения с помощью ионообменной хроматографии или изоэлектрического фокусирования или других способов, чувствительных к изоэлектрической точке.

Кроме того, pI-варианты, которые являются изостерическими, например варианты, отличающиеся зарядами, которые имеют примерно такой же размер, как и исходная аминокислота, могут быть получены и предусматриваются в данном документе.

Расчет pI.

Значение pI каждого мономера может зависеть от pI варианта константного домена тяжелой цепи и pI полного мономера, включая вариант константного домена тяжелой цепи и партнера по слиянию. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изменение pI рассчитывают, исходя из варианта константного домена тяжелой цепи. В качестве альтернативы, можно сравнить pI каждого мономера. Аналогичным образом рассчитываются pI "начальных" вариабельных областей (например, scFv или Fab), чтобы получить информацию о том, какой мономер будет сконструирован в каком направлении.

pI-варианты, способствующие лучшему связыванию с FcRn in vivo.

pI-варианты, уменьшающие pI мономера, могут демонстрировать дополнительное преимущество улучшения удержания в сыворотке крови in vivo.

Считается, что Fc-области имеют более продолжительный период полужизни in vivo, поскольку связывание с FcRn при pH 6 в эндосоме секвестрирует Fc (Ghetie and Ward, 1997 Immunol Today. 18(12): 592-598, включенная в данный документ посредством ссылки). Затем Fc возвращается из эндосомального компартмента на поверхность клетки. После того, как компартмент открывается во внеклеточное пространство, более высокий pH, ~7,4, вызывает высвобождение Fc обратно в кровь. Считается, что повышенная аффинность Fc к FcRn при pH 7,4 препятствует высвобождению Fc обратно в кровь. Следовательно, мутации Fc, которые увеличивают период полужизни Fc in vivo, в идеальном случае повышают связывание с FcRn при более низком pH, в то же время по-прежнему позволяя высвобождать Fc при более высоком pH. Аминокислота гистидин изменяет свое зарядовое состояние в диапазоне pH 6,0-7,4. Поэтому неудивительно обнаруживать остатки His в важных положениях в комплексе Fc/FcRn.

Недавно было высказано предположение, что антитела с вариабельными областями, которые имеют более низкие изоэлектрические точки, также могут иметь более длительный период полужизни в сыворотке крови (Igawa et al., 2010 PEDS. 23(5): 385-392, полностью включенная посредством ссылки). Варианты константной области со сниженной pI и увеличенным периодом полужизни обеспечивают более модульный подход к улучшению фармакокинетических свойств антител.

pI-варианты, которые находят применение в этом варианте осуществления, а также их применение для оптимизации очистки раскрыты на фигурах.

Комбинация вариантов.

Как будет понятно специалистам в данной области, все перечисленные варианты гетеродимеризации можно необязательно и независимо комбинировать любым способом, при условии, что они сохраняют свою "переплетенность" или "разделение мономеров". Кроме того, все эти варианты можно комбинировать в любом из форматов гетеродимеризации. В случае pI-вариантов, хотя иллюстративные варианты осуществления показаны на фигурах, можно создать другие комбинации, следуя основному правилу изменения различия pI между двумя мономерами для облегчения очистки.

Форматы антигенсвязывающих белков (например, антител).

Один гетеродимерный остов, который находит применение в контексте настоящего изобретения, представляет собой остов формата "тройной F" или "открывалка", описанный выше и представленный на фиг. 18. В этом варианте осуществления одна тяжелая цепь антитела содержит одноцепочечный Fv ("scFv", как определено ниже), а другая тяжелая цепь находится в "обычном" формате Fab, содержащем вариабельную область тяжелой цепи и легкую цепь. Многие из вариантов осуществления, изложенных в

данном документе, в целом основаны на формате "открывалка", который содержит первый мономер, содержащий scFv, который содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, ковалентно соединенные с помощью линкера scFv (заряженного во многих, но не во всех случаях), где scFv ковалентно присоединен к N-концу первого Fc-домена обычно с помощью линкера для доменов (который, как описано в данном документе, может быть незаряженным или заряженным и может быть экзогенным или эндогенным (например, представлять собой полный нативный шарнирный домен или его часть)). Второй мономер формата "открывалка" представляет собой тяжелую цепь, и композиция дополнительно содержит легкую цепь.

Кроме того, Fc-домены формата "открывалки" обычно содержат асимметричные варианты (например, выбранные из группы, состоящей из S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L, K370S: S364K/E357Q, T366S/L368A/Y407V: T366W и T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C), необязательно варианты с устранением связывания, необязательно заряженные линкеры scFv, и тяжелая цепь содержит pI-варианты. В некоторых вариантах осуществления формат "открывалка" включает асимметричные варианты, pI-варианты и варианты с устранением связывания. Соответственно, некоторые варианты осуществления включают форматы "открывалки", которые содержат: a) первый мономер ("scFv-мономер"), который содержит заряженный линкер scFv, асимметричные варианты S364K/E357Q, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и Fv; b) второй мономер ("Fab-мономер"), который содержит асимметричные варианты L368D/K370S, pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K и вариабельный домен тяжелой цепи, который вместе с вариабельным доменом легкой цепи составляет Fv, связывающийся со вторым антигеном; и c) легкую цепь.

В некоторых вариантах осуществления формат "открывалка" включает асимметричные варианты, pI-варианты, варианты с устранением связывания и FcRn-варианты. Соответственно, некоторые варианты осуществления включают форматы "открывалки", которые содержат: a) первый мономер ("scFv-мономер"), который содержит заряженный линкер scFv, асимметричные варианты S364K/E357Q, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, FcRn-варианты M428L/N434S и Fv, связывающийся с первым антигеном; b) второй мономер ("Fab-мономер"), который содержит асимметричные варианты L368D/K370S, pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, FcRn-варианты M428L/N434S и вариабельный домен тяжелой цепи, который вместе с вариабельным доменом легкой цепи составляет Fv, связывающийся со вторым антигеном; и c) легкую цепь.

Другой гетеродимерный остов, который находит применение в настоящем изобретении, представляет собой формат mAb-Fv, показанный на фиг. 18H. В этом варианте осуществления формат основан на применении C-концевого присоединения "дополнительного" вариабельного домена тяжелой цепи к одному мономеру и C-концевого присоединения "дополнительного" вариабельного домена легкой цепи к другому мономеру, в результате чего образуется третий антигенсвязывающий домен, где Fab-части двух мономеров связывают один антиген, а "дополнительный" scFv-домен связывает другой антиген.

В этом варианте осуществления первый мономер содержит первую тяжелую цепь, содержащую первый вариабельный домен тяжелой цепи и первый константный домен тяжелой цепи, содержащий первый Fc-домен, с первым вариабельным доменом легкой цепи, ковалентно присоединенным к C-концу первого Fc-домена с помощью линкера для доменов (vh1-CH1-[линкер для доменов (например, шарнирная область)]-CH2-CH3-[необязательный линкер для доменов]-v12). Второй мономер содержит второй вариабельный домен тяжелой цепи, второй константный домен тяжелой цепи, содержащий второй Fc-домен, и третий вариабельный домен тяжелой цепи, ковалентно присоединенный к C-концу второго Fc-домена с помощью линкера для доменов (vh1-CH1-линкер для доменов (например, шарнирная область)-CH2-CH3-[необязательный линкер для доменов]-vh2). Два присоединенных к C-концу вариабельных домена составляют scFv. В этом варианте осуществления дополнительно используется общая легкая цепь, содержащая вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, которая соединяется с тяжелыми цепями с образованием двух идентичных Fab. Что касается множества вариантов осуществления в данном документе, эти конструкции включают асимметричные варианты, pI-варианты, варианты с устранением связывания, дополнительные Fc-варианты и т.д., как необходимо и описано в данном документе.

Fc-домены формата mAb-Fv необязательно содержат асимметричные варианты (например, выбранные из группы, состоящей из S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L, K370S: S364K/E357Q, T366S/L368A/Y407V: T366W и T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C), необязательно варианты с устранением связывания, необязательно заряженные линкеры scFv, и тяжелая цепь содержит pI-варианты. В некоторых вариантах осуществления формат mAb-Fv включает асимметричные варианты, pI-варианты и варианты с устранением связывания. Соответственно, некоторые варианты осуществления включают форматы "открывалки", которые содержат: a) первый мономер, который содержит асимметричные варианты S364K/E357Q, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и первый ва-

риабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи в легкой цепи образует Fv, связывающийся с антигеном, и второй вариабельный домен тяжелой цепи; b) второй мономер, который содержит асимметричные варианты L368D/K370S, pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи образует Fv, связывающийся с первым антигеном, и второй вариабельный домен легкой цепи, который вместе со вторым вариабельным доменом тяжелой цепи образует Fv, связывающийся со вторым антигеном; и c) легкую цепь, содержащую первый вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи.

Еще один гетеродимерный остов, который находит применение в настоящем изобретении, представляет собой формат mAb-scFv, показанный на фиг. 18I. В этом варианте осуществления формат основан на применении C-концевого присоединения scFv к одному из мономеров, в результате чего образуется третий антигенсвязывающий домен, где Fab-части двух мономеров связывают один антиген, и "дополнительный" scFv-домен связывает другой антиген. В этом варианте осуществления первый мономер содержит первую тяжелую цепь (содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и константный домен) с ковалентно присоединенным к C-концу scFv, содержащим вариабельный домен легкой цепи scFv, линкер scFv и вариабельный домен тяжелой цепи scFv в любой ориентации (vh1-CH1-линкер для доменов-CH2-CH3-[необязательный линкер для доменов]-vh2-линкер scFv-v12 или vh1-CH1-линкер для доменов-CH2-CH3-[необязательный линкер для доменов]-v12-линкер scFv-vh2). В этом варианте осуществления дополнительно используется общая легкая цепь, содержащая вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, которая соединяется с тяжелыми цепями с образованием двух идентичных Fab, которые связывают один из антигенов-мишеней. Что касается множества вариантов осуществления в данном документе, эти конструкции включают асимметричные варианты, pI-варианты, варианты с устранением связывания, дополнительные Fc-варианты и т. д., как необходимо и описано в данном документе.

Кроме того, Fc-домены формата mAb-scFv необязательно содержат асимметричные варианты (например, выбранные из группы, состоящей из S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K;

L368D/K370S: S364K/E357L, K370S: S364K/E357Q, T366S/L368A/Y407V: T366W и T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C), необязательно варианты с устранением связывания, необязательно заряженные линкеры scFv, и тяжелая цепь содержит pI-варианты. В некоторых вариантах осуществления формат mAb-scFv включает асимметричные варианты, pI-варианты и варианты с устранением связывания. Соответственно, некоторые варианты осуществления включают форматы, которые содержат: a) первый мономер, который содержит асимметричные варианты S364K/E357Q, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи в легкой цепи образует Fv, связывающийся с первым антигеном, и второй вариабельный домен тяжелой цепи; b) второй мономер, который содержит асимметричные варианты L368D/K370S, pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи образует Fv, связывающийся с первым антигеном, и второй вариабельный домен легкой цепи, который вместе со вторым вариабельным доменом тяжелой цепи образует Fv, связывающийся со вторым антигеном; и c) легкую цепь, содержащую первый вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи.

Еще один гетеродимерный остов, который находит применение в настоящем изобретении, представляет собой формат с центральным scFv или формат "$XmAb^{2+1}$", показанный на фиг. 18F. Формат основан на применении вставленного scFv-домена, в результате чего образуется третий антигенсвязывающий домен, где Fab-части двух мономеров связывают одну мишень, а "дополнительный" scFv-домен связывает другую мишень. scFv-домен вставлен между Fc-доменом и CH1-Fv-областью одного из мономеров, обеспечивая таким образом третий антигенсвязывающий домен. В этом варианте осуществления один мономер содержит первую тяжелую цепь, содержащую первый вариабельный домен тяжелой цепи, CH1-домен (и необязательный линкер/шарнирную область) и Fc-домен, при этом scFv содержит вариабельный домен легкой цепи scFv, линкер scFv и вариабельный домен тяжелой цепи scFv. scFv ковалентно присоединен между C-концом CH1-домена константного домена тяжелой цепи и N-концом первого Fc-домена с помощью необязательных линкеров для доменов (VH1-CH1-[необязательный линкер для доменов]-VH2-линкер scFv-VL2-[необязательный линкер для доменов, в том числе шарнирная область]-CH2-CH3 или в противоположной ориентации относительно scFv-VH1-CH1-[необязательный линкер для доменов]-VL2-линкер scFv-VH2-[необязательный линкер для доменов, в том числе шарнирная область]-CH2-CH3). В некоторых вариантах осуществления первый мономер представляет собой VH1-CH1-линкер для доменов-VH2-линкер scFv-VL2-линкер для доменов-CH2-CH3. Другой мономер представляет собой стандартную Fab-сторону (т.е. VH1-CH1-линкер для доменов (например, шарнирная область)-CH2-CH3). В этом варианте осуществления дополнительно используется общая легкая цепь, содержащая вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, которая соединяется с тяжелыми

цепями с образованием двух идентичных Fab, которые связывают мишень. Что касается множества вариантов осуществления в данном документе, эти конструкции включают асимметричные варианты, pI-варианты, варианты с устранением связывания, дополнительные Fc-варианты и т.д., как необходимо и описано в данном документе.

В различных аспектах антигенсвязывающий белок содержит первую тяжелую цепь, содержащую VH1-CH1-[линкер для доменов]-VH2-линкер scFv-VL2-[линкер для доменов (необязательно включающий шарнирную область)]-CH2-CH3; вторую тяжелую цепь, содержащую VH1-CH1-линкер для доменов-CH2-CH3; и общую легкую цепь, содержащую VL1; где VH1 и VL1 связывают STEAP 1, а VH2 и VL2 связывают CD3. В этом формате VH2 необязательно содержит последовательности CDR под SEQ ID NO: 170 (CDR1), SEQ ID NO: 171 (CDR2) и SEQ ID NO: 172 (CDR3), тогда как VL2 содержит последовательности CDR под SEQ ID NO: 174 (CDR1), SEQ ID NO: 175 (CDR2) и SEQ ID NO: 176 (CDR3). VH1 содержит последовательности CDR под SEQ ID NO: 14 (CDR1), SEQ ID NO: 15 или 21 (CDR2) и SEQ ID NO: 16 (CDR3); и VL1 содержит последовательности CDR под SEQ ID NO: 11 (CDR1), SEQ ID NO: 12 (CDR2) и SEQ ID NO: 13 (CDR3). В качестве альтернативы VH1 содержит последовательности CDR под SEQ ID NO: 33 (CDR1), SEQ ID NO: 34 (CDR2) и SEQ ID NO: 35 (CDR3); и VL1 содержит последовательности CDR под SEQ ID NO: 30 (CDR1), SEQ ID NO: 31 (CDR2) и SEQ ID NO: 32 (CDR3). Антигенсвязывающий белок необязательно содержит модификации в первой тяжелой цепи, включая без ограничения E233P, delL234, L235V, G236A, S267K, r292c, n297g, v302c, E357Q и S364K (нумерация EU, где строчные буквы обозначают замены SEFL2, описанные далее в данном документе), а вторая тяжелая цепь содержит модификации, включая без ограничения N208D, E233P, delL234, L235V, G236A, S267K, r292c, Q295E, n297g, v302c, L368D, K370S, N384D, Q418E и N421D (нумерация EU, где строчные буквы обозначают замены SEFL2, описанные далее в данном документе). Линкер для использования в контексте данного варианта осуществления необязательно представляет собой GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS (SEQ ID NO: 152).

Fc-домены формата с центральным scFv необязательно содержат асимметричные варианты (например, выбранные из группы, состоящей из S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L, K370S: S364K/E357Q, T366S/L368A/Y407V: T366W и T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C), необязательно варианты с устранением связывания, необязательно заряженные линкеры scFv, и тяжелая цепь содержит pI-варианты. В некоторых вариантах осуществления формат с центральным scFv включает асимметричные варианты, pI-варианты и варианты с устранением связывания. Соответственно, некоторые варианты осуществления включают форматы, которые содержат: a) первый мономер, который содержит асимметричные варианты S364K/E357Q, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи в легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, и второй вариабельный домен тяжелой цепи; b) второй мономер, который содержит асимметричные варианты L368D/K370S, pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, и второй вариабельный домен легкой цепи, который вместе со вторым вариабельным доменом тяжелой цепи образует Fv, связывающийся со второй мишенью; и c) легкую цепь, содержащую первый вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи.

Другой гетеродимерный остов, который находит особое применение в настоящем изобретении, представляет собой формат с центральным Fv, показанный на фиг. 18G. Формат основан на применении вставленного scFv-домена, в результате чего образуется третий антигенсвязывающий домен, где Fab-части двух мономеров связывают одну мишень, а "дополнительный" scFv-домен связывает другую мишень. scFv-домен вставлен между Fc-доменом и CH1-Fv-областью одного из мономеров, обеспечивая таким образом третий антигенсвязывающий домен, где каждый мономер содержит компонент scFv (например, один мономер содержит вариабельный домен тяжелой цепи, а другой мономер содержит вариабельный домен легкой цепи). В этом варианте осуществления один мономер содержит первую тяжелую цепь, содержащую первый вариабельный домен тяжелой цепи, CH1-домен и Fc-домен, а также дополнительный вариабельный домен легкой цепи. Домен легкой цепи ковалентно присоединен между C-концом CH1-домена константного домена тяжелой цепи и N-концом первого Fc-домена с помощью линкеров для доменов (vh1-CH1-[необязательный линкер для доменов]-v12-шарнирная область-CH2-CH3). Другой мономер содержит первую тяжелую цепь, содержащую первый вариабельный домен тяжелой цепи, CH1-домен и Fc-домен, а также дополнительный вариабельный домен тяжелой цепи (vh1-CH1-[необязательный линкер для доменов]-vh2-шарнирная область-CH2-CH3). Домен легкой цепи ковалентно присоединен между C-концом CH1-домена константного домена тяжелой цепи и N-концом первого Fc-домена с помощью линкеров для доменов. В этом варианте осуществления дополнительно используется общая легкая цепь, содержащая вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, которая соединяется с тяжелыми цепями с образованием двух идентичных Fab, которые связывают мишень. Что касается множества вариантов осуществления в данном документе, эти конструкции вклю-

чают асимметричные варианты, pI-варианты, варианты с устранением связывания, дополнительные Fc-варианты и т.д., как необходимо и описано в данном документе.

Дополнительный гетеродимерный остов, который находит применение в контексте настоящего изобретения, представляет собой формат одноплечевого белка с центральным scFv, показанный на фиг. 18C. В этом варианте осуществления один мономер содержит только Fc-домен, тогда как в другом мономере применяется вставленный scFv-домен, в результате чего образуется второй антигенсвязывающий домен. В этом формате Fab-часть связывает одну мишень, а scFv связывает другую мишень. ScFv-домен вставлен между Fc-доменом и CH1-Fv-областью одного из мономеров. В этом варианте осуществления один мономер содержит первую тяжелую цепь, содержащую первый вариабельный домен тяжелой цепи, CH1-домен и Fc-домен, при этом scFv содержит вариабельный домен легкой цепи scFv, линкер scFv и вариабельный домен тяжелой цепи scFv. ScFv ковалентно присоединен между C-концом CH1-домена константного домена тяжелой цепи и N-концом первого Fc-домена с помощью линкеров для доменов. Второй мономер содержит Fc-домен. В этом варианте осуществления дополнительно используется легкая цепь, содержащая вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, которая соединяется с тяжелой цепью с образованием Fab. Что касается множества вариантов осуществления в данном документе, эти конструкции включают асимметричные варианты, pI-варианты, варианты с устранением связывания, дополнительные Fc-варианты и т. д., как необходимо и описано в данном документе.

Кроме того, Fc-домены формата одноплечевого белка с центральным scFv необязательно содержат асимметричные варианты (например, выбранные из группы, состоящей из S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L, K370S: S364K/E357Q, T366S/L368A/Y407V: T366W и T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C), необязательно варианты с устранением связывания, необязательно заряженные линкеры scFv, и тяжелая цепь содержит pI-варианты. В некоторых вариантах осуществления формат одноплечевого белка с центральным scFv включает асимметричные варианты, pI-варианты и варианты с устранением связывания. Соответственно, некоторые варианты осуществления включают форматы "открывалки", которые содержат: a) первый мономер, который содержит асимметричные варианты S364K/E357Q, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи в легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, и второй вариабельный домен тяжелой цепи; b) второй мономер, который содержит асимметричные варианты L368D/K370S, pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, и второй вариабельный домен легкой цепи, который вместе со вторым вариабельным доменом тяжелой цепи образует Fv, связывающийся со второй мишенью; и c) легкую цепь, содержащую первый вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления формат одноплечевого белка с центральным scFv включает асимметричные варианты, pI-варианты, варианты с устранением связывания и FcRn-варианты. Соответственно, некоторые варианты осуществления включают форматы, которые содержат: a) первый мономер, который содержит асимметричные варианты S364K/E357Q, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, FcRn-варианты M428L/N434S, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи в легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, и второй вариабельный домен тяжелой цепи; b) второй мономер, который содержит асимметричные варианты L368D/K370S, pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, FcRn-варианты M428L/N434S, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, как описано в данном документе, и второй вариабельный домен легкой цепи, который вместе со вторым вариабельным доменом тяжелой цепи образует Fv, связывающийся со второй мишенью; и c) легкую цепь, содержащую первый вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи.

Дополнительный гетеродимерный остов, который находит применение в настоящем изобретении, представляет собой формат одноплечевого mAb с scFv, показанный на фиг. 18D. В этом варианте осуществления один мономер содержит только Fc-домен, тогда как в другом мономере используется scFv-домен, присоединенный к N-концу тяжелой цепи, обычно с помощью линкера: vh-линкер scFv-vl-[необязательный линкер для доменов]-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 или (в противоположной ориентации) vl-линкер scFv-vh-[необязательный линкер для доменов]-CH1-шарнирная область-CH2-CH3. В этом формате Fab-часть связывает одну мишень, а scFv связывает другую мишень. В этом варианте осуществления дополнительно используется легкая цепь, содержащая вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, которая соединяется с тяжелой цепью с образованием Fab. Что касается множества вариантов осуществления в данном документе, эти конструкции включают асимметричные варианты, pI-варианты, варианты с устранением связывания, дополнительные Fc-варианты и т. д., как необходимо и описано в данном документе.

Fc-домены одноплечевого mAb с scFv содержат асимметричные варианты (например, выбранные из группы, состоящей из S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L, K370S: S364K/E357Q, T366S/L368A/Y407V: T366W и T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C), необязательно варианты с устранением связывания, необязательно заряженные линкеры scFv, и тяжелая цепь содержит pI-варианты. В некоторых вариантах осуществления формат одноплечевого mAb с scFv включает асимметричные варианты, pI-варианты и варианты с устранением связывания. Соответственно, некоторые варианты осуществления включают форматы "открывалки", которые содержат: a) первый мономер, который содержит асимметричные варианты S364K/E357Q, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи в легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, и второй вариабельный домен тяжелой цепи; b) второй мономер, который содержит асимметричные варианты L368D/K370S, pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, как описано в данном документе, и второй вариабельный домен легкой цепи, который вместе со вторым вариабельным доменом тяжелой цепи образует Fv, связывающийся со второй мишенью; и c) легкую цепь, содержащую первый вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления формат одноплечевого mAb с scFv включает асимметричные варианты, pI-варианты, варианты с устранением связывания и FcRn-варианты. Соответственно, некоторые варианты осуществления включают форматы "открывалки", которые содержат: a) первый мономер, который содержит асимметричные варианты S364K/E357Q, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, FcRn-варианты M428L/N434S, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи в легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, и второй вариабельный домен тяжелой цепи; b) второй мономер, который содержит асимметричные варианты L368D/K370S, pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, FcRn-варианты M428L/N434S, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, как описано в данном документе, и второй вариабельный домен легкой цепи, который вместе со вторым вариабельным доменом тяжелой цепи образует Fv, связывающийся со второй мишенью; и c) легкую цепь, содержащую первый вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи.

Другой гетеродимерный остов, который находит применение в настоящем изобретении, представляет собой формат mAb-scFv, показанный на фигуре 18E. В этом варианте осуществления формат основан на применении N-концевого присоединения scFv к одному из мономеров, в результате чего образуется третий антигенсвязывающий домен, где Fab-части двух мономеров связывают одну мишень, и "дополнительный" scFv-домен связывает другую мишень. В этом варианте осуществления первый мономер содержит первую тяжелую цепь (содержащую вариабельный домен тяжелой цепи и константный домен) с ковалентно присоединенным к N-концу scFv, содержащим вариабельный домен легкой цепи scFv, линкер scFv и вариабельный домен тяжелой цепи scFv в любой ориентации ((vh1-линкер scFv-vl1-[необязательный линкер для доменов]-vh2-CH1-шарнирная область-CH2-CH3) или (в противоположной ориентации относительно scFv) (vl1-линкер scFv-vh1-[необязательный линкер для доменов]-vl2-CH1-шарнирная область-CH2-CH3)). В этом варианте осуществления дополнительно используется общая легкая цепь, содержащая вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, которая соединяется с тяжелыми цепями с образованием двух идентичных Fab, которые связывают один из антигенов-мишеней. Что касается множества вариантов осуществления в данном документе, эти конструкции включают асимметричные варианты, pI-варианты, варианты с устранением связывания, дополнительные Fc-варианты и т. д., как необходимо и описано в данном документе.

Fc-домены формата scFv-mAb необязательно содержат асимметричные варианты (например, выбранные из группы, состоящей из S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L, K370S: S364K/E357Q, T366S/L368A/Y407V: T366W и T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C), необязательно варианты с устранением связывания, необязательно заряженные линкеры scFv, и тяжелая цепь содержит pI-варианты. В некоторых вариантах осуществления формат mAb-scFv включает асимметричные варианты, pI-варианты и варианты с устранением связывания. Соответственно, некоторые варианты осуществления включают форматы "открывалки", которые содержат: a) первый мономер, который содержит асимметричные варианты S364K/E357Q, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи в легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, и второй вариабельный домен тяжелой цепи; b) второй мономер, который содержит асимметричные варианты L368D/K370S, pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с пер-

вым вариабельным доменом легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, как описано в данном документе, и второй вариабельный домен легкой цепи, который вместе со вторым вариабельным доменом тяжелой цепи образует Fv, связывающийся со второй мишенью; и c) легкую цепь, содержащую первый вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления формат mAb-scFv включает асимметричные варианты, pI-варианты, варианты с устранением связывания и FcRn-варианты. Соответственно, некоторые варианты осуществления включают форматы "открывалки", которые содержат: a) первый мономер, который содержит асимметричные варианты S364K/E357Q, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, FcRn-варианты M428L/N434S, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи в легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, и второй вариабельный домен тяжелой цепи; b) второй мономер, который содержит асимметричные варианты L368D/K370S, pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, FcRn-варианты M428L/N434S, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, и второй вариабельный домен легкой цепи, который вместе со вторым вариабельным доменом тяжелой цепи образует Fv, связывающийся со второй мишенью; и c) легкую цепь, содержащую первый вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи.

В настоящем изобретении также предусмотрены форматы с двумя scFv, такие как изображенный на фиг. 18B. В этом варианте осуществления гетеродимерный антигенсвязывающий белок состоит из двух мономеров scFv-Fc (оба в формате (vh-линкер scFv-vl-[необязательный линкер для доменов]-CH2-CH3) либо в формате (vl-линкер scFv-vh-[необязательный линкер для доменов]-CH2-CH3) или с одним мономером в одной ориентации и другим в другой ориентации). Fc-домены формата с двумя scFv необязательно содержат асимметричные варианты (например, выбранные из группы, состоящей из S364K/E357Q: L368D/K370S; L368D/K370S: S364K; L368E/K370S: S364K; T411T/E360E/Q362E: D401K; L368D/K370S: S364K/E357L, K370S: S364K/E357Q, T366S/L368A/Y407V: T366W и T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C), необязательно варианты с устранением связывания, необязательно заряженные линкеры scFv, и тяжелая цепь содержит pI-варианты.

В некоторых вариантах осуществления формат с двумя scFv включает асимметричные варианты, pI-варианты и варианты с устранением связывания. Соответственно, некоторые варианты осуществления включают форматы, которые содержат: a) первый мономер, который содержит асимметричные варианты S364K/E357Q, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи в легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, и второй вариабельный домен тяжелой цепи; b) второй мономер, который содержит асимметричные варианты L368D/K370S, pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, как описано в данном документе, и второй вариабельный домен легкой цепи, который вместе со вторым вариабельным доменом тяжелой цепи образует Fv, связывающийся со второй мишенью; и c) легкую цепь, содержащую первый вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления формат с двумя scFv включает асимметричные варианты, pI-варианты, варианты с устранением связывания и FcRn-варианты. Соответственно, некоторые варианты осуществления включают форматы "открывалки", которые содержат: a) первый мономер, который содержит асимметричные варианты S364K/E357Q, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, FcRn-варианты M428L/N434S, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи в легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, и второй вариабельный домен тяжелой цепи; b) второй мономер, который содержит асимметричные варианты L368D/K370S, pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, FcRn-варианты M428L/N434S, и первый вариабельный домен тяжелой цепи, который с первым вариабельным доменом легкой цепи образует Fv, связывающийся с первой мишенью, и второй вариабельный домен легкой цепи, который вместе со вторым вариабельным доменом тяжелой цепи образует Fv, связывающийся со второй мишенью; и c) легкую цепь, содержащую первый вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи.

Дополнительное описание форматов антител представлено в международной публикации заявки на патент № WO 2017/218707, включенной в данный документ посредством ссылки.

Связывание антител.

Биспецифический антигенсвязывающий белок (например, гетеродимерное антитело) по настоящему изобретению в различных аспектах связывает CD3 и STEAP1. Различные связывающие области независимо демонстрируют KD для их соответствующего антигена, равную 10^{-4} M или меньше, равную 10^{-5} M или меньше, равную 10^{-6} M или меньше, равную 10^{-7} M или меньше, равную 10^{-8} M или меньше, равную 10^{-9} M или меньше, равную 10^{-10} M или меньше, равную 10^{-11} M или меньше или равную 10^{-12} M или меньше, где KD относится к скорости диссоциации для конкретного взаимодействия антитело-

антиген. Аффинность связывания дополнительно описана выше. STEAP1-связывающая область не обязательно связывает STEAP1 с такой же аффинностью, с которой, например, CD3-связывающая область связывает CD3. Аффинность связывания, раскрытая применительно к биспецифическому антигенсвязывающему белку, также применима к любой из моноспецифических конструкций, описанных в данном документе, в том числе конструкций, которые связывают PD-1.

Дополнительные модификации антител.

В дополнение к модификациям, описанным выше, могут быть произведены другие модификации. Например, молекулы могут быть стабилизированы путем включения дисульфидных мостиков, связывающих VH- и VL-домены (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14: 1239-1245, полностью включенная посредством ссылки). Кроме того, существует множество ковалентных модификаций антител, которые могут быть произведены, как описано ниже.

Ковалентные модификации антител включены в объем настоящего изобретения и, как правило, но не всегда, осуществляются посттрансляционно. Например, несколько типов ковалентных модификаций антитела вводят в молекулу путем проведения реакции между конкретными аминокислотными остатками антитела с органическим дериватизирующим средством, которое способно вступать в реакцию с определенными боковыми цепями N- или C-концевых остатков.

Цистеинильные остатки чаще всего реагируют с α-галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, с образованием карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Цистеинильные остатки также можно дериватизировать посредством реакции с бромтрифторацетоном, α-бром-β-(5-имидазолил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлорртутьбензоатом, 2-хлорртуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом и т.п.

Кроме того, модификации цистеиновых остатков особенно применимы в путях применениях конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), дополнительно описанных ниже. В некоторых вариантах осуществления константная область антител может быть сконструирована таким образом, чтобы она содержала один или несколько цистеиновых остатков, которые являются особенно "тиол-реактивными", чтобы обеспечить более специфичное и контролируемое размещение фрагмента, представляющего собой лекарственное средство. См., например, патент США № 7521541, включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Гистидильные остатки дериватизируют посредством реакции с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, поскольку это средство является относительно специфичным для гистидильной боковой цепи. Также применим пара-бромфенацилбромид; реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М какодилате натрия при pH 6,0.

Лизинильные и аминоконцевые остатки подвергают реакции с ангидридами янтарной или других карбоновых кислот. Дериватизация с помощью этих средств изменяет заряд лизинильных остатков на противоположный. Другие подходящие реагенты для дериватизации остатков, содержащих альфа-аминогруппу, включают сложные имидоэфиры, такие как метилпиколинимидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль, хлорборогидрид; тринитробензолсульфоновую кислоту; O-метилизомочевину; 2,4-пентандион и глиоксилат в реакции, катализируемой трансаминазой.

Аргинильные остатки модифицируют посредством реакции с одним или несколькими традиционными реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Для дериватизации аргининовых остатков необходимо, чтобы реакцию проводили в щелочных условиях из-за высокого значения pKa гуанидиновой функциональной группы. Кроме того, эти реагенты могут вступать в реакцию с группами лизина, а также эпсилон-аминогруппой аргинина.

Можно проводить специфическую модификацию тирозильных остатков, при этом особый интерес представляет введение спектральных меток в тирозильные остатки посредством реакции с ароматическими соединениями диазония или с тетранитрометаном. Для образования O-ацетилтирозильных соединений и 3-нитропроизводных чаще всего применяют N-ацетилимидизол и тетранитрометан соответственно. Тирозильные остатки йодируют с помощью 125I или 131I, чтобы получить меченые белки для применения в радиоиммунологическом анализе, при этом подходящим является описанный выше способ с хлорамином T.

Карбоксильные боковые группы (аспартил или глутамил) селективно модифицируют посредством реакции с карбодиимидами (R'-N=C=N--R'), где R и R' необязательно представляют собой различные алкильные группы, такими как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азоний-4,4-диметилфенил)карбодиимид. Кроме того, аспартильные и глутамильные остатки превращают в аспарагинильные и глутаминильные остатки посредством реакции с ионами аммония.

Дериватизация с помощью бифункциональных средств применима для сшивания антител с нерастворимой в воде матрицей-подложкой или поверхностью для применения в различных способах. Обычно используемые сшивающие средства включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаровый альдегид, N-гидроксисукцинимидные сложные эфиры, например, сложные эфиры 4-азидосалициловой кислоты, гомобифункциональные сложные имидоэфиры, в том числе дисукцинимидильные сложные

эфиры, такие как 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан. Дериватизирующие средства, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропиоимидат, образуют фотоактивируемые промежуточные соединения, которые способны образовывать поперечные связи в присутствии света. В качестве альтернативы реакционноспособные нерастворимые в воде матрицы, такие как углеводы, активируемые цианогенбромидом, и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США № 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537; и 4330440, все из которых полностью включены посредством ссылки, используются для иммобилизации белков.

Глутаминильные и аспарагинильные остатки часто дезамидируют до соответствующих глутамильных и аспартильных остатков соответственно. В качестве альтернативы эти остатки дезамидируют в слабокислых условиях. Любая форма этих остатков находится в пределах объема настоящего изобретения.

Другие модификации включают гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильных или треонильных остатков, метилирование а-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983], полностью включенная посредством ссылки), ацетилирование N-концевой аминогруппы и амидирование любой С-концевой карбоксильной группы.

Кроме того, как будет понятно специалистам в данной области, метки (в том числе флуоресцентные, ферментативные, магнитные, радиоактивные и т.д.) можно добавить к любому из антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе (а также к другим композициям по настоящему изобретению).

Гликозилирование.

Другой тип ковалентной модификации представляет собой изменение гликозилирования. В другом варианте осуществления антитела (или другие типы антигенсвязывающего белка), раскрытые в данном документе, могут быть модифицированы таким образом, чтобы включать одну или несколько сконструированных гликоформ. Под "сконструированной гликоформой", используемой в данном документе, подразумевается углеводная композиция, ковалентно присоединенная к антителу, где указанная углеводная композиция химически отличается от таковой у исходного антитела. Сконструированные гликоформы могут быть применимыми для множества целей, включая без ограничения усиление или снижение эффекторной функции. Предпочтительной формой сконструированной гликоформы является афукозилирование, которое, как было показано, коррелирует с усилением функции ADCC, предположительно благодаря более прочному связыванию с рецептором FcγRIIIa. В данном контексте "афукозилирование" означает, что большая часть антител, продуцируемых в клетках-хозяевах, по существу не содержит фукозы, например, 90%, 95% или 98% полученных антител не содержат заметного количества фукозы в качестве компонента углеводного фрагмента антитела (как правило, присоединенного в N297 в Fc-области). В функциональном определении афукозилированные антитела, как правило, демонстрируют по меньшей мере 50% или большую аффинность к рецептору FcγRIIIa.

Гетеродимерное антитело необязательно содержит модификацию последовательности, при которой удаляется один или несколько сайтов гликозилирования, например, в одном или нескольких из положений 292, 297 или 302. Один неограничивающий пример включает введение одной или нескольких мутаций получения стабильных антител без эффекторных функций (SEFL2) (например, в остове IgG1), которые дополнительно описаны, например, в патенте США № 9546203, включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и, в частности, в отношении описания мутаций SEFL2. Эта модификация может использоваться в дополнение к любой другой модификации, раскрытой в данном документе, например, модификации N67Q для уменьшения дезамидирования.

Сконструированные гликоформы можно получать посредством различных способов, известных из уровня техники. См., например, Umana et al., 1999, Nat Biotechnol 17: 176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74: 288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277: 26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278: 3466-3473; патент США № 6602684; публикации заявок на патент США № 2003/0157108 и 2003/0003097; а также международные публикации заявок на патент № WO 00/61739A1, WO 01/29246Al, WO 02/31140A1 и WO 02/30954A1, все из которых полностью включены посредством ссылки, а также технологию Potelligent® [Biowa, Inc., Принстон, Нью-Джерси] и технологию конструирования гликозилирования GlycoMAb® [Glycart Biotechnology AG, Цюрих, Швейцария]. Многие из данных методик основаны на контроле уровня фукозилированных и/или находящихся в точках ветвления олигосахаридов, которые ковалентно присоединены к Fc-области, например, путем экспрессии IgG в различных организмах или клеточных линиях, сконструированных или иных (например, клетках CHO-Lec-13 или клетках гибридомы крысы YB2/0), путем регулирования ферментов, участвующих в пути гликозилирования (например, FUT8 [α1,6-фукозилтрансферазы] и/или β1-4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III [GnTIII]), или путем модификации углевода(углеводов) после того, как экспрессировался IgG. Например, "технология антител, сконструированных с использованием сахаров" функционирует путем добавления модифицированных сахаридов, которые ингибируют фукозилирование, во время получения; см., например, публикацию заявки на патент США № 20090317869, включенную в данный документ посредством ссыл-

ки во всей своей полноте. Сконструированная гликоформа, как правило относится к другому углеводу или олигосахариду; таким образом, антитело может содержать сконструированную гликоформу.

В качестве альтернативы сконструированная гликоформа может относиться к варианту IgG, который содержит другой углевод или олигосахарид. Как известно из уровня техники, профили гликозилирования могут зависеть как от последовательности белка (например, от присутствия или отсутствия конкретных аминокислотных остатков для гликозилирования, обсуждаемых ниже), так и от клетки-хозяина или организма, в которых продуцируется белок. Конкретные системы экспрессии обсуждаются ниже.

Гликозилирование полипептидов обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров - N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы - к гидроксиаминокислоте, наиболее часто к серину или треонину, хотя также может применяться 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление сайтов гликозилирования в антитело в целях удобства осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности так, чтобы она содержала одну или несколько из вышеописанных трипептидных последовательностей (в случае сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение также можно осуществлять посредством добавления одного или нескольких сериновых или треониновых остатков в исходную последовательность или замены на них (в случае сайтов O-связанного гликозилирования). Для удобства аминокислотную последовательность антитела предпочтительно изменяют посредством изменений на уровне ДНК, в частности, посредством мутации ДНК, кодирующей целевой полипептид, в предварительно выбранных основаниях таким образом, что образуются кодоны, которые будут транслироваться в требуемые аминокислоты.

Другим средством повышения количества углеводных фрагментов в антигенсвязывающем белке (например, антителе) является химическое или ферментативное связывание гликозидов с белком. Эти процедуры являются предпочтительными по той причине, что они не требуют продуцирования белка в клетке-хозяине, которая обладает способностями к гликозилированию для обеспечения N- и O-связанного гликозилирования. В зависимости от используемого вида связывания сахар(сахара) могут быть присоединены к (a) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, как, например, к группам цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, как, например, к группам серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, как, например, к остаткам фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в международной публикации заявки на патент № WO 87/05330 и в Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, обе из которых полностью включены посредством ссылки.

Удаление углеводных фрагментов, присутствующих в исходном антителе (например, посттрансляционно), можно осуществлять химическим или ферментативным способом. Химическое дегликозилирование требует воздействия на белок соединения, представляющего собой трифторметансульфоновую кислоту, или эквивалентного соединения. Такая обработка приводит к отщеплению большинства или всех сахаров, за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), тогда как полипептид остается интактным. Химическое дегликозилирование описано в Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52, и в Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118: 131, обе из которых полностью включены посредством ссылки. Ферментативное расщепление углеводных фрагментов в полипептидах может быть достигнуто путем применения ряда эндо- и экзогликозидаз, как описано в Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350, полностью включенной посредством ссылки. Гликозилирование в потенциальных сайтах гликозилирования может быть предотвращено путем применения соединения туникамицина, как описано в Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105, полностью включенной посредством ссылки. Туникамицин блокирует образование N-гликозидных связей с белком.

Другой тип ковалентной модификации антитела включает связывание антитела с различными небелковыми полимерами, в том числе без ограничения различными полиолами, такими как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль или полиоксиалкилены, посредством способа, изложенного, например, в 2005-2006 PEG Catalog от Nektar Therapeutics (доступен на веб-сайте Nektar) или в патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337, все из которых полностью включены посредством ссылки. Кроме того, как известно из уровня техники, можно проводить аминокислотные замены в различных положениях в антителе, чтобы облегчить добавление полимеров, таких как PEG. См., например, публикацию заявки на патент США № 2005/0114037A1, полностью включенную посредством ссылки.

Дополнительные Fc-варианты для придания дополнительных функциональных свойств.

В дополнение к аминокислотным pI-вариантам и другим вариантам, описанным выше, существует ряд применимых аминокислотных модификаций Fc, которые можно производить по ряду причин, включая без ограничения изменение связывания с одним или несколькими рецепторами FcγR, измененное

связывание с рецепторами FcRn и т.д. Следующие модификации могут быть использованы в дополнение к любой из модификаций, описанных выше, или в качестве их альтернативы.

FcγR-варианты.

Существует ряд применимых замен в Fc, которые можно производить для изменения связывания с одним или несколькими FcγR-рецепторами. Могут быть применимыми замены, которые приводят к увеличению связывания, а также к уменьшению связывания. Например, известно, что увеличение связывания с FcγRIIIa обычно приводит к усилению ADCC (антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности - клеточноопосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют FcγR, распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени). Аналогичным образом, при некоторых обстоятельствах также может быть благоприятным уменьшение связывания с FcγRIIb (ингибирующим рецептором). Аминокислотные замены, которые находят применение в настоящем изобретении, включают замены, перечисленные в публикациях заявок на патент США № 2006/0024298 (в частности, на фиг. 41), 2006/0121032, 2006/0235208, 2007/0148170, все из которых в явной форме включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и, в частности, в отношении раскрытых в данном документе вариантов. Конкретные варианты, которые находят применение, включают без ограничения 236A, 239D, 239E, 332E, 332D, 239D/332E, 267D, 267E, 328F, 267E/328F, 236A/332E, 239D/332E/330Y, 239D, 332E/330L и 299T.

Кроме того, существуют дополнительные замены в Fc, которые находят применение для увеличенного связывания с рецептором FcRn и увеличенного времени полужизни в сыворотке крови, как конкретно раскрыто в публикации заявки на патент США № 2009/0163699, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, в том числе без ограничения 434S, 428L, 308F, 2591, 428L/434S, 259I/308F, 436I/428L, 436I или V/434S, 436V/428L и 259I/308F/428L.

Fc-варианты с устранением связывания.

Дополнительные варианты, которые находят применение в контексте настоящего изобретения, представляют собой варианты, в которых устранено (например, снижено или исключено) связывание с Fcγ-рецепторами. Это может быть желательно для снижения потенциальных механизмов действия (например, снижения активности ADCC) гетеродимерного антитела. Ряд подходящих Fc-вариантов с устранением связывания изображен на фиг. 6, и они могут быть необязательно и независимо включены или исключены в комбинации с любыми другими вариантами гетеродимеризации, включая pI-варианты и стерические варианты.

Особо применимыми в некоторых вариантах осуществления являются первый мономер ("отрицательная сторона"), который содержит pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, асимметричные варианты 368D/370S и варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, в паре с положительной стороной, не содержащей pI-вариантов, асимметричных вариантов S364K/E357Q и вариантов с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), где положительная сторона представляет собой мономер, содержащий scFv, и содержит заряженный линкер scFv. Во втором варианте осуществления используется первый мономер отрицательной стороны, содержащий I199T/N203D/K274Q/R355Q/Q419E/K447del, асимметричные варианты S364K/E357Q и варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), в паре с положительной стороной, содержащей pI-варианты Q196K/I199T/P271R/P228R/N276K, асимметричные варианты S364K/E357Q и варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), где положительная сторона представляет собой мономер, содержащий scFv, и содержит заряженный линкер scFv. В третьем варианте осуществления используется первый мономер отрицательной стороны, содержащий I199T/N203D/K274Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447del, асимметричные варианты S364K/E357Q и варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), в паре с мономером положительной стороны, не содержащим pI-вариантов, асимметричных вариантов S364K/E357Q и вариантов с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), где положительная сторона представляет собой мономер, содержащий scFv, и содержит заряженный линкер scFv. В четвертом варианте осуществления используется первый мономер ("отрицательная сторона"), который содержит pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, асимметричные варианты 368D/370S и варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S239K, в паре с положительной стороной, не содержащей pI-вариантов, асимметричных вариантов S364K/E357Q и вариантов с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S239K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S). В пятом варианте осуществления используется первый мономер отрицательной стороны, содержащий I199T/N203D/K274Q/R355Q/Q419E/K447del, асимметричные варианты S364K/E357Q и варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S239K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), в паре с положительной стороной, содержащей pI-варианты Q196K/I199T/P271R/P228R/N276K, асимметричные варианты S364K/E357Q и варианты с

устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S239K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S). В шестом варианте осуществления используется первый мономер отрицательной стороны, содержащий I199T/N203D/K274Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447del, асимметричные варианты S364K/E357Q и варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S267K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), в паре с мономером положительной стороны, содержащим асимметричные варианты S364K/E357Q и варианты с устранением связывания E233P/L234V/L235A/G236del/S239K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), где положительная сторона представляет собой мономер scFv и содержит заряженный линкер scFv (особенно если scFv связывает CD3). В седьмом варианте осуществления используется первый мономер ("отрицательная сторона"), который содержит pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, асимметричные варианты 368D/370S и варианты с устранением связывания S239K/S267K, в паре с положительной стороной, не содержащей pI-вариантов, асимметричных вариантов S364K/E357Q и вариантов с устранением связывания S239K/S267K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), где положительная сторона представляет собой мономер scFv и содержит заряженный линкер scFv. В восьмом варианте осуществления используется первый мономер отрицательной стороны, содержащий I199T/N203D/K274Q/R355Q/Q419E/K447del, асимметричные варианты S364K/E357Q и варианты с устранением связывания S239K/S267K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), в паре с положительной стороной, содержащей pI-варианты Q196K/I199T/P271R/P228R/N276K, асимметричные варианты S364K/E357Q и варианты с устранением связывания S239K/S267K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), где положительная сторона представляет собой мономер scFv и содержит заряженный линкер scFv. В девятом варианте осуществления используется первый мономер отрицательной стороны, содержащий I199T/N203D/K274Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447del, асимметричные варианты S364K/E357Q и варианты с устранением связывания S239K/S267K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), в паре с мономером положительной стороны, не содержащим pI-вариантов, асимметричных вариантов S364K/E357Q и вариантов с устранением связывания S239K/S267K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), где положительная сторона представляет собой мономер scFv и содержит заряженный линкер scFv. В десятом варианте осуществления используется первый мономер ("отрицательная сторона"), который содержит pI-варианты N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, асимметричные варианты 368D/370S и варианты с устранением связывания S267K/P329K, в паре с положительной стороной, не содержащей pI-вариантов, асимметричных вариантов S364K/E357Q и вариантов с устранением связывания S267K/P329K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), где положительная сторона представляет собой мономер scFv и содержит заряженный линкер scFv. В одиннадцатом варианте осуществления используется первый мономер отрицательной стороны, содержащий I199T/N203D/K274Q/R355Q/Q419E/K447del, асимметричные варианты S364K/E357Q и варианты с устранением связывания S267K/P329K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), в паре с положительной стороной, содержащей pI-варианты Q196K/I199T/P271R/P228R/N276K, асимметричные варианты S364K/E357Q и варианты с устранением связывания S267K/P329K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), где положительная сторона представляет собой мономер scFv и содержит заряженный линкер scFv. В 12-м варианте осуществления используется первый мономер отрицательной стороны, содержащий I199T/N203D/K274Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447del, асимметричные варианты S364K/E357Q и варианты с устранением связывания S267K/P329K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), в паре с положительным боковым мономером, не содержащим pI-вариантов, асимметричных вариантов S364K/E357Q и вариантов с устранением связывания S267K/P329K (оба мономера необязательно содержат FcRn-варианты 428L/434S), где положительная сторона представляет собой мономер scFv и содержит заряженный линкер scFv.

В различных аспектах первый мономер, содержащий первую тяжелую цепь, содержащую первый вариабельный домен тяжелой цепи, первую константную область тяжелой цепи, содержащую первый CH1-домен и первый Fc-домен, scFv, который связывает CD3 человека и содержит вариабельный домен легкой цепи scFv, линкер scFv и вариабельный домен тяжелой цепи scFv (т.е. тяжелую цепь "Fab-scFv-Fc"), содержит делецию в верхней шарнирной области, и в CH2 и CH3 введены замены. Замены включают, например, одну или несколько (например, все) из E233P, delL234, L235V, G236A, S267K, r292c, n297g, v302c, E357Q и S364K (нумерация EU, где строчные буквы обозначают замены SEFL2). Второй мономер, содержащий вторую тяжелую цепь, содержащую второй вариабельный домен тяжелой цепи и вторую константную область тяжелой цепи, содержащую второй Fc-домен, необязательно содержит одну или несколько (например, все) из следующих мутаций: N208D, E233P, delL234, L235V, G236A, S267K, r292c, Q295E, n297g, v302c, L368D, K370S, N384D, Q418E и N421D (нумерация EU, где строчные буквы обозначают замены SEFL2).

Линкеры.

"Линкер" в данном документе также называется "линкерной последовательностью" или "спейсером" или грамматическим эквивалентом. Гомо- или гетеробифункциональные линкеры являются хорошо

известными (см. каталог 1994 г. компании Pierce Chemical, технический раздел по сшивающим средствам, страницы 155-200, полностью включенный посредством ссылки). (Обратите внимание на различие между универсальными "линкерами" и "линкерами scFv" и "заряженными линкерами scFv".) Для ковалентного связывания молекул друг с другом можно использовать ряд стратегий. Они включают без ограничения полипептидные связи между N- и С-концами белков или белковых доменов, связывание посредством дисульфидных связей и связывание посредством химических сшивающих реагентов. В одном из аспектов этого варианта осуществления линкер представляет собой пептидную связь, полученную с помощью рекомбинантных методик или пептидного синтеза. Линкерный пептид может преимущественно включать следующие аминокислотные остатки: Gly, Ser, Ala или Thr. Линкерный пептид должен иметь длину, достаточную для связывания двух молекул таким образом, что они принимают правильную конформацию относительно друг друга, так что сохраняют желаемую активность. В одном варианте осуществления линкер имеет длину приблизительно 1-50 аминокислот, предпочтительно имеет длину приблизительно 1-30 аминокислот. В одном варианте осуществления можно использовать линкеры длиной 1-20 аминокислот. Подходящие линкеры включают глицин-сериновые полимеры, в том числе, например, (GS)n, (GSGGS)n (SEQ ID NO: 178), (GGGGS)n (SEQ ID NO: 179) и (GGGS)n (SEQ ID NO: 180), где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере одному; глицин-аланиновые полимеры; аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры. В качестве альтернативы могут находить применение различные небелковые полимеры, в том числе без ограничения полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль, полиоксиалкилены или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, в качестве линкеров, то есть они могут находить применение в качестве линкеров.

Другие линкерные последовательности могут включать любую последовательность любой длины из CL/CH1-домена, но не все остатки CL/CH1-домена; например, первые 5-12 аминокислотных остатков CL/CH1-доменов. Линкеры могут быть получены из легкой цепи иммуноглобулина, например, Сκ или Сλ. Линкеры могут быть получены из тяжелых цепей иммуноглобулина любого изотипа, в том числе, например, Сγ1, Сγ2, Сγ3, Сγ4, Сα1, Сα2, Сδ, Сε и Сμ. Линкерные последовательности могут быть также получены из других белков, таких как Ig-подобные белки (например, TCR, FcR, KIR), последовательности, полученные из шарнирной области, и другие природные последовательности из других белков.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой "линкер для доменов", используемый для связывания друг с другом любых двух доменов, как описано в данном документе. Например, на фиг. 18F может быть показан линкер для доменов, который присоединяет С-конец CH1-домена Fab к N-концу scFv, при этом другой необязательный линкер для доменов присоединяет С-конец scFv к CH2-домену (хотя во многих вариантах осуществления используется шарнирная область в качестве данного линкера для доменов). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой шарнирную область или ее фрагмент.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство.

Антигенсвязывающий белок (например, антитело или гетеродимерное антитело) по настоящему изобретению необязательно конъюгирован с лекарственными средствами с образованием конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC). Как правило, ADC применяются в различных ситуациях, в том числе в путях применения в онкологии, где применение конъюгатов антитело-лекарственное средство для локальной доставки цитотоксических или цитостатических средств позволяет целенаправленно доставлять фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, к опухолям, что может обеспечить более высокую эффективность, более низкую токсичность и т.д. Обзор этой технологии представлен в Ducry et al., Bioconjugate Chem., 21:5-13 (2010); Carter et al., Cancer J. 14(3): 154 (2008); и Senter, Current Opin. Chem. Biol. 13: 235-244 (2009), все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Как правило, конъюгирование выполняется путем ковалентного присоединения к антителу, как дополнительно описано ниже, и обычно основывается на использовании линкера, часто пептидной связи (которая, как описано в данном документе, может быть разработана так, чтобы быть или не быть чувствительной к расщеплению протеазами в сайте-мишени). Кроме того, связывание звена линкер-лекарственное средство (LU-D) может быть достигнуто путем присоединения к цистеиновым остаткам в антителе. Количество фрагментов, представляющих собой лекарственное средство, на одно антитело может изменяться в зависимости от условий реакции и может варьироваться в соотношении лекарственное средство: антитело от 1:1 до 10:1. Специалистам в данной области будет понятно, что фактическое число является средним значением.

Лекарственное средство для ADC может быть выбрано из любого из ряда средств, в том числе без ограничения цитотоксических средств, таких как химиотерапевтические средства, средств, ингибирующих рост, токсинов (например, ферментативно активного токсина бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или его фрагментов) или радиоактивного изотопа (то есть для радиоконъюгата). В настоящем изобретении также предусмотрены способы применения ADC.

Лекарственные средства для применения в контексте настоящего изобретения включают цитотоксические лекарственные средства, особенно те, которые применяются для терапии рака. Такие лекарст-

венные средства, как правило, включают средства, вызывающие повреждение ДНК, антиметаболиты, природные продукты и их аналоги. Иллюстративные классы цитотоксических средств включают ингибиторы ферментов, такие как ингибиторы дигидрофолатредуктазы и ингибиторы тимидилатсинтазы, ДНК-интеркаляторы, средства, расщепляющие ДНК, ингибиторы топоизомеразы, лекарственные средства семейства антрациклинов, лекарственные средства на основе барвинка, митомицины, блеомицины, цитотоксические нуклеозиды, лекарственные средства семейства птеридинов, диинены, подофиллотоксины, доластатины, майтанзиноиды, индукторы дифференцировки и таксолы.

Представители этих классов включают, например, метотрексат, метоптерин, дихлорметотрексат, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, цитозинарабинозид, мелфалан, лейрозин, лейрозидеин, актиномицин, даунорубицин, доксорубицин, митомицин С, митомицин А, каминомицин, аминоптерин, таллизомицин, подофиллотоксин и производные подофиллотоксина, такие как этопозид или этопозида фосфат, винбластин, винкристин, виндезин, таксаны, в том числе таксол, таксотер, ретиноевую кислоту, масляную кислоту, N8-ацетилспермидин, камптотецин, калихеамицин, эсперамицин, ендиины, дуокармицин А, дуокармицин SA, калихеамицин, камптотецин, майтанзиноиды (в том числе DM1), монометилауристатин Е (MMAE), монометилауристатин F (MMAF) и майтанзиноиды (DM4) и их аналоги.

Токсины могут использоваться в конъюгатах антитело-токсин и включают бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, растительные токсины, такие как рицин, низкомолекулярные токсины, такие как гелданамицин (Mandler et al (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19): 1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10: 1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13: 786-791), майтанзиноиды (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623) и калихеамицин (Lode et al (1998) Cancer Res. 58: 2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53: 3336-3342). Токсины могут проявлять свои цитотоксические и цитостатические эффекты с помощью механизмов, включающих связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы.

Предусматриваются конъюгаты антитела (или другого антигенсвязывающего белка) и одного или нескольких низкомолекулярных токсинов, таких как майтанзиноиды, доластатины, ауристатины, трихотецин, калихеамицин и CC1065, а также производных этих токсинов, которые обладают активностью токсинов.

Соединения майтанзина, подходящие для применения в качестве фрагментов, представляющих собой майтанзиноидное лекарственное средство, хорошо известны из уровня техники и могут быть выделены из природных источников с помощью известных способов и получены с использованием методик генной инженерии (см. Yu et al (2002) PNAS 99: 7968-7973), или майтанзинол и аналоги майтанзинола могут быть получены синтетическим путем в соответствии с известными способами. Как описано ниже, лекарственные средства можно модифицировать путем включения функционально активной группы, такой как тиольная группа или аминогруппа, для конъюгирования с антителом.

Иллюстративные фрагменты, представляющие собой майтанзиноидное лекарственное средство, включают те, которые имеют модифицированное ароматическое кольцо, как, например, С-19-дехлоро (патент США №4256746) (полученный путем восстановления анзамитоцина Р2 с помощью алюмогидрида лития); С-20-гидрокси (или С-20-деметил) +/- С-19-дехлоро (патенты США № 4361650 и 4307016) (полученные путем деметилирования с помощью Streptomyces или Actinomyces или дехлорирования с помощью LAH); а также С-20-деметокси, С-20-ацилокси (--OCOR) +/- дехлоро (патент США № 4294757) (полученные путем ацилирования с помощью хлорангидридов), и те, которые имеют модификации в других положениях.

Иллюстративные фрагменты, представляющие собой майтанзиноидное лекарственное средство, также включают те, которые имеют модификации, такие как: С-9-SH (патент США № 4424219) (полученный с помощью реакции майтанзинола с H2S или P2S5); С-14-алкоксиметил (деметокси/CH2OR) (патент США № 4331598); С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH2OH или CH2OAc) (патент США № 4450254) (полученный из Nocardia); С-15-гидрокси/ацилокси (патент США № 4364866) (полученный путем превращения майтанзинола с помощью Streptomyces); С-15-метокси (патенты США №№ 4313946 и 4315929) (выделенный из Trewia nudiflora); С-18-N-деметил (патенты США № 4362663 и 4322348) (полученный путем деметилирования майтанзинола с помощью Streptomyces) и 4,5-дезокси (патент США № 4371533) (полученный путем восстановления майтанзинола с помощью трихлорида титана/LAH).

Особо применимыми являются DM1 (раскрытый в патенте США № 5208020, включенном посредством ссылки) и DM4 (раскрытый в патенте США № 7276497, включенном посредством ссылки). См. также ряд дополнительных производных майтанзиноидов и способов в патентах США № 5416064; 6441163; 7303749; 7368565 и 7601354; международных публикациях № WO/01/24763, WO02/098883, WO02/16368 и WO04/1033272 и USSN 12/631508, все из которых в явной форме включены посредством ссылки во всей своей полноте.

ADC, содержащие майтанзиноиды, способы их получения и их терапевтическое применение раскрыты, например, в патентах США № 5208020; 5416064; 6441163 и европейском патенте EP 0425235 B1, раскрытия которых в явной форме включены в данный документ посредством ссылки. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996), описали ADC, содержащие майтанзиноид, обозначенный как DM1, связанный с моноклональным антителом С242, направленным против колоректального рака человека.

Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992), описывают ADC, в которых майтанзиноид был конъюгирован посредством дисульфидного линкера с антителом мыши A7, связывающимся с антигеном на линиях раковых клеток ободочной кишки человека, или с другим моноклональным антителом мыши TA.1, которое связывает онкоген HER-2/neu. Конъюгат лекарственного средства достигал степени цитотоксичности, сходной со степенью цитотоксичности свободного майтанзиноидного лекарственного средства, которую можно было повысить за счет увеличения количества молекул майтанзиноидов на молекулу антитела.

В некоторых вариантах осуществления ADC содержит доластатин или пептидный аналог или производное доластатина или ауристатин (патенты США №№ 5635483 и 5780588). Было показано, что доластатины и ауристатины препятствуют динамике микротрубочек, гидролизу GTP, делению ядра и клетки (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) и обладают противораковой (патент США № 5663149) и противогрибковой активностью (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Фрагмент, представляющий собой доластатиновое или ауристатиновое лекарственное средство, может быть присоединен к антителу с помощью N(амино)-конца или C(карбокси)-конца фрагмента, представляющего собой пептидное лекарственное средство (международная публикация заявки на патент № WO 02/088172). В различных аспектах гетеродимерное антитело является частью плана лечения, который также включает введение эрибулина.

Иллюстративные варианты осуществления ауристатина включают связанные с N-концом фрагменты DE и DF, представляющие собой монометилауристатиновое лекарственное средство, описанные в Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, представленной 28 марта 2004 г. и описанной в публикации заявки на патент США № 2005/0238648, раскрытие которой в явной форме включено посредством ссылки во всей своей полноте. Иллюстративным вариантом осуществления ауристатина является MMAE (см. патент США № 6884869, в явной форме включенный посредством ссылки во всей своей полноте). Другим иллюстративным вариантом осуществления ауристатина является MMAF (см. публикацию заявки на патент США № 2005/0238649 и патенты США №№ 5767237 и 6124431, в явной форме включенные посредством ссылки во всей своей полноте).

Как правило, фрагменты, представляющие собой пептидное лекарственное средство, могут быть получены путем образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи могут быть получены, например, в соответствии со способом жидкофазного синтеза (см. E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), который хорошо известен в области химии пептидов. Фрагменты, представляющие собой ауристатиновое/доластатиновое лекарственное средство, могут быть согласно способам из патентов США № 5635483 и 5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243-277; Pettit, G. R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5: 859-863 и Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7): 778-784.

В других вариантах осуществления ADC содержит одну или несколько молекул калихеамицина. Например, милотарг является первым коммерческим лекарственным средством типа ADC, в котором в качестве полезной нагрузки используется калихеамицин γ1 (см. патент США № 4970198, включенный посредством ссылки во всей своей полноте). Дополнительные производные калихеамицина описаны в патентах США № 5264586, 5384412, 5550246, 5739116, 5773001, 5767285 и 5877296, все из которых в явной форме включены посредством ссылки. Антибиотики семейства калихеамицинов способны вызывать двухнитевые разрывы ДНК в субпикомолярных концентрациях. В отношении получения конъюгатов семейства калихеамицинов см. патенты США № 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (все принадлежат компании American Cyanamid). Структурные аналоги калихеамицина, которые можно использовать, включают без ограничения γ1I, α2I, α2I, N-ацетил-γ1I, PSAG и θI1 (Hinman et al., Cancer Research 53: 3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998), и вышеупомянутые патенты США, принадлежащие American Cyanamid). Другим противоопухолевым лекарственным средством, с которым может быть конъюгировано антитело, является QFA, который представляет собой антифолат. Как калихеамицин, так и QFA имеют внутриклеточные места приложения действия и с трудом пересекают плазматическую мембрану. Следовательно, поглощение клетками этих средств путем интернализации, опосредованной антителами, значительно усиливает их цитотоксические эффекты.

CC-1065 (см. патент США № 4169888, включенный посредством ссылки) и дуокармицины являются членами семейства противоопухолевых антибиотиков, используемых в ADC. Эти антибиотики, повидимому, действуют посредством селективного по отношению к последовательности алкилирования ДНК по N3 аденина в малой бороздке, что запускает каскад событий, которые приводят к апоптозу. Важные представители дуокармицинов включают дуокармицин A (патент США № 4923990, включенный посредством ссылки) и дуокармицин SA (патент США № 5101038, включенный посредством ссылки), а также большое количество аналогов, описанных в патентах США № 7517903, 7691962, 5101038; 5641780; 5187186; 5070092; 5070092; 5641780; 5101038; 5084468; 5475092; 5585499; 5703080; 6989452; 7087600; 7129261; 7498302; 7507420 и 5846545 и международных публикациях заявок на патент №

WO2007/089149 и WO2009/017394A1, все из которых в явной форме включены посредством ссылки.

Другие цитотоксические средства.

Другие противоопухолевые средства, которые могут быть конъюгированы с антигенсвязывающим белком, включают BCNU, стрептозоцин, винкристин и 5-фторурацил - семейство средств, известных под общим названием "комплекс LL-E33288", описанных в патентах США №№ 5053394 и 5770710, а также эсперамицины (патент США № 5877296).

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые могут быть использованы, включают цепь А дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из Pseudomonas aeruginosa), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модекцина, альфа-сарцин, белки Aleurites fordii, диантиновые белки, белки Phytolacca americana (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из Momordica charantia, курцин, кротин, ингибитор из Saponaria officinalis, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецины. См., например, международную публикацию заявки на патент № WO 93/21232.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен ADC, образуемый антигенсвязывающим белком и соединением с нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазой или ДНК-эндонуклеазой, такой как дезоксирибонуклеаза; ДНКаза).

Для селективного разрушения опухоли антигенсвязывающий белок (например, антитело или гетеродимерное антитело) может содержать высокорадиоактивный атом. Для получения радиоконъюгатов доступны различные радиоактивные изотопы. Примеры включают At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 и радиоактивные изотопы Lu.

Радиоактивные или другие метки могут быть включены в конъюгат известными способами. Например, пептид может получен путем биосинтеза или может быть синтезирован путем химического синтеза аминокислот с использованием подходящих предшественников аминокислот, включая, например, фтор-19 вместо водорода. Такие метки, как Tc99m или I123, Re186, Re188 и In111, могут быть присоединены с помощью цистеинового остатка в пептиде. Иттрий-90 может быть присоединен с помощью лизинового остатка. Йодогенный способ (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 можно применять для включения йода-123. В "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) подробно описаны другие способы.

В некоторых случаях разделение, очистка и получение характеристик гомогенных ADC, где p представляет собой определенное значение из ADC с другой нагрузкой лекарственным средством, могут быть достигнуты с помощью таких способов, как обращенно-фазовая HPLC или электрофорез. В иллюстративных вариантах осуществления p равняется 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или представляет собой дробное число в этом диапазоне.

Будет понятно, что могут быть также произведены химические модификации в желаемом соединении, чтобы сделать реакции этого соединения более удобными для целей получения конъюгатов по настоящему изобретению. Например, функциональная группа, например, аминогруппа, гидроксильная или сульфгидрильная группа, может быть присоединена к лекарственному средству в положении, которое оказывает минимальное или приемлемое влияние на активность или другие свойства лекарственного средства.

Линкерные звенья.

Обычно конъюгат антигенсвязывающий белок-лекарственное средство содержит линкерное звено между звеном, представляющим собой лекарственное средство, и звеном, представляющим собой антигенсвязывающий белок. В некоторых вариантах осуществления линкер способен расщепляться во внутриклеточных или внеклеточных условиях, так что при расщеплении линкера высвобождается звено, представляющее собой лекарственное средство, из антигенсвязывающего белка в подходящей среде. Например, солидные опухоли, которые секретируют определенные протеазы, могут служить мишенью для расщепляемого линкера; в других вариантах осуществления используются именно внутриклеточные протеазы. В еще нескольких других вариантах осуществления линкерное звено не способно расщепляться, и лекарственное средство высвобождается, например, в результате разрушения антитела в лизосомах.

В некоторых вариантах осуществления линкер способен расщепляться под действием расщепляющего средства, которое присутствует во внутриклеточной среде (например, в лизосоме, эндосоме или кавеоле). Линкер может представлять собой, например, пептидильный линкер, который расщепляется под действием внутриклеточного фермента пептидазы или протеазы, в том числе без ограничения лизосомальной или эндосомальной протеазы. В некоторых вариантах осуществления пептидильный линкер имеет длину по меньшей мере две аминокислоты или имеет длину по меньшей мере три аминокислоты или больше.

Расщепляющие средства могут включать без ограничения катепсины B и D и плазмин, все из которых, как известно, гидролизуют дипептидные производные лекарственных средств, что приводит к высвобождению активного лекарственного средства внутри клеток-мишеней (см., например, Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83: 67-123). Пептидильные линкеры способны расщепляться под действием ферментов, присутствующих в клетках, экспрессирующих CD38. Например, можно использовать пептидильный линкер, который способен расщепляться под действием тиол-зависимой протеазы катеп-

сина B, которая экспрессируется на высоком уровне в раковой ткани (например, линкер Phe-Leu или Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 181)). Другие примеры таких линкеров описаны, например, в патенте США № 6214345, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления пептидильный линкер, способный расщепляться под действием внутриклеточной протеазы, представляет собой линкер Val-Cit или линкер Phe-Lys (см., например, патент США № 6214345, в котором описан синтез доксорубицина с использованием линкера Val-Cit).

В других вариантах осуществления расщепляемый линкер является pH-чувствительным, то есть чувствительным к гидролизу при определенных значениях pH. Обычно pH-чувствительный линкер способен гидролизоваться в кислых условиях. Например, можно использовать кислотонеустойчивый линкер, способный гидролизоваться в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, амид цис-аконитовой кислоты, ортоэфир, ацеталь, кеталь и т.п.). (См., например, патенты США № 5122368, 5824805 и 5622929; Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83: 67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264: 14653-14661.) Такие линкеры являются относительно стабильными в условиях нейтрального pH, как, например, в крови, но являются нестабильными при pH ниже 5,5 или 5,0, примерном pH лизосомы. В определенных вариантах осуществления гидролизуемый линкер представляет собой тиоэфирный линкер (такой как, например, тиоэфир, присоединенный к терапевтическому средству посредством ацилгидразоновой связи (см., например, патент США № 5622929)).

В еще нескольких других вариантах осуществления линкер способен расщепляться в восстанавливающих условиях (например, дисульфидный линкер). Из уровня техники известны различные дисульфидные линкеры, в том числе, например, линкеры, которые могут быть образованы с использованием SATA (N-сукцинимидил-5-ацетилтиоацетата), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутирата) и SMPT (N-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуола), а также SPDB и SMPT. См., например, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., в Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987). См. также патент США № 4880935.

В других вариантах осуществления линкер представляет собой малонатный линкер (Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93), малеимидобензоильный линкер (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10): 1299-1304) или 3'-N-амидный аналог (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10): 1305-12).

В еще нескольких других вариантах осуществления линкерное звено не способно расщепляться, и лекарственное средство высвобождается в результате разрушения антитела. См, например, публикацию заявки на патент США № 2005/0238649, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Во многих вариантах осуществления линкер является саморазлагающимся. Используемый в данном документе термин "саморазлагающийся спейсер" относится к бифункциональному химическому фрагменту, который способен ковалентно связывать друг с другом два пространственно разделенных химических фрагмента в стабильную молекулу из трех частей. Он самопроизвольно отделяется от второго химического фрагмента, если его связь с первым фрагментом расщепляется. См., например, международные публикации заявок на патент № WO 2007059404A2, WO06110476A2, WO05112919A2, WO2010/062171, WO09/017394, WO07/089149, WO 07/018431, WO04/043493 и WO02/083180, которые относятся к конъюгатам лекарственное средство-расщепляемый субстрат, где лекарственное средство и расщепляемый субстрат необязательно связаны с помощью саморазлагающегося линкера, и все из которых в явной форме включены посредством ссылки.

Часто линкер по существу нечувствителен к внеклеточной среде, т.е. не более чем приблизительно 20%, 15%, 10%, 5%, 3% или не более чем приблизительно 1% линкеров в образце конъюгата антигенсвязывающий белок-лекарственное средство расщепляются, когда конъюгат антигенсвязывающий белок-лекарственное средство присутствует во внеклеточной среде (например, в плазме крови). То, является ли линкер по существу нечувствительным к внеклеточной среде, можно определить, например, посредством инкубации соединения конъюгата антигенсвязывающий белок-лекарственное средство с плазмой крови в течение заданного периода времени (например, 2, 4, 8, 16 или 24 часов), а затем количественного определения количества свободного лекарственного средства, присутствующего в плазме крови.

В других, не исключающих друг друга, вариантах осуществления линкер способствует клеточной интернализации. В определенных вариантах осуществления линкер способствует клеточной интернализации, будучи конъюгированным с терапевтическим средством (то есть в составе фрагмента линкер-терапевтическое средство в ADC, как описано в данном документе). В еще нескольких других вариантах осуществления линкер способствует клеточной интернализации, будучи конъюгированным как с соединением ауристатина, так и с антигенсвязывающим белком по настоящему изобретению.

Множество иллюстративных линкеров, которые можно использовать с композициями и способами по настоящему изобретению, описаны в международной публикации заявки на патент № WO 2004-010957 и публикациях заявок на патент США №№ 2006/0074008, 20050238649 и 2006/0024317 (каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Следует понимать, что описанные выше терапевтические средства могут вводиться отдельно, т.е. не будучи конъюгированными с антигенсвязывающим белком, в различных вариантах осуществления.

Нагрузка лекарственным средством.

Нагрузка лекарственным средством обозначена как p и представляет собой среднее количество фрагментов, представляющих собой лекарственное средство, на один антигенсвязывающий белок в молекуле. Нагрузка лекарственным средством ("p") может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более фрагментов (D) на один антигенсвязывающий белок, хотя часто среднее число является дробным или десятичным. Как правило, часто применимой является нагрузка лекарственным средством, составляющая от 1 до 4, и также применимой является нагрузка, составляющая от 1 до 2. ADC по настоящему изобретению включают системы из антигенсвязывающего белка, конъюгированного с рядом фрагментов, представляющих собой лекарственное средство, в количестве от 1 до 20. Среднее количество фрагментов, представляющих собой лекарственное средство, на антигенсвязывающий белок в препаратах ADC из реакций конъюгирования может быть охарактеризовано традиционными способами, такими как масс-спектроскопия и анализ методом ELISA.

Также можно определить количественное распределение ADC в отношении p. В некоторых случаях разделение, очистка и получение характеристик гомогенных ADC, где p представляет собой определенное значение из ADC с другой нагрузкой лекарственным средством, могут быть достигнуты с помощью таких способов, как электрофорез.

Для некоторых ADC p может быть ограничено количеством сайтов присоединения в антигенсвязывающем белке. Например, если присоединение происходит по тиолу цистеина, как в приведенных выше иллюстративных вариантах осуществления, антигенсвязывающий белок может иметь только одну или несколько тиольных групп цистеина или может иметь только одну или несколько достаточно реакционноспособных тиольных групп, с помощью которых может присоединяться линкер. В некоторых вариантах осуществления более высокая нагрузка лекарственным средством, например p >5, может вызывать агрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю способности к проникновению в клетки у определенных конъюгатов антитело-лекарственное средство. В определенных вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC по настоящему изобретению находится в диапазоне от 1 до приблизительно 8; от приблизительно 2 до приблизительно 6; от приблизительно 3 до приблизительно 5; от приблизительно 3 до приблизительно 4; от приблизительно 3,1 до приблизительно 3,9; от приблизительно 3,2 до приблизительно 3,8; от приблизительно 3,2 до приблизительно 3,7; от приблизительно 3,2 до приблизительно 3,6; от приблизительно 3,3 до приблизительно 3,8 или от приблизительно 3,3 до приблизительно 3,7. Действительно, было показано, что для определенных ADC оптимальное соотношение фрагментов, представляющих собой лекарственное средство, и антигенсвязывающего белка может быть меньше 8, а может составлять от приблизительно 2 до приблизительно 5. См. публикацию заявки на патент США № 2005/0238649 A1 (включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

В определенных вариантах осуществления с антигенсвязывающим белком во время реакции конъюгирования конъюгируется меньшее, чем теоретический максимум, количество фрагментов, представляющих собой лекарственное средство. Антигенсвязывающий белок может содержать, например, лизиновые остатки, которые не реагируют с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом, как обсуждается ниже. Как правило, антитела не содержат много свободных и реакционноспособных тиольных групп цистеина, которые могут быть связаны с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство; действительно, большинство тиольных групп цистеиновых остатков в антителах существует в виде дисульфидных мостиков. В определенных вариантах осуществления антитело можно восстановить с помощью восстанавливающего средства, такого как дитиотреитол (DTT) или трикарбонилэтилфосфин (TCEP), в условиях частичного или полного восстановления для образования реакционноспособных тиольных групп цистеина. В определенных вариантах осуществления антитело подвергают воздействию денатурирующих условий для выявления реакционноспособных нуклеофильных групп, таких как лизин или цистеин.

Нагрузку (соотношение лекарственное средство/антигенсвязывающий белок) в ADC можно контролировать различными способами, например, посредством: (i) ограничения молярного избытка промежуточного соединения лекарственное средство-линкер или линкерного реагента по отношению к антителу, (ii) ограничения времени или температуры реакции конъюгирования, (iii) частичных или ограничивающих условий восстановления для модификации тиольной группы цистеина, (iv) конструирования с помощью рекомбинантных методик аминокислотной последовательности антигенсвязывающего белка таким образом, чтобы количество и положение цистеиновых остатков были модифицированы для контроля количества и/или положения присоединяемых компонентов линкер-лекарственное средство (как, например, в тио-Mab или тио-Fab, получаемых согласно раскрытому, например, в международной публикации заявки на патент № WO2006/034488 (включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте)).

Следует понимать, что если более одной нуклеофильной группы реагирует с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом, за которым расположен реагент, являющийся фрагментом, представляющим собой лекарственное средство, тогда полученный продукт представляет собой смесь соединений ADC с распределением одного или более фрагментов, представ-

ляющих собой лекарственное средство, присоединенных к антигенсвязывающему белку. Среднее количество лекарственных средств на один антигенсвязывающий белок может быть рассчитано из смеси с помощью анализа антител методом двойного ELISA, который является специфичным в отношении антигенсвязывающего белка и специфичным в отношении лекарственного средства. Отдельные молекулы ADC можно идентифицировать в смеси с помощью масс-спектроскопии и разделить с помощью HPLC, например, хроматографии гидрофобных взаимодействий.

В некоторых вариантах осуществления гомогенный ADC с одним значением нагрузки можно выделить из конъюгационной смеси с помощью электрофореза или хроматографии.

Композиции.

Составы для применения в соответствии с настоящим изобретением, готовят для хранения путем смешивания антигенсвязывающего белка, характеризующегося необходимой степенью чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е издание, под ред. Osol, A. [1980]) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно являются стерильными. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при применяемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид, гексаметония хлорид, бензалкония хлорид, бензетония хлорид, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (менее чем приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG).

Состав может также содержать более чем одно активное соединение, если это необходимо для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно с дополнительными активностями, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Например, может быть необходимым предоставить антигенсвязывающие белки с другими типами специфичности. Альтернативным образом или дополнительно композиция может содержать цитотоксическое средство, цитокин, ингибитор роста и/или низкомолекулярный антагонист, такой как любое из лекарственных средств, упомянутых в данном документе. Такие молекулы соответственно присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для заданной цели.

Активные ингредиенты также могут быть захвачены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или путем полимеризации на границе раздела фаз, например микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из поли(метилметакрилата), соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е издание, под ред. Osol, A. (1980).

Можно получать препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антигенсвязывающий белок, причем эти матрицы имеют форму формованных изделий, например пленки или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают в себя полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ-этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъецируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата лейпролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. Хотя полимеры, такие как этиленвинилацетат и сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты обеспечивают возможность высвобождения молекул в течение более 100 дней, определенные гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени.

Если инкапсулированные антитела остаются в организме в течение длительного времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит к потере биологической активности и возможным изменениям иммуногенности. Для стабилизации могут быть разработаны рациональные стратегии в зависимости от используемого механизма. Например, если обнаружено, что механизм агрегации заключается в образовании межмолекулярных S-S-связей посредством тиодисульфидного обмена, то стабилизация может быть достигнута посредством модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, контроля содержания влаги, применения соответст-

вующих добавок и разработки специфических полимерных матричных композиций.

Способы введения.

Антигенсвязывающий белок и, необязательно, совместно вводимое средство терапии, такое как химиотерапевтическое(-ие) средство(-а) или другое терапевтическое средства на основе антитела (например, антитело к PD-1), вводят субъекту в соответствии с клинически приемлемыми способами введения, такими как внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, подкожный, внутрисуставный, внутриочаговый, интрасиновиальный, интратекальный, пероральный, местный, внутриопухолевый пути введения, через афферентный лимфатический сосуд или ингаляционный путь введения. Внутривенное или подкожное введение антигенсвязывающего белка является предпочтительным. Предусматривается болюсная инъекция и непрерывная инфузия, а также локальное введение, например, в месте заболевания или травмы. Также предусматривается использование антигенсвязывающего белка (необязательно с другим терапевтическим средствам) в процедурах ex vivo. Например, кровь пациента или другая физиологическая жидкость может быть приведена в контакт с антигенсвязывающим белком ex vivo и необязательно вводиться. Антигенсвязывающий белок может быть связан с подходящей нерастворимой матрицей или твердым носителем.

Способы применения.

В настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту антигенсвязывающего белка (например, антитела или гетеродимерного антитела), описанного в данном документе. В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака (такого как рак предстательной железы или саркома Юинга) у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту антигенсвязывающего белка (например, антитела или гетеродимерного антитела), описанного в данном документе. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрено применение антигенсвязывающего белка (например, антитела или гетеродимерного антитела) по настоящему изобретению для лечения субъекта, нуждающегося в этом, например для лечения рака (например, рака предстательной железы или саркомы Юинга) у субъекта. Рак предпочтительно представляет собой рак, связанный с повышенной экспрессией STEAP1 (например, более 10000 STEAP1/клетка). Примеры рака включают без ограничения формы рака предстательной железы, молочной железы, поджелудочной железы, мочевого пузыря, желудочно-кишечного тракта, семенников, яичников, шейки матки, а также саркому (саркому Юинга) и меланому.

Способы лечения субъекта, описанные в данном документе, предназначены для обеспечения улучшения в отношении заболевания или состояния и/или улучшения в отношении симптомов, связанных с заболеванием или состоянием. Например, терапевтический ответ будет относиться к одному или нескольким из следующих вариантов улучшения при заболевании: (1) уменьшение количества неопластических клеток; (2) повышение уровня гибели неопластических клеток; (3) подавление выживаемости неопластических клеток; (5) подавление (т.е. замедление до некоторой степени, предпочтительно прекращение) роста опухоли или появления новых очагов поражения; (6) повышение уровня выживаемости пациентов; и/или (7) некоторое облегчение в отношении одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием или состоянием (например, в контексте рака предстательной железы - частого мочеиспускания, никтурии, гематурии, дизурии или боли в костях; в контексте саркомы Юинга - боли, отека или болезненных ощущений в пораженной области).

Терапевтические ответы при любом конкретном заболевании или состоянии можно определить по стандартизованным критериям ответа, специфичным для данного заболевания или состояния. Ответ опухоли можно оценить с помощью таких скрининговых методик, как магнитно-резонансная томография (МРТ), рентгенографическая визуализация, компьютерная томография (КТ), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), сканирование костей, ультразвуковое исследование, биопсия опухоли, подсчет опухолевых клеток в кровотоке и/или измерение уровней опухолевого антигена (например, специфического антигена предстательной железы (PSA) и/или альфа-фетопротеина (AFP)). В дополнение к этим терапевтическим ответам субъект, подвергающийся терапии, может испытать положительный эффект улучшения в отношении симптомов, связанных с заболеванием.

Субъект представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека, необязательно человека мужского пола. В контексте рака у субъекта может быть диагностирована любая стадия заболевания (т.е., стадия I, стадия II, стадия III или стадия IV рака предстательной железы), или он может быть подвержен риску развития рака, который еще не был клинически подтвержден.

Что касается рака предстательной железы, у субъекта может наблюдаться уменьшение выраженности симптомов, связанных с раком предстательной железы (таких, как описанные в данном документе), уменьшение размера опухоли, снижение уровней маркеров рака предстательной железы, снижение скорости появления новых очагов поражения и т.п. В различных аспектах способы по настоящему изобретению дополнительно включают мониторинг лечения у субъекта. Предусматривается любое улучшение самочувствия субъекта (например, отсутствие клинически выявляемого заболевания, любое снижение (такое как уменьшение на по меньшей мере приблизительно 50%) поддающейся измерению опухолевой нагрузки (т.е. количества злокачественных клеток, присутствующих в организме субъекта, или измеренного объема опухолевых масс) при отсутствии новых очагов поражения, уменьшение боли, улучшение в

отношении мочеиспускания).

Лечение в соответствии с настоящим изобретением предусматривает "терапевтически эффективное количество" используемых лекарственных средств. "Терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения необходимого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст, пол и вес индивидуума, а также способность лекарственных средств вызывать необходимый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое, при котором терапевтически благоприятные эффекты превосходят любые токсичные или пагубные эффекты. "Терапевтически эффективное количество" для лечения опухолей также можно измерять по его способности стабилизировать прогрессирование заболевания. Иллюстративный неограничивающий диапазон терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению составляет приблизительно 0,1-100 мг/кг. Композиции для парентерального введения могут быть составлены в виде единичной лекарственной формы для облегчения введения и единообразия дозировки. Единичная лекарственная форма, используемая в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; при этом каждая единица содержит предварительно заданное количество терапевтического средства, рассчитанное для получения необходимого биологического эффекта, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок (например, моноспецифическое антитело или гетеродимерное антитело) применяют в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, например с химиотерапевтическим средством или иммунотерапевтическим средством. Дополнительное(-ые) терапевтическое(-ие) средство(-а) можно вводить последовательно (в пределах минут, часов, дней или недель друг от друга) или параллельно; их также можно вводить пациенту в виде предварительно смешанной единой композиции.

Неограничивающие примеры химиотерапевтических средств, вызывающих повреждение ДНК, включают ингибиторы топоизомеразы I (например, иринотекан, топотекан, камптотецин и их аналоги или метаболиты, и доксорубицин); ингибиторы топоизомеразы II (например, этопозид, тенипозид и даунорубицин); алкилирующие средства (например, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, тиотепу, ифосфамид, кармустин, ломустин, семистин, стрептозоцин, декарбазин, метотрексат, митомицин С и циклофосфамид); интеркаляторы ДНК (например, цисплатин, оксалиплатин, эпирубицин и карбоплатин); интеркаляторы ДНК и генераторы свободных радикалов, такие как блеомицин; и миметики нуклеозидов (например, 5-фторурацил, капецитабин, гемцитабин, флударабин, цитарабин, меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и гидроксимочевину).

Химиотерапевтические средства, которые нарушают репликацию клеток, включают без ограничения паклитаксел, доцетаксел и родственные аналоги; кабазитаксел; винкристин, винбластин и родственные аналоги; талидомид, леналидомид и родственные аналоги (например, CC-5013 и CC-4047); ингибиторы протеинтирозинкиназы (например, иматиниба мезилат и гефитиниб); ингибиторы протеасом (например, бортезомиб); ингибиторы NF-κB, включая ингибиторы киназы IκB; антитела, которые связываются с белками, сверхэкспрессируемыми при формах рака, и таким образом подавляют репликацию клеток (например, трастузумаб, ритуксимаб, цетуксимаб и бевацизумаб); и другие ингибиторы белков или ферментов, которые, как известно, являются стимулируемыми, сверхэкспрессируемыми или активируемыми при формах рака, ингибирование которых приводит к снижению репликации клеток.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок (например, моноспецифическое антитело или гетеродимерное антитело) по настоящему изобретению можно использовать до, одновременно с лечением доцетакселом или после него. В различных аспектах антигенсвязывающий белок (например, моноспецифическое антитело или гетеродимерное антитело) вводят в качестве части плана лечения, который включает хирургическое вмешательство и/или лучевую терапию (например, дистанционную лучевую терапию или брахитерапию).

В различных аспектах антигенсвязывающий белок (например, моноспецифическое антитело или гетеродимерное антитело) предусмотрен в качестве части плана лечения, который также включает введение средств гормональной терапии (например, средств андроген-депривационной терапии, таких как средства, которые блокируют высвобождение или продуцирование рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона (например, лейпролид, гозерелин, трипторелин или дегареликс), антиандрогенов (например, бикалутамида, флутамида или нилутамида), кетоконазола, абиратерона ацетата, энзалутамида).

В различных аспектах антигенсвязывающий белок (например, моноспецифическое антитело или гетеродимерное антитело) предусмотрен в качестве части плана лечения, который также включает введение другого средства иммунотерапии (например, сипулейцела-Т, бевацизумаба, атезолизумаба, авелумаба, ипилимумаба, тремелимумаба, AM-224, MDX-1105, эфтилагимода альфа (IMP321) или эноблитузумаба (MGA271)). В этом отношении способ необязательно включает введение другого антигенсвязывающего белка, который нацелен на другой антиген, такой как антиген, ассоциированный с раком, или антиген, ассоциированный с иммунным ответом. Например, в различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий STEAP1, вводят субъекту вместе с антигенсвязывающим белком,

связывающим PD-1 (например, антителом), который снижает, блокирует, ингибирует, прекращает или препятствует передаче сигнала, которая происходит при взаимодействии PD-1 с одним или несколькими его партнерами по связыванию, такими как PD-L1 или PD-L2. В конкретном аспекте антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, ингибирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, ослабляет отрицательный костимулирующий сигнал, опосредуемый или передаваемый белками клеточной поверхности, экспрессирующимися на Т-лимфоцитах и опосредующими передачу сигнала с помощью PD-1, таким образом, что он уменьшает степень нарушения функции в Т-клетке с нарушенной функцией (например, обеспечивая усиление ответов эффекторов на распознавание антигена). Примеры антител к PD-1 включают ниволумаб (BMS-936558), пембролизумаб (MK-3475), BMS 936558, BMS-936559, TSR-042 (Tesaro), ePDR001 (Novartis) и пидилизумаб (CT-011). Хотя настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим белкам, связывающим PD-1, в нем также предусмотрено применение других антагонистов связывания PD-1, которые снижают, блокируют, ингибируют, прекращают или препятствуют передаче сигнала, которая происходит при взаимодействии PD-1 с одним или несколькими его партнерами по связыванию, такими как PD-L1, PD-L2.

Представленное в данном документе раскрытие в отношении антигенсвязывающих белков, связывающих STEAP1, также относится к антигенсвязывающим белкам, связывающим PD-1. Например, в различных случаях антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, представляет собой антитело, такое как моноклональный IgG. Антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 являются одновалентными или двухвалентными. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 связываются с PD-1 человека, который имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 187. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 связываются с PD-1 яванского макака, который имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 188. В иллюстративных примерах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 связываются как с PD-1 человека, так и с PD-1 яванского макака.

В иллюстративных вариантах осуществления прочность связывания антитела к PD-1, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или белкового продукта на основе антитела к PD-1 с PD-1 может быть описана посредством KD. В иллюстративных аспектах KD антитела к PD-1, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или белкового продукта на основе антитела к PD-1, предусмотренных в данном документе, составляет приблизительно 10^{-1} M, приблизительно 10^{-2} M, приблизительно 10^{-3} M, приблизительно 10^{-4} M, приблизительно 10^{-5} M, приблизительно 10^{-6} M, приблизительно 10^{-7} M, приблизительно 10^{-8} M, приблизительно 10^{-9} M или меньше. В иллюстративных аспектах KD антитела к PD-1, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или белкового продукта на основе антитела к PD-1, предусмотренных в данном документе, находится в микромолярном, наномолярном, пикомолярном или фемтомолярном диапазоне. В иллюстративных аспектах KD антитела к PD-1, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или белкового продукта на основе антитела к PD-1, предусмотренных в данном документе, находится в диапазоне от приблизительно 10^{-4} до 10^{-6} M, или от 10^{-7} до 10^{-9} M, или от 10^{-10} до 10^{-12} M, или от 10^{-13} до 10^{-15} M. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 характеризуются высокой аффинностью в отношении PD-1 человека, PD-1 яванского макака или их обоих. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 характеризуются KD в отношении PD-1 человека, составляющей менее 100 пМ, необязательно от приблизительно 1 пМ до приблизительно 50 пМ. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 характеризуются KD в отношении PD-1 человека, находящейся в диапазоне от приблизительно 1 пМ до приблизительно 20 пМ или составляющей менее чем приблизительно 10 пМ. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 характеризуются KD в отношении PD-1 яванского макака, составляющей менее 100 пМ, необязательно от приблизительно 1 пМ до приблизительно 75 пМ. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 характеризуются KD в отношении PD-1 яванского макака, находящейся в диапазоне от приблизительно 1 пМ до приблизительно 20 пМ или составляющей менее чем 10 пМ.

В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 ингибируют по меньшей мере 50% связывающих взаимодействий между PD-1 и PD-L1 или PD-L2. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 демонстрируют по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60% или по меньшей мере приблизительно 70% ингибирование связывающего взаимодействия между PD-1 и PD-L1 или PD-L2.

В иллюстративных примерах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 ингибируют опосредованное PD-1 продуцирование IL-2 Т-

клетками в реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR). В иллюстративных аспектах IC50 антитела к PD-1, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или белкового продукта на основе антитела к PD-1 в MLR находится в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 5 нМ. В иллюстративных аспектах IC50 антитела к PD-1, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или белкового продукта на основе антитела к PD-1 в MLR составляет менее 2 нМ или менее 1 нМ. В иллюстративных аспектах IC50 антитела к PD-1, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или белкового продукта на основе антитела к PD-1 в MLR составляет от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 2 нМ.

Способы тестирования антител в отношении способности связываться с PD-1 известны из уровня техники и включают любой подходящий анализ связывания антитела и антигена, такой как, например, радиоиммунологический анализ (RIA), ELISA, вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, SPR и анализы конкурентного ингибирования (см., например, Janeway et al. ниже, и публикацию заявки на патент США № 2002/0197266, а также представленный выше раздел, относящийся к конкурентным анализам). Другие анализы связывания, например анализы конкурентного связывания или конкурентные анализы, в которых тестируют способность антитела конкурировать со вторым антителом за связывание с антигеном или с его эпитопом, могут применяться для тестирования способности антитела связываться с PD-1. См., например, публикацию заявки на патент США № 2014/0178905; Chand et al., Biologicals 46: 168-171 (2017); Liu et al., Anal Biochem 525: 89-91 (2017); и Goolia et al., J Vet Diagn Invest 29(2): 250-253 (2017). Также из уровня техники известны другие способы сравнения двух антител, и они включают, например, поверхностный плазмонный резонанс (SPR). SPR можно применять для определения констант связывания антитела и второго антитела, и две константы связывания можно сравнивать. Настоящее изобретение предусмотрено использование антигенсвязывающего белка, связывающего PD1, который конкурирует с любым из антител к PD-1, описанных в данном документе, за связывание с белком PD-1 или перекрестно блокирует такое связывание, в контексте раскрытого способа.

Иллюстративный способ определения аффинности связывания с PD-1 человека и яванского макака является следующим. Антитела инкубируют в лунках, содержащих 3-кратное последовательное разведение растворимых рекомбинантных рецепторов человека PD-1(1-170)-FLAG-His или яванского макака PD-1(1-167)-FLAG-His. В обоих случаях может быть выбрана максимальная концентрация PD-1, составляющая 30 нМ. Можно применять ассоциацию в течение 300 секунд и диссоциацию в течение 500 секунд, поскольку эти параметры как правило позволяют получить достаточную кривизну для точной аппроксимации кинетических кривых. Аффинность связывания с PD-1 человека/яванского макака может быть определена количественно с помощью приборов ForteBio Octet HTX и RED384. Стандартный буфер для образцов для Octet можно применять для разбавления образцов и для стадий связывания - исходной, ассоциации и диссоциации (например, 10 мМ Tris, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мМ CaCl2, 0,10 мг/мл BSA, 0,13% (об./об.) Triton X-100). Исходные данные, полученные с помощью ForteBio, могут быть обработаны с применением стандартного программного обеспечения для анализа показаний прибора (v9 и v10) следующим образом: (a) две кривые эталонов, в которых была иммобилизована мишень, но отсутствовало взаимодействие (т.е. присутствовал только буфер), усредняют и вычитают из кривых остальных образцов в том же столбце; (b) кривые ассоциации и диссоциации выделяют и выравнивают по оси Y; (c) осуществляют выравнивание между стадиями ассоциации и диссоциации; (d) применяют фильтрацию Савицкого-Голея для уменьшения отношения сигнал-шум; и (e) полученный в результате набор кривых ассоциации и диссоциации для каждого взаимодействия образец-мишень в целом аппроксимируют по одной модели связывания 1:1 для определения измеряемых значений константы скорости ассоциации ka и константы скорости диссоциации kd; равновесную константу диссоциации KD рассчитывают в виде соотношения констант скоростей диссоциации и ассоциации (= kd/ka).

В иллюстративных примерах антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела) содержит аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области 1 тяжелой цепи (HC) (vhCDR1), представленную под SEQ ID NO: 189, аминокислотную последовательность CDR2 HC (vhCDR2), представленную под SEQ ID NO: 190, аминокислотную последовательность CDR3 HC (vhCDR3), представленную под SEQ ID NO: 191, аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC) (vlCDR1), представленную под SEQ ID NO: 192, аминокислотную последовательность CDR2 LC (vlCDR2), представленную под SEQ ID NO: 193, и аминокислотную последовательность CDR3 LC (vlCDR3), представленную под SEQ ID NO: 194. В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела) содержит вариабельную область тяжелой цепи (vh), содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90% идентичной (например, на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентичной) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 195, и/или вариабельную область легкой цепи (vl), содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90% идентичной (например, на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентичной) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 196. В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела) содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90%

идентичной (например, на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 197 и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90% идентичной (например, на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на 100% идентичной) аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 198.

В иллюстративных аспектах описанная в данном документе конструкция, связывающая STEAP1, является частью схемы лечения, которая включает введение цитокина, лимфокина, фактора роста или гемопоэтического фактора, эффективного в ингибировании метастазирования опухоли и/или обладающего антипролиферативным эффектом в отношении по меньшей мере одной популяции клеток. Такие цитокины, лимфокины, факторы роста или другие гемопоэтические факторы включают без ограничения: M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, TNFα, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, тромбопоэтин, фактор роста стволовых клеток и эритропоэтин. Дополнительные факторы роста включают, например, ангиогенин, костный морфогенетический белок 1, костный морфогенетический белок 2, костный морфогенетический белок 3, костный морфогенетический белок 4, костный морфогенетический белок 5, костный морфогенетический белок 6, костный морфогенетический белок 7, костный морфогенетический белок 8, костный морфогенетический белок 9, костный морфогенетический белок 10, костный морфогенетический белок 11, костный морфогенетический белок 12, костный морфогенетический белок 13, костный морфогенетический белок 14, костный морфогенетический белок 15, рецептор IA костного морфогенетического белка, рецептор IB костного морфогенетического белка, нейротрофический фактор головного мозга, цилиарный нейротрофический фактор, рецептор а цилиарного нейротрофического фактора, цитокин-индуцируемый хемотаксический фактор нейтрофилов 1, цитокин-индуцируемый хемотаксический фактор нейтрофилов 2α, цитокин-индуцируемый хемотаксический фактор нейтрофилов 2β, β-фактор роста эндотелиальных клеток, эндотелин 1, эпителиальный аттрактант нейтрофилов, рецептор α 1 нейротрофического фактора линии глиальных клеток, рецептор α 2 нейротрофического фактора линии глиальных клеток, белок, связанный с ростом, белок α, связанный с ростом, белок β, связанный с ростом, белок γ, связанный с ростом, гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста, фактор роста гепатоцитов, рецептор фактора роста гепатоцитов, инсулиноподобный фактор роста I, рецептор инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобный фактор роста II, белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста, фактор роста кератиноцитов, фактор, ингибирующий лейкоз, рецептор α фактора, ингибирующего лейкоз, фактор роста нервов, рецептор фактора роста нервов, нейротрофин-3, нейротрофин-4, фактор, стимулирующий рост пре-B-клеток, фактор роста стволовых клеток, рецептор фактора роста стволовых клеток, трансформирующий фактор роста α, трансформирующий фактор роста β, трансформирующий фактор роста β1, трансформирующий фактор роста β1.2, трансформирующий фактор роста β2, трансформирующий фактор роста β3, трансформирующий фактор роста β5, латентный трансформирующий фактор роста β1, белок I, связывающий трансформирующий фактор роста β, белок II, связывающий трансформирующий фактор роста β, белок III, связывающий трансформирующий фактор роста β, рецептор фактора некроза опухоли I типа, рецептор фактора некроза опухоли II типа, рецептор активатора плазминогена урокиназного типа, а также химерные белки на их основе и их биологически или иммунологически активные фрагменты. В иллюстративных вариантах осуществления конструкцию, связывающую STEAP1, вводят в качестве части терапевтического режима, включающего введение антитела, специфического в отношении любого из вышеупомянутых цитокинов, лимфокинов, факторов роста или других гемопоэтических факторов.

Настоящее изобретение предусматривает применение антигенсвязывающего белка или гетеродимерного антитела, связывающих STEAP1, при получении лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом. Необязательно, лекарственное средство предназначено для введения эффективного количества антигенсвязывающего белка или гетеродимерного антитела, связывающих STEAP1, в сочетании с эффективным количеством антигенсвязывающего белка, связывающего PD-1 (например, любого антигенсвязывающего белка, связывающего PD-1, описанного в данном документе).

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены антигенсвязывающий белок или гетеродимерное антитело, связывающие STEAP1, описанные в данном документе, для применения при лечении рака у субъекта, нуждающегося в этом (т.е. при способе лечения рака, такого как рак предстательной железы или саркома Юинга, у субъекта, нуждающегося в этом). Необязательно, антигенсвязывающий белок или гетеродимерное антитело, связывающие STEAP1, вводят вместе с антигенсвязывающим белком, связывающим PD1. Под "введением вместе с" подразумевается, что антигенсвязывающий белок или гетеродимерное антитело, связывающие STEAP1, являются частью терапевтического режима, который включает введение антигенсвязывающего белка, связывающего PD1. Действительно, антигенсвязывающий белок, связывающий STEAP1 (например, гетеродимерное антитело), можно использовать до, одновременно с или после лечения с помощью антигенсвязывающего белка, связывающего PD1. Введение антигенсвязывающего белка или гетеродимерного антитела, связывающих STEAP1, и антигенсвязывающего белка, связывающего PD1, необязательно должно происходить одновременно, хотя в настоящем

изобретении предусмотрены варианты осуществления, в которых компоненты включены в одну фармацевтическую композицию и вводятся вместе. В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения, где антигенсвязывающий белок или гетеродимерное антитело, связывающие STEAP1, и антигенсвязывающий белок, связывающий PD1, присутствуют в отдельных фармацевтических композициях, которые вводят параллельно или вводят близко по времени. Антигенсвязывающий белок или гетеродимерное антитело, связывающие STEAP1, и антигенсвязывающий белок, связывающий PD1, можно вводить последовательно (например, в пределах минут, часов, дней или недель друг от друга) в любом порядке. Способы введения описаны выше.

Описанный в данном документе антигенсвязывающий белок, связывающий STEAP1, также можно использовать, например, в анализах для обнаружения присутствия STEAP1 либо in vitro, либо in vivo. Антигенсвязывающий белок также можно применять для очистки STEAP1, например, с помощью иммуноаффинной хроматографии.

Нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева.

В настоящем изобретении также предусмотрены композиции нуклеиновых кислот, кодирующие антигенсвязывающий белок (например, моноспецифическое антитело или гетеродимерное антитело), описанный в данном документе. Нуклеиновые кислоты, кодирующие компоненты антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению, можно включить в векторы экспрессии, как известно в данной области техники и в зависимости от клеток-хозяев, применяемых для получения антигенсвязывающего белка. Примеры векторов экспрессии включают без ограничения плазмиды, вирусные векторы, векторы млекопитающих, отличные от эписом, и другие векторы экспрессии. Как правило, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая необходимый полипептид, функционально связана с любым количеством регуляторных элементов (промоторов, точек начала репликации, селектируемых маркеров, сайтов связывания рибосом, индукторов и т.д.). Векторы экспрессии могут быть внехромосомными или интегрирующими векторами.

Затем нуклеиновые кислоты и/или векторы экспрессии по настоящему изобретению необязательно вводят в любое количество различных типов клеток-хозяев, как хорошо известно в данной области техники, включая клетки млекопитающих, бактерий, дрожжей, насекомых и/или грибов, при этом клетки млекопитающих (например, клетки CHO) находят применение во многих вариантах осуществления. В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены такие клетки-хозяева, в которые был введен вектор экспрессии, кодирующий антигенсвязывающий белок. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию клеток почки обезьяны COS-7 (ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), L-клетки, клетки эмбриональной почки человека 293 или их производные (например, HEK293T, HEK293-EBNA), клетки C127, клетки фибробластов эмбриона мыши (клетки 3T3) (ATCC CCL 163), клетки яичника китайского хомячка (CHO) и их производные (например, CHO-K1, CHO pro-3), клетки миеломы мыши (например, NSO, GS-NSO, Sp2/0), раковые клетки шейки матки человека (клетки HeLa), клетки почки новорожденного хомячка (BHK) (ATCC CRL 10), эпителиальные клетки остеосаркомы кости человека U2-OS, базальные клетки альвеолярного эпителия аденокарциномы человека (A549), клетки фибросаркомы человека (HT1080), опухолевые клетки мозга мыши (CAD), клетки эмбриональной карциномы (P19), клетки нейробластомы мыши (N2a), раковые клетки молочной железы человека (MCF-7), клетки ретинобластомы (Y79), клетки ретинобластомы человека (SO-Rb50), раковые клетки печени человека (Hep G2), клетки B-клеточной миеломы мыши (J558L) и клетки почки африканской зеленой мартышки (например, клетки COS, клетки VERO и их производные (включая линию клеток CVI/EBNA, полученную из линии клеток почки африканской зеленой мартышки CVI (ATCC CCL 70), как описано в McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821)). Трансформированные клетки можно культивировать в условиях, которые способствуют экспрессии антигенсвязывающего белка, и этот белок выделяют с помощью традиционных процедур очистки белка. Одна из таких процедур очистки включает применение аффинной хроматографии, например, на матрице, с которой связан весь или часть (например, одна или несколько внеклеточных петель) STEAP1. Антигенсвязывающие белки, предусмотренные для использования в данном документе, включают по существу гомогенные рекомбинантные антигенсвязывающие белки, по существу не содержащие загрязняющих эндогенных материалов.

Что касается гетеродимерных антител, в различных аспектах предусмотрена композиция, которая содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую первый мономер, нуклеиновую кислоту, кодирующую второй мономер, и нуклеиновую кислоту, кодирующую общую легкую цепь. В настоящем изобретении также предусмотрены конструкции нуклеиновых кислот, кодирующие части мономеров и общую легкую цепь, например Fab, связывающий STEAP1, или фрагменты антител, содержащие шесть CDR, описанных в данном документе, которые связывают STEAP1, scFv, связывающий CD3, вариабельные домены легкой и/или тяжелой цепи, которые связывают STEAP1 и/или CD3, и т.п.

В некоторых вариантах осуществления каждая из нуклеиновых кислот, кодирующих каждый мономер, и необязательно нуклеиновой кислоты, кодирующей общую легкую цепь, содержится в отдельном векторе экспрессии, как правило, под контролем разных промоторов или одного и того же. В различных вариантах осуществления каждая из этих двух или трех нуклеиновых кислот содержится в отдельном векторе экспрессии. Как описано в публикации патента США № 2016/0215063 (включенной в данный

документ посредством ссылки во всей своей полноте и, в частности, в отношении обсуждения продуцирования рекомбинантных антител), для управления образованием гетеродимеров можно применять различные соотношения векторов. Неожиданно оказалось, что в примерах, где в конструкциях антител содержатся первый мономер:второй мономер:легкие цепи в соотношении 1:1:2, эти соотношения необязательно дают наилучшие результаты. См. фиг. 65 публикации патента США № 2016/0215063, включенной в данный документ посредством ссылки. В различных аспектах в настоящем изобретении предусмотрена композиция на основе нуклеиновой кислоты, содержащая: a) первый вектор экспрессии, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый мономер; b) второй вектор экспрессии, содержащий вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй мономер; и c) третий вектор экспрессии, содержащий третью нуклеиновую кислоту, кодирующую общую легкую цепь. В альтернативных вариантах осуществления третья нуклеиновая кислота, кодирующая общую легкую цепь, присутствует в том же векторе экспрессии, что и первая или вторая нуклеиновая кислота.

Гетеродимерные антитела необязательно получают путем культивирования клеток-хозяев, содержащих вектор(-ы) экспрессии. После получения осуществляют стадии очистки антител, обычно включая стадию ионообменной хроматографии. Как обсуждается в данном документе, если pI двух мономеров отличается по меньшей мере на 0,5, это может обеспечивать возможность разделения с помощью ионообменной хроматографии или изоэлектрического фокусирования или других способов, чувствительных к изоэлектрической точке. То есть включение pI-замен, которые изменяют изоэлектрическую точку (pI) каждого мономера таким образом, что каждый мономер характеризуется отличающейся pI, и гетеродимер также характеризуется отдельной pI, что облегчает изоэлектрическую очистку гетеродимера (например, анионообменные колонки, катионообменные колонки). Эти замены также помогают в определении и мониторинге любого загрязнения после очистки гомодимеров mAb (например, IEF-гелей, cIEF и аналитических колонок IEX).

Наборы.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению предусмотрен в наборе. В иллюстративных аспектах набор содержит антигенсвязывающий белок в виде однократной дозы (т.е. в виде дискретного количества, диспергированного в подходящем носителе). В иллюстративных аспектах набор содержит несколько однократных доз, например недельный или месячный запас однократных доз, при этом необязательно каждая из них упакована по отдельности или иным образом отделена от других однократных доз. В некоторых вариантах осуществления компоненты набора/однократная доза упакованы вместе с инструкцией по введению пациенту. В некоторых вариантах осуществления набор содержит одно или несколько устройств для введения пациенту, например иглу и устройство для доставки (такое как шприц) и т.п. В некоторых аспектах антигенсвязывающий белок предварительно упакован в готовую к использованию форму, например в шприц, пакет для внутривенного введения и т.д., хотя также предусматривается, что антигенсвязывающий белок может быть предоставлен в лиофилизированной форме, требующей восстановления. В некоторых аспектах набор дополнительно содержит другие терапевтические или диагностические средства или фармацевтически приемлемые носители (например, растворители, буферы, разбавители и т.д.), в том числе любые из описанных в данном документе.

Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, цитируемые в данном документе, настоящим включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждый документ был отдельно и конкретно указан как включенный посредством ссылки и был представлен во всей своей полноте в данном документе.

Следующие примеры даны лишь для иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивают каким-либо образом его объем.

Примеры

Пример 1.

В этом примере описывается обнаружение STEAP1 на поверхности раковых клеток предстательной железы с применением моноспецифического антитела, как описано выше.

Раковые клетки предстательной железы (клетки C4-2B-luc (фиг. 11A) или клетки C4-2B-luc$^{STEAP1\ KO}$ (фиг. 11B)), которые были сконструированы с применением CRISPR-конструкции, направленной против STEAP1, таким образом, чтобы они утратили способность экспрессировать STEAP1, инкубировали с антителом изотипического контроля или мышиным моноклональным антителом к STEAP1 (Ab-Am) в концентрации 10 мкг/мл в течение 1 ч при 4°C. Связанный с клеткой Ab-Am обнаруживали с помощью проточной цитометрии после инкубации с вторичным антителом к IgG мыши, конъюгированным с FITC (фиг. 11A) или конъюгированным с APC (фиг. 11B). По значениям флуоресценции FITC или APC, идентифицирующим STEAP1-зависимый сигнал, строили гистограммы (гистограммы со сплошной серой заливкой) и сравнивали с изотипическим контролем (гистограммы с белой заливкой). Результаты показаны на фиг. 11A и 11B.

Пример 2.

В этом примере описывается определение характеристик антител к STEAP1.

Была создана панель из 22 мышиных моноклональных антител к STEAP1 человека. Для антитела A

с помощью проточной цитометрии продемонстрировано улучшение свойств связывания (связывание родительских mAb, FACS-смещение LnCAP(+)/DU145(-) (кратность изменения)) по сравнению с другими проанализированными антителами: Ab-A (60,1), Ab-B (3,6), Ab-C (2,4) и Ab-D (4,3).

Для определения области STEAP1, распознаваемой антителом по настоящему изобретению, создали химерные конструкции, в которых каждую из трех внеклеточных петель STEAP1 заменили соответствующей областью STEAP2 и экспрессировали в клетках 293. Ab-A связывает STEAP1 и не связывает STEAP2. Замена внеклеточных петель 1 и 3 STEAP1 соответствующими петлями из STEAP2 приводила к прекращению связывания, в то время как связывание Ab-A с STEAP1 не нарушалось, когда внеклеточную петлю 2 заменяли аналогом из STEAP2. Ab-A, по-видимому, связывается с STEAP1 вне внеклеточной петли 2.

Гетеродимерные антитела, содержащие плечо, связывающее STEAP-1, из Ab-A1, Ab-A2 (N67Q) и Ab-B1, и плечо, связывающее CD3, получали в формате "XmAb", как описано, например, в публикации патента США № 2016/0215063. Эти гетеродимерные антитела проявляли TDCC-активность (пМ): Ab-A1x (273,8), Ab-A2x (387,9) и Ab-B1x (128,7).

Пример 3.

В этом примере сравнивается уровень связывания с клетками C4-2B (характеризуемый с помощью EC50) биспецифического антитела к STEAP1/CD3 (XmAb) с другим каркасом и гетеродимерного антитела к STEAP1/CD3 по настоящему изобретению ($Xmab^{2+1}$).

Было создано три гуманизированных антитела к STEAP1 (Ab-Al, Ab-A2(N67Q) и Ab-B1) в формате "XmAb", как описано, например, в публикации патента США № 2016/0215063 (включенной в данный документ посредством ссылки, особенно в отношении обсуждения форматов "открывалки"). Формат XmAb предусматривает первую тяжелую цепь, содержащую Fc-домен, присоединенный к scFv, связывающему CD3; вторую тяжелую цепь, содержащую Fc-домен и первый вариабельный домен тяжелой цепи; и легкую цепь, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. Вариабельный домен тяжелой цепи и указанный вариабельный домен легкой цепи связываются с STEAP1. Два гуманизированных антитела к STEAP1 создали в гетеродимерном формате $XmAb^{2+1}$ (Ab-A1 $XmAb^{2+1}$ и Ab-B1 $XmAb^{2+1}$). Последовательности CDR Ab-A1 $XmAb^{2+1}$ и Ab-B1 $XmAb^{2+1}$ представлены под SEQ ID NO: 11-16 (Ab-A1 $XmAb^{2+1}$) и SEQ ID NO: 30-35 (Ab-B1 $XmAb^{2+1}$). Также был создан вариант Ab-A1 $XmAb^{2+1}$, имеющий модификацию N67Q, обозначенный в данном документе как Ab-A2(N67Q) $XmAb^{2+1}$. Последовательности CDR Ab-A2(N67Q) $XmAb^{2+1}$ представлены под SEQ ID NO: 11-13, 14, 16 и 21. Обозначения антител Ab-A2 и Ab-A2(N67Q) $XmAb^{2+1}$ используются в данном документе взаимозаменяемо. Оценили способность гетеродимерных биспецифических антител связываться с STEAP1, экспрессируемым на поверхности раковых клеток предстательной железы C4-2B, наряду с тремя мышиными антителами к STEAP1 в формате XmAb (Ab-Mx1, Ab-Mx2 и Ab-Mx3), которые не были гуманизированы.

Клетки C4-2B-luc инкубировали с возрастающими концентрациями Ab-A1 $XmAb^{2+1}$, Ab-A1 Xmab, Ab-B1 Xmab, Ab-Mx1, Ab-Mx2 и Ab-Mx3 до 5 мкМ в течение 1 часа при 4°C. Связанные с клетками антитела обнаруживали с помощью проточной цитометрии после инкубации с вторичным антителом к IgG человека, конъюгированным с APC, и анализировали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) для канала APC при возрастающих концентрациях соответствующих антител. Как показано в табл. 3, для Ab-A1 $Xmab^{2+1}$ был продемонстрирован уровень связывания клеток, который был в 65 раз ниже, чем EC50, определенная по связыванию, того же связывающего средства в формате XmAb (т.е. Ab-A1 Xmab), что свидетельствовало об очень сильной авидности, превышающей таковую у соответствующего XmAb. Применение формата $XmAb^{2+1}$ обеспечивало значительное улучшение связывания связывающего средства Ab-A с STEAP1, экспрессируемым на раковых клетках предстательной железы.

Таблица 3

EC50 XmAb к STEAP и $Xmab^{2+1}$ к STEAP, определенная по связыванию с клетками C4-2B

Молекула антитела	**EC50 (нМ)**
Ab-A1 Xmab	144,0
Ab-B1 Xmab	798,1
Ab-Mx1	1226
Ab-Mx2	1252
Ab-Mx3	5005
Ab-A1 $XmAb^{2+1}$	2,203

Эксперимент повторяли с Ab-A в различных форматах (Ab-A (традиционное моноспецифическое антитело, не гуманизированное), Ab-A1 в формате XmAb, Ab-A1 в формате $Xmab^{2+1}$, Ab-A2(N67Q) в формате $Xmab^{2+1}$ (с модификацией N67Q)) и Ab-B в формате XmAb. Клетки C4-2B-luc инкубировали с возрастающими концентрациями молекул XmAb или $XmAb^{2+1}$ к STEAPI до 5 мкМ в течение одного часа при 4°C. Связанные с клетками XmAb обнаруживали с помощью проточной цитометрии после инкуба-

ции с вторичным антителом к IgG человека, конъюгированным с APC, и отображали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) канала APC при возрастающих концентрациях соответствующих молекул XmAb к STEAPI. Результаты показаны на фиг. 12A-12C, и на фиг. 13, и в табл. 4 ниже.

Таблица 4

EC50, определенная по связыванию с клетками C4-2B-luc

Формат	**Средство, связывающие STEAP1**	**Вид, к которому относится связывающее средство**	**EC_{50} (нМ)**
mAb	Ab-A	Мышиное	1,2
XmAb	Ab-A1 Xmab	Гуманизированное	144
$XmAb^{2+1}$	Ab-A1 $XmAb^{2+1}$	Гуманизированное	2,2
$XmAb^{2+1}$	AbA2-(N67Q) $XmAb^{2+1}$	Гуманизированное	1,2
XmAb	Ab-B1 XmAb	Гуманизированное	48,9

Все антитела связывали STEAP1, независимо от гетеродимерного формата. Для формата $XmAb^{2+1}$ было продемонстрировано улучшенное связывание с STEAP1 по сравнению с другими форматами антител.

TDCC-активность также оценивали с применением способов, аналогичных описанным выше. Все проанализированные антитела проявили TDCC-активность, причем для антител в формате $XmAb^{2+1}$ был продемонстрирован лучший уровень активности, чем для антител Xmab: Ab-A XmAb (EC50=274 пМ, EC90=438 пМ), Ab-A1 Xmab (EC50=388 пМ, EC90=722 пМ), Ab-B1 Xmab (EC50=129 пМ, EC90=265 пМ), Ab-A1 Xmab $^{2+1}$ (EC50=6 пМ, EC90=11 пМ) и Ab-B1 Xmab $^{2+1}$ (EC50=19 пМ, EC90=43 пМ).

Пример 5.

В этом примере описан лизис линии опухолевых клеток человека C4-2B-luc Т-клетками человека, опосредованный XmAb и $XmAb^{2+1}$ к STEAP1.

Раковые клетки предстательной железы C4-2B-luc совместно культивировали с общей популяцией Т-клеток человека при соотношении клеток E:T 10:1 и при возрастающих концентрациях (фиг. 14A) Ab-A1 в формате XmAb, (фиг. 14B) Ab-A1 в формате $XmAb^{2+1}$ или (фиг. 14C) Ab-A2(N67Q) в формате $XmAb^{2+1}$ (с заменой N67Q) в течение 48 часов. Мониторинг лизиса клеток-мишеней осуществляли путем измерения активности люциферазы, и для каждой концентрации на график наносили значение специфической цитотоксичности в сравнении со значением для контрольных условий без XmAb. Как показано на фиг. 14A-14C, Ab-A1 Xmab, Ab-A1 $XmAb^{2+1}$ и Ab-A2(N67Q) $XmAb^{2+1}$ успешно опосредуют лизис клеток-мишеней.

Пример 6.

В этом примере продемонстрирована способность гетеродимерного антитела по настоящему изобретению обеспечивать возможность различения клеток, экспрессирующих STEAP1, и клетки, которые не экспрессируют STEAP.

STEAP1-положительные раковые клетки предстательной железы C4-2B-luc (●) и STEAP1-отрицательные клетки C4-2B-luc$^{STEAP1\ KO}$ (■) совместно культивировали с общей популяцией Т-клеток человека при соотношении клеток E:T 10:1 и при возрастающих концентрациях Ab-A1 $XmAb^{2+1}$ в течение 48 часов. Мониторинг лизиса клеток-мишеней осуществляли путем измерения активности люциферазы, и для каждой концентрации на график наносили значение специфической цитотоксичности в сравнении со значением для контрольных условий (без XmAb). Результаты показаны на фиг. 15 и в табл. 5 ниже. Ab-A1 $XmAb^{2+1}$ дозозависимым образом опосредовало лизис клеток-мишеней линии опухолевых клеток человека C4-2B-luc, но не клеток C4-2B-luc, модифицированных с обеспечением нокаута экспрессии STEAP1.

Таблица 5

EC50, определенная по Т-клеточно-зависимой клеточной цитотоксичности (TDCC), для C4-2B-luc и C4-2B-luc$^{STEAP1\ KO}$ при применении вариантов XmAb (Ab-A1 XmAb) и XmAb^{2+1} (Ab-A1 и Ab-A2(N67Q)) к STEAP1

Формат	**Средство, связывающие STEAP1**	**Вид, к которому относится связывающее средство**	**Линия клеток-мишеней**	**EC_{50}, определенная по TDCC (пМ)**
XmAb	Ab-A1	Гуманизированное	C4-2B-luc	324,9
XmAb^{2+1}	Ab-A1	Гуманизированное		6,3
XmAb^{2+1}	Ab-A2(N67Q)	Гуманизированное		5,4
XmAb^{2+1}	Ab-A1	Гуманизированное	C4-2B-luc^{STEAP1KO}	> 10000

Кроме того, клетки 293T, стабильно трансфицированные STEAP1 человека (фиг. 16A), или исходные клетки 293T (фиг. 16B) инкубировали с антителом изотипического контроля или мышиным моноклональным антителом Ab-A к STEAP1 (Ab-Am; без биспецифического формата) при концентрации 10 мкг/мл в течение 1 ч. при 4°C. Связанный с клеткой Ab-Am обнаруживали с помощью проточной цитометрии после инкубации с вторичным антителом к IgG мыши, конъюгированным с FITC (фиг. 16A). По значениям флуоресценции FITC, идентифицирующим STEAP1-зависимый сигнал, строили гистограммы (гистограммы со сплошной серой заливкой) и сравнивали с изотипическим контролем (гистограммы с белой заливкой). Как показано на фиг. 16A и 16B, Ab-Am обеспечивало обнаружение STEAP-1, экспрессируемого в обеих проанализированных популяциях клеток.

На фиг. 16C проиллюстрированы результаты совместного культивирования STEAP1-стабильных клеток 293T (●) и STEAP1-отрицательных исходных клеток 293T (■) с общей популяцией Т-клеток человека при соотношении клеток E:T 10:1 и при возрастающих концентрациях Ab-A2 (N67Q) XmAb^{2+1} в течение 48 часов. Мониторинг лизиса клеток-мишеней осуществляли путем измерения активности люциферазы, и для каждой концентрации на график наносили значение специфической цитотоксичности в сравнении со значением для контрольных условий без XmAb. Результаты показаны на фиг. 16A-16C и в табл. 6 ниже. Гетеродимерное антитело к STEAP1/CD3 селективно опосредовало лизис клеток, экспрессирующих STEAP1.

Таблица 6

EC50, определенная по Т-клеточно-зависимой клеточной цитотоксичности (TDCC), для клеток 293T, стабильно трансфицированных STEAP1 человека, и исходных клеток 293T при применении Ab-A2-N67Q XmAb^{2+1}

Формат молекулы	**Средство, связывающие STEAP1**	**Вид, к которому относится связывающее средство**	**Линия клеток-мишеней**	**EC_{50}, определенная по TDCC (пМ)**
XmAb^{2+1}	Ab-A2(N67Q)	Гуманизированное	293T/STEAP1	0,1
XmAb^{2+1}	Ab-A2(N67Q)	Гуманизированное	293T/исходные	> 10000

STEAP1-положительные раковые клетки предстательной железы C4-2B-luc также совместно культивировали с общей популяцией Т-клеток человека при соотношении клеток E:T 10:1 и при возрастающих концентрациях Ab-B1 Xmab (●) или Ab-B1 XmAb^{2+1}(■) в течение 48 часов. Как показано на фиг. 17A,

Ab-B1 XmAb и Ab-B1 $XmAb^{2+1}$ опосредуют лизис клеток-мишеней раковых клеток предстательной железы C4-2B-luc.

Раковые клетки предстательной железы C4-2B-luc совместно культивировали с общей популяцией Т-клеток человека при соотношении клеток E:T 10:1 и при возрастающих концентрациях $XmAb^{2+1}$ Ab-B1-G37A ($XmAb^{2+1}$ с заменой G37A) (■), $XmAb^{2+1}$ Ab-B1-S39A (формат $XmAb^{2+1}$ с заменой S39A) (▲) или $XmAb^{2+1}$ Ab-B1-G37A/S39A (формат $XmAb^{2+1}$ с заменами G37A и S39A) (▼) в течение 48 часов. Как показано на фиг. 17B, варианты Ab-B1 (т.е. Ab-B1-G37A, Ab-B1-S39A и Ab-B1-G37A/S39A) опосредуют лизис клеток-мишеней раковых клеток предстательной железы C4-2B-luc. См. также табл. 7 ниже. Аналогичным образом, STEAP1-отрицательные раковые клетки предстательной железы C4-2B $^{STEAP1\ KO}$ совместно культивировали с общей популяцией Т-клеток человека при соотношении клеток E:T 10:1 и при возрастающих концентрациях Ab-B1 $XmAb^{2+1}$ (●), Ab-B1-G37A(■), Ab-B1-S39A(▲) или Ab-B1-G37A/S39A (▼) в течение 48 часов. Мониторинг лизиса клеток-мишеней осуществляли путем измерения активности люциферазы, и для каждой концентрации на график наносили значение специфической цитотоксичности в сравнении со значением для контрольных условий без XmAb. Результаты показаны на фиг. 17C и в табл. 7 ниже. Гетеродимерное антитело к STEAP1/CD3 избирательно опосредовало лизис клеток, экспрессирующих STEAP1, и формат $XmAb^{2+1}$ по настоящему изобретению превосходил другие форматы по эффективности.

Таблица 7

EC50, определенная по Т-клеточно-зависимой клеточной цитотоксичности (TDCC), для C4-2B-luc и C4-2B-luc$^{STEAP1\ KO}$ при применении вариантов Ab-B1

Формат молекулы	**Средство, связывающие STEAP1**	**Линия клеток-мишеней**	**EC_{50}, определенная по TDCC (пМ)**
XmAb	Ab-B1	C4-2B-luc	326,2
$XmAb^{2+1}$	Ab-B1		111,9
$XmAb^{2+1}$	Ab-B1-G37A		42,5
$XmAb^{2+1}$	Ab-B1-S39A		34,9
$XmAb^{2+1}$	Ab-B1-G37A/S39A		184,8
$XmAb^{2+1}$	Ab-B1	C4-2B-luc$^{STEAP1\ KO}$	>10000
$XmAb^{2+1}$	Ab-B1-G37A		>10000
$XmAb^{2+1}$	Ab-B1-S39A		>10000
$XmAb^{2+1}$	Ab-B1-G37A/S39A		>10000

Пример 7.

В этом примере определяли равновесную константу связывания (KD) гетеродимерного антитела по настоящему изобретению, Ab-A2(N67Q) $XmAb^{2+1}$, в отношении CD3ε человека и яванского макака.

Аффинность Ab-A2(N67Q) $XmAb^{2+1}$ а отношении рекомбинантного CD3ε человека или яванского макака измеряли с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR - Pioneer FE). Рекомбинантный CD3ε-Fc человека и CD3ε-Fc яванского макака иммобилизовали на поверхности чипа CM5 с применением стандартной процедуры иммобилизации по аминогруппе при ~60 RU. Ab-A2(N67Q) $XmAb^{2+1}$ вводили путем инъекции в концентрациях 100, 33,3, 11,1 и 3,7 нМ. Скорости ассоциации и диссоциации при взаимодействии Ab-A2(N67Q) $XmAb^{2+1}$ с лигандами регистрировали в течение 120 секунд и 300 секунд, соответственно, как указано ниже в табл. 8. Значения равновесной константы диссоциации (K_D) получали в виде соотношения константы скорости диссоциации и константы скорости ассоциации (k_{off}/k_{on}).

Таблица 8

Скорости ассоциации и диссоциации при взаимодействии Ab-A2-N67Q XmAb $^{2+1}$ с CD3 человека и яванского макака, "a" обозначает данные, полученные с применением BIAcore®, а "b" обозначает данные, полученные с применением Octet

Формат молекулы	**Средство, связывающие STEAP1**	**Способ измерения**	**K_D в отношении CD3ε человека (нМ)**	**K_D в отношении CD3ε яванского макака (нМ)**
XmAb^{2+1}	Ab-A2(N67Q)	SPR	От 16,3 [a] до 27,6 [b]	От 15,1 [a] до 25,8 [b]

Пример 8.

В этом примере продемонстрировано, что гетеродимерное антитело по настоящему изобретению (Ab-A2(N67Q) XmAb^{2+1}) опосредует лизис клеток-мишеней, демонстрирующих диапазон значений плотности STEAP1 на клеточной поверхности.

Оценивали плотность STEAP-1 на клеточной поверхности различных линий клеток-мишеней (SNU-5, C4-2B, Sk-N-MC, LOX-IMVI, VCaP, IM-95, TYKNU, 22RV-1, HBSCM, HUCCT1, PC3, HCT116 и NCIH1869). См. табл. 9 ниже, в которой плотность STEAP1 (количество сайтов связывания антитела к STEAP I на клетку) указана в столбце 3 по измерениям с применением способа Dako Qifikit.

Таблица 9

Плотность STEAP1 на клеточной поверхности и EC50 и EC90, определенные по Т-клеточно-зависимой клеточной цитотоксичности (TDCC)

Линия клеток	**Ткань происхождения**	**STEAP1 (Qifikit)**	**EC50 (пМ)**	**EC90 (пМ)**
SNU5	Желудок	220612	6,2	13,7
C4-2B	Предстательная железа	150072	6,8	16,1
SK-N-MC	Нейробластома	19057	10,4	33,9
LOX-IMVI	Кожа	9765	36,6	112
VCaP	Предстательная железа	8148	722	9904
IM-95	Желудок	7824	344,7	1643
TYKNU	Яичник	6293	1716	>10000
22RV-1	Предстательная железа	5671	257,3	1604
HBSMC	Гладкая мышца	~5000	1517,5	>10000
HUCCT1	Желчные протоки	4295	>10000	>10000
PC3	Предстательная железа	~4000	>10000	>10000
HCT116	Толстый кишечник	3785	336	1796
NCIH1869	Легкое	1915	>10000	>10000

В отдельном исследовании оценивали плотность STEAP-1 на поверхности в линиях клеток OE33, EBC1 и A673. См. табл. 10 ниже, в которой плотность STEAP1 (количество сайтов связывания антитела к STEAP I на клетку) указана в столбце 3 по измерениям с применением способа Dako Qifikit.

Таблица 10

Линия клеток	**Ткань происхождения**	**STEAP1 (Qifikit)**	**EC50 (пМ)**	**EC90 (пМ)**
OE33	Пищевод	83303	145	3022
EBC1	Легкое	32718	162	2741
A673	Кость	25241	122	1587

Т-клетки от человека-донора инкубировали с линиями клеток-мишеней наряду с возрастающими концентрациями молекулы Ab-A2(N67Q) XmAb $^{2+1}$ в течение 48 часов при 37°C. Через 48 часов жизне-

способность клеток-мишеней измеряли с применением Steady-Glo (B) или CellTiter-Glo для измерения жизнеспособности клеток. Ab-A2(N67Q) $XmAb^{2+1}$ обеспечивало уничтожение всех линий клеток с различной EC90.

Ab-A2(N67Q) $XmAb^{2+1}$ способно обеспечивать уничтожение линий раковых клеток со значениями плотности STEAP1 в диапазоне от ~200000 рецепторов STEAP1 на клетку (линия клеток SNU5) до ~10000 рецепторов STEAP1 на клетку (линия клеток LOX-IMV). Эффективность Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ снижается, когда плотность рецепторов STEAP1 падает ниже 10000 на клетку. При этом Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ предпочтительно опосредует зависимое от Т-клеток уничтожение клеток при плотности STEAP1 на поверхности более 10000 (например, EC90 является по крайней мере в 10 раз меньше для клеток с плотностью STEAP1 на поверхности более 10000 по сравнению с клетками с плотностью STEAP1 на поверхности менее 10000).

Дифференциальное уничтожение раковых клеток оценивали с помощью других антител в формате $Xmab^{2+1}$ (Ab-B-G52A $XmAb^{2+1}$ и мышиное антитело Ab-Cm $XmAb^{2+1}$) по сравнению с Ab-A2-N67G $XmAb^{2+1}$. Для Ab-A2-N67G $XmAb^{2+1}$ было продемонстрировано дифференциальное уничтожение клеток с высоким и низким уровнем экспрессии STEAP1, тогда как Ab-B-G52A $XmAb^{2+1}$ не позволяло проводить различие между клетками с высоким и низким уровнем экспрессии STEAP1, вместо этого обеспечивая уничтожение всех клеток, экспрессирующих STEAP1. См. табл. 11. Ab-A2-N67G $XmAb^{2+1}$ сохраняет нормальные клетки, которые экспрессируют STEAP1 на более низких уровнях (т.е. ниже 10000 на клетку), такие как HSMBC (первичные гладкомышечные клетки бронхов человека).

Таблица 11

Ab-B1 $XmAb^{2+1}$ и Ab-Cm $XmAb^{2+1}$ обеспечивают уничтожение клеток с высоким и низким уровнем экспрессии STEAP1

Ab ($XmAb^{2+1}$)	**C4-2B-luc ~ 150000 рец./кл.**		**C4-2B K-O ~ 0 рец./кл.**		**LOX-IMVI ~ 10000 рец./кл.**		**IM95-luc ~ 8000 рец./кл.**	
	EC50 (пМ)	**EC90 (пМ)**	**EC50 (пМ)**	**EC90 (пМ)**	**EC50 (пМ)**	**EC90 (пМ)**	**EC50 (пМ)**	**EC90 (пМ)**
Ab-A2-N67G	5	19,4	>30000	>30000	47,1	445,2	344,7	1643
Ab-B1-G52A	48,9	205	>30000	>30000	22	45,6	13,2	37,7
Ab-Cm	23,3	64,3	>30000	>30000	27,6	464,7	6,6	21,1

Ab ($XmAb^{2+1}$)	**HCT116-luc ~ 4000 рец./кл.**		**HSMBC ~ 4000 рец./кл.**		**OVCARB ниже порога обнаружения FACS**		**NB-4-luc 0 рец./кл. - мРНК отсутствует**	
	EC50 (пМ)	**EC90 (пМ)**	**EC50 (пМ)**	**EC90 (пМ)**	**EC50 (пМ)**	**EC90 (пМ)**	**EC50 (пМ)**	**EC90 (пМ)**
Ab-A2-N67G	336	1796	2008	>6000	3623	12946	>30000	>30000
Ab-B1-G52A	43,6	207,4	27,5	108	80,5	609	>30000	>30000
Ab-Cm	11,6	75,8	48,5	109,2	18,7	207,9	>30000	>30000

Пример 9.

В этом примере продемонстрировано, что Т-клеточно-зависимая клеточная цитотоксичность усиливается при использовании комбинации гетеродимерного антитела к CD3/STEAP1, описанного в данном документе, с антителом к PD-1.

Получение линий клеток, сверхэкспрессирующих PD-L1. Клетки линии GP2-293 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллина/стрептомицина, 1% HEPES и 1% GlutaMAX. Клетки высевали при конфлюэнтности 75% в чашки диаметром 10 см и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение ночи. На следующее утро клетки трансфицировали. В пробирку A добавляли 45 мкл липофектамина 3000 и 500 мкл среды OptiMEM. В пробирку B добавляли 15 мкг плазмиды MSCV_GFP_PD-L1, 1,8 мкг плазмиды VSV-g, 30 мкл реагента P3000 и 500 мкл среды OptiMEM. Содержимое пробирок A и B смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Смесь добавляли по каплям в чашки с клетками линии GP2-293, которые инкубировали при 37°C,

5% CO_2 в течение ночи. На следующее утро среду удаляли и заменяли 10 мл свежей среды для культивирования клеток. В тот же день после полудня клетки-мишени высевали при конфлюэнтности 75% в 6-луночные планшеты и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение ночи. На следующее утро вирусосодержащие супернатанты от клеток линии GP2-293 собирали и центрифугировали (5 минут, 1200 об/мин.). Супернатанты собирали в новую пробирку и добавляли полибрен в соотношении 1:1000. Из планшетов, содержащих клетки-мишени удаляли среду и добавляли 2 мл вирусосодержащего супернатанта. В случае суспензии клеток клетки 1E6 центрифугировали при 1500 об/мин. в течение 5 минут, ресуспендировали в 500 мкл RPMI с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% пенициллина/стрептомицина и высевали в 6-луночные планшеты, в которые добавляли 2 мл вирусосодержащего супернатанта. Планшеты, содержащие клетки-мишени и вирусосодержащие супернатанты, центрифугировали в течение 1,5 часа при 1200×g при 32°C, а затем инкубировали при 37°C, 5% CO_2. Среду для культивирования клеток добавляли через 5 часов. Через четыре дня клетки анализировали в отношении экспрессии GFP и PD-L1 посредством проточной цитометрии с помощью системы от FACSymphony. PD-L1 обнаруживали с применением клона 29E.2A3 антитела, конъюгированного с PE. Клетки, <70% положительные в отношении экспрессии PD-L1, сортировали с помощью сортера BD Melody для отбора клеток, экспрессирующих высокие уровни PD-L1.

Анализ Т-клеточно-зависимой клеточной цитотоксичности (TDCC): Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ разбавляли средой для культивирования клеток (RPMI, 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки, 1X GlutaMAX, 1X пенициллина/стрептомицина), последовательно разбавляли (1:3, 22 в целом) и переносили в черные 384-луночные планшеты с прозрачным дном с применением роботизированной системы для перемещения жидкостей Bravo. Т-клетки человека общей популяции (n=4), предварительно активированные с помощью парамагнитных микрочастиц Dynabeads CD3/CD28 (1:1, 48 часов), отделяли от парамагнитных микрочастиц с применением магнита и разбавляли средой для культивирования клеток. (Аликвоту активированных Т-клеток от каждого донора оценивали в отношении экспрессии PD-1 с помощью проточной цитометрии. Клетки окрашивали как описано выше и данные собирали с помощью проточного цитометра от FACSymphony и анализировали с применением FlowJo v10.1.) В 384-луночные планшеты для анализа высевали активированные Т-клетки (2500 клеток/20 мкл; 4 ряда/донор) и затем клетки-мишени, сверхэкспрессирующие PD-L1 (2500 клеток/20 мкл; полный планшет), в таким образом, чтобы конечное соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (E:T) составляло 1:1. Антитело к PD-1 по настоящему изобретению, содержащее последовательности CDR под SEQ ID NO: 189-194 (конечная концентрация 10 мкг/мл в 5 мкл), добавляли в два ряда для каждого донора Т-клеток. Планшеты накрывали крышками MicroClime и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 24 часов. Для анализов с клетками-мишенями, экспрессирующими люциферазу, добавляли 30 мкл реагента Steady-Glo, Bright-Glo или One-Glo (Promega). Планшеты с адгезивными клетками-мишенями, не экспрессирующими люциферазу, промывали с помощью PBS для удаления Т-клеток с применением устройства для промывания планшетов EL406 и добавляли 25 мкл реагента Cell Titer Glo. Планшеты инкубировали с реагентом в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре. Люминесценцию обнаруживали с применением планшет-ридера BioTek Neo. Специфическую цитотоксичность рассчитывали относительно клеток-мишеней, которые инкубировали с Т-клетками без Ab-A2 $XmAb^{2+1}$. Программное обеспечение GraphPad Prism применяли для построения кривых зависимости от дозы и расчета значений EC50 с помощью аппроксимации по четырехпараметрической кривой с изменяемым углом наклона.

Результаты анализа TDCC показаны на фиг. 20A и 20B. Для комбинации Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ и антитела к PD-1 было продемонстрировано повышение уровня цитотоксичности и снижение EC50 по сравнению с одним только Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$.

Пример 10.

В этом примере продемонстрирована способность гетеродимерного антитела по настоящему изобретению (например, Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$) обеспечивать уменьшение объема опухоли при саркоме Юинга in vivo.

Самкам мышей NOD/SCID с ослабленным иммунитетом, получившим сублетальную дозу облучения, трансплантировали в количестве 5×10^6 клеток опухолевые клетки SK-N-MC, экспрессирующие STEAP1, в день 1. В день 8 вводили путем внутрибрюшинной инъекции 2×10^7 CD3+ Т-клеток человека. Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ или контрольную среду-носитель вводили путем внутривенной болюсной инъекции в дозе 0,01, 0,1 или 1 мг/кг в дни 12, 19 и 26. Данные об изменении объема опухоли с течением времени представлены графически (фиг. 22).

Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ вызывало регрессию исходной опухоли с относительными объемами опухоли (RTV), составляющими <1 во всех дозовых группах между днями 15 и 22, в то время как RTV у животных, получавших среду-носитель, непрерывно увеличивался до конца исследования. Опухоли у животных, получавших наиболее низкую дозу Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ (0,01 мг/кг), начали расти после дня 22, в то время как средний RTV для мышей, получавших более высокие дозы Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ (0,1 и 1 мг/кг), составлял <1 до дней 28 и 25 соответственно (табл. 12).

Таблица 12

Относительные объемы опухоли по сравнению с днем 11

Дозовая группа	Параметр	День 11	День 13	День 15	День 18	День 20	День 22	День 25	День 28
2. Среда-носитель	Среднее значение	1,00	1,19	1,36	1,88	2,40	2,93	3,89	5,29
	SEM	0,00	0,05	0,05	0,13	0,20	0,30	0,39	0,45
1. Среда-носитель без Т-клеток	Среднее значение	1,00	1,07	1,46	1,88	2,87	3,48	4,17	5,02
	SEM	0,00	0,02	0,14	0,17	0,44	0,32	0,39	0,52
3. Ab-A2 $XmAb^{2+1}$ (1,0 мг/кг)	Среднее значение	1,00	1,09	0,91	0,51	0,47	0,37	0,41	0,61
	SEM	0,00	0,05	0,07	0,13	0,17	0,19	0,27	0,46
4. Ab-A2 $XmAb^{2+1}$ (0,1 мг/кг)	Среднее значение	1,00	1,03	0,79	0,49	0,42	0,27	0,51	1,13
	SEM	0,00	0,07	0,06	0,05	0,06	0,07	0,22	0,39
5. Ab-A2 $XmAb^{2+1}$ (0,01 мг/кг)	Среднее значение	1,00	1,18	0,86	0,75	0,63	0,93	2,46	4,24
	SEM	0,00	0,09	0,08	0,08	0,08	0,15	0,35	0,54

Между днями 15 и 22 p-значения <0,001 были достигнуты при всех уровнях доз Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$, и после дня 22 p-значения <0,001 были достигнуты для сравнения Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ в дозах 0,1 и 1 мг/кг и контрольной группы 2, получавшей среду-носитель (фиг. 23). В день 28 опухоли мышей, получавших среду-носитель (группа 2), имели в среднем в 5,29 раза большие объемы по сравнению с их начальными объемами до начала лечения, в то время как средние значения RTV группы для групп, получавших Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$, составили 0,61 (группа 3), 1,13 (группа 4) и 4,24 (группа 5) (табл. 1). В конце прижизненной фазы в день 28 9/10 животных в группе с наивысшей дозой Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$ (группа 3) считались свободными от опухоли с уровнем подавления роста опухоли (TGI) 97% (табл. 13).

Таблица 13

Подавление роста опухоли (объемы опухоли)

Дозовая группа	Параметр	День 11	День 13	День 15	День 18	День 20	День 22	День 25	День 28
2. Среда-носитель	Медиана	196,61	225,01	253,27	348,93	468,93	590,08	837,07	955,14
	T/C (%)	100	100	100	100	100	100	100	100
1. Среда-носитель без Т-клеток	Медиана	203,63	229,86	286,81	323,09	563,09	598,48	673,42	885,10
	T/C (%)	104	102	113	93	120	101	80	93
	TGI (%)	-4	-2	-13	7	-20	-1	20	7
3. Ab-A2 $XmAb^{2+1}$ (1,0 мг/кг)	Медиана	197,87	206,94	166,09	78,41	59,90	33,53	27,07	29,77
	T/C (%)	101	92	66	22	13	6	3	3
	TGI (%)	-1	8	34	78	87	94	97	97
4. Ab-A2 $XmAb^{2+1}$ (0,1 мг/кг)	Медиана	197,59	198,67	144,59	88,07	76,73	41,56	55,86	106,87
	T/C (%)	100	88	57	25	16	7	7	11
	TGI (%)	0	12	43	75	84	93	93	89
5. Ab-A2 $XmAb^{2+1}$ (0,01 мг/кг)	Медиана	200,97	217,31	150,74	121,75	115,60	202,07	431,89	867,08
	T/C (%)	102	97	60	35	25	34	52	91
	TGI (%)	-2	3	40	65	75	66	48	9

Таким образом, в клинически значимой модели ксенотрансплантата Ab-A2 (N67Q) XmAb $^{2+1}$ продемонстрировало мощную противоопухолевую активность.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий белок, который связывает STEAP1 под SEQ ID NO: 2 и содержит:

CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности vhCDR1 SEQ ID NO: 14, vhCDR2 SEQ ID NO: 15 или vhCDR2 SEQ ID NO: 21 и vhCDR3 SEQ ID NO: 16; и

CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности vlCDR1 SEQ ID NO: 11, vlCDR2 SEQ ID NO: 12 и vlCDR3 SEQ ID NO: 13.

2. Антигенсвязывающий белок по п.1, содержащий:

vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 14,
vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 15,
vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 16,
vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 11,
vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 12, и
vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 13.

3. Антигенсвязывающий белок по п.1, содержащий

vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 14,
vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 21,
vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 16,
vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 11,
vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 12, и
vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 13.

4. Антигенсвязывающий белок по п.1, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 182 или SEQ ID NO: 184, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 183.

5. Антигенсвязывающий белок по п.1, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 184, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 183.

6. Антигенсвязывающий белок по п.1, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 182, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 183.

7. Антигенсвязывающий белок по любому из пп.1-6, где антигенсвязывающий белок представляет собой антитело.

8. Антигенсвязывающий белок по п.7, который представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело.

9. Антигенсвязывающий белок по любому из пп.1-8, где антигенсвязывающий белок представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела.

10. Антигенсвязывающий белок по любому из пп.1-6, содержащий одноцепочечное антитело, диатело, триатело, тетратело или доменное антитело.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок по любому из пп.1-10 и физиологически приемлемый носитель.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, дополнительно содержащая антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, который содержит vhCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 189, vhCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 190, vhCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 191, vlCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 192, vhCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 193, и vlCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 194.

13. Способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по п.11 или 12.

14. Способ по п.13, дополнительно включающий введение субъекту антигенсвязывающего белка, связывающего PD-1.

15. Применение антигенсвязывающего белка по любому из пп.1-10 в получении лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом.

16. Применение по п.15, где лекарственное средство предназначено для введения эффективного количества антигенсвязывающего белка, связывающего STEAP1, в сочетании с эффективным количеством антигенсвязывающего белка, связывающего PD-1.

17. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи антигенсвязывающего белка по любому из пп.1-6.

18. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.17.

19. Композиция для получения антигенсвязывающего белка, связывающего STEAP1, содержащая полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный домен легкой цепи антигенсвязывающего белка по любому из пп.1-6, и полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи антигенсвязывающего белка по любому из пп.1-6.

20. Способ получения антигенсвязывающего белка, включающий приведение клетки-хозяина в контакт с полинуклеотидом по п.17 или композицией по п.19 в условиях, которые обеспечивают возможность экспрессии вариабельного домена легкой цепи и вариабельного домена тяжелой цепи.

21. Биспецифический антигенсвязывающий белок, содержащий антигенсвязывающий белок по любому из пп.1-6.

22. Биспецифический антигенсвязывающий белок по п.21, который связывает STEAP1 и CD3.

23. Биспецифический антигенсвязывающий белок по п.22, содержащий CD3-связывающий домен, который содержит последовательности CDR под SEQ ID NO: 170-172 и 174-176.

24. Гетеродимерное антитело, связывающее STEAP1 и CD3, содержащее:

a) первый мономер, содержащий первую тяжелую цепь, содержащую:

1) первый вариабельный домен тяжелой цепи;

2) первую константную область тяжелой цепи, содержащую первый CH1-домен и первый Fc-домен;

3) scFv, который связывает CD3 человека и содержит вариабельный домен легкой цепи scFv, линкер scFv и вариабельный домен тяжелой цепи scFv; где указанный scFv ковалентно присоединен между C-концом указанного CH1-домена и N-концом указанного первого Fc-домена с помощью линкера (линкеров) для доменов;

b) второй мономер, содержащий вторую тяжелую цепь, содержащую второй вариабельный домен тяжелой цепи и вторую константную область тяжелой цепи, содержащую второй Fc-домен; и

c) общую легкую цепь, содержащую вариабельный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи;

где указанный первый вариабельный домен тяжелой цепи и указанный вариабельный домен легкой цепи связывают STEAP1 человека, указанный второй вариабельный домен тяжелой цепи и указанный вариабельный домен легкой цепи связывают STEAP1 человека, и где

первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности vhCDR1 SEQ ID NO: 14, vhCDR2 SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 21 и vhCDR3 SEQ ID NO: 16, и вариабельный домен легкой цепи содержит CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности vlCDR1 SEQ ID NO: 11, vlCDR2 SEQ ID NO: 12 и V1CDR3 SEQ ID NO: 13.

25. Гетеродимерное антитело по п.24, где первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 182 или 184, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 183.

26. Гетеродимерное антитело по п.24 или 25, где первый мономер содержит аминокислотные замены E233P, L235V, G236A, S267K, R292C, N297G, V302C, E357Q и S364K; второй мономер содержит аминокислотные замены N208D, E233P, L235V, G236A, S267K, R292C, Q295E, N297G, V302C, L368D, K370S, N384D, Q418E и N421D; и оба мономера содержат делецию в положении 234.

27. Гетеродимерное антитело по любому из пп.24-26, где указанный scFv содержит:

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности vhCDR1 SEQ ID NO: 170, vhCDR2 SEQ ID NO: 171 и vhCDR3 SEQ ID NO: 172, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности vlCDR1 SEQ ID NO: 174, vlCDR2 SEQ ID NO: 175 и vlCDR3 SEQ ID NO: 176.

28. Гетеродимерное антитело по п.27, где scFv содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 169, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 173.

29. Гетеродимерное антитело по любому из пп.24-28, где указанный scFv содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи SEQ ID NO: 169 и SEQ ID NO: 173.

30. Гетеродимерное антитело по любому из пп.24-29, где указанный scFv имеет заряженный линкер scFv.

31. Гетеродимерное антитело по п.30, где заряженный линкер scFv имеет положительный заряд от 3 до 8 и выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 143-153.

32. Гетеродимерное антитело по п.30, где линкер scFv содержит SEQ ID NO: 152.

33. Гетеродимерное антитело по любому из пп.24-29, где указанный scFv содержит последовательность SEQ ID NO: 44.

34. Гетеродимерное антитело по любому из пп.24-33, где первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат следующие последовательности CDR: vhCDR1,

содержащую SEQ ID NO: 14, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 15, vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 16, и где вариабельный домен легкой цепи содержит следующие последовательности CDR: vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 11, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 12, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 13.

35. Гетеродимерное антитело по любому из пп.24-33, где первый вариабельный тяжелый домен и второй вариабельный тяжелый домен содержат последовательности CDR: vhCDR1, содержащую SEQ ID NO: 14, vhCDR2, содержащую SEQ ID NO: 21, vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 21, vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 21, vhCDR3, содержащую SEQ ID NO: 16, и где вариабельный легкий домен содержит последовательности CDR vlCDR1, содержащую SEQ ID NO: 11, vlCDR2, содержащую SEQ ID NO: 12, и vlCDR3, содержащую SEQ ID NO: 13.

36. Гетеродимерное антитело по любому из пп.24-33, где первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 184, и вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 183.

37. Гетеродимерное антитело по любому из пп. 24-33, где первый вариабельный домен тяжелой цепи и второй вариабельный домен тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 182, и вариабельный домен легкой цепи содержит SEQ ID NO: 183.

38. Гетеродимерное антитело по п.24, содержащее аминокислотную замену N67Q и/или замену в одном или более из положений 292, 297 или 302.

39. Гетеродимерное антитело по п.24, где первый мономер содержит последовательность SEQ ID NO: 19, второй мономер содержит последовательность SEQ ID NO: 18, и общая легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 17.

40. Гетеродимерное антитело по п.24, где первый мономер содержит последовательность SEQ ID NO: 202, второй мономер содержит последовательность SEQ ID NO: 201, и общая легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 200.

41. Гетеродимерное антитело по п.24, где первый мономер содержит последовательность SEQ ID NO: 207, второй мономер содержит последовательность SEQ ID NO: 203, и общая легкая цепь содержит последовательность SEQ ID NO: 200.

42. Композиция на основе нуклеиновой кислоты, кодирующая гетеродимерное антитело, содержащая:

a) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый мономер по любому из пп.24-41;

b) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй мономер по любому из пп.24-41, и

c) третью нуклеиновую кислоту, кодирующую общую легкую цепь по любому из пп.24-41.

43. Композиция на основе нуклеиновой кислоты, кодирующая гетеродимерное антитело, содержащая:

a) первый вектор экспрессии, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый мономер по любому из пп.24-41;

b) второй вектор экспрессии, содержащий вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй мономер по любому из пп.24-41, и

c) третий вектор экспрессии, содержащий третью нуклеиновую кислоту, кодирующую общую легкую цепь по любому из пп.24-41.

44. Клетка-хозяин, содержащая композицию на основе нуклеиновой кислоты по п.42 или 43.

45. Фармацевтическая композиция, содержащая гетеродимерное антитело по любому из пп.24-41.

46. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту гетеродимерного антитела по любому из пп.24-41 или фармацевтической композиции по п.45.

47. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту гетеродимерного антитела по любому из пп.24-41 или фармацевтической композиции по п.45.

48. Способ по п.46 или 47, дополнительно включающий введение субъекту антигенсвязывающего белка, связывающего PD-1.

49. Применение гетеродимерного антитела по любому из пп.24-41 в получении лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом.

50. Применение по п.49, где лекарственное средство предназначено для введения эффективного количества гетеродимерного антитела в сочетании с эффективным количеством антигенсвязывающего белка, связывающего PD-1.

51. Способ по п.14 или 48, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD1, содержит vhCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 189, vhCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 190, vhCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 191, vlCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 192, vhCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 193, и vlCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 194.

52. Способ по п.51, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD1, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 195, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 196.

53. Способ по п.52, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD1, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196.

54. Способ по любому из пп.51-53, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела.

55. Способ по любому из пп.51-53, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, представляет собой антитело.

56. Способ по любому из пп.51-53, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело.

57. Способ по любому из пп.51-56, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD1, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198.

58. Способ по любому из пп.51-56, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD1, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209.

59. Способ по любому из пп.14 или 48, где антигенсвязывающий белок анти-PD-1 представляет собой пембролизумаб.

60. Способ по любому из пп.14, 48 или 51-59, где антигенсвязывающий агент анти-PD-l вводят перед антигенсвязывающим белком, который связывает STEAP1, или гетеродимерным антителом.

61. Способ по любому из пп.14, 48 или 51-59, где антигенсвязывающий агент анти-PD-1 вводят одновременно с антигенсвязывающим белком, который связывает STEAP1, или гетеродимерным антителом.

62. Способ по любому из пп.14, 48 или 51-59, где антигенсвязывающий агент против PD-1 вводят после антигенсвязывающего белка, который связывает STEAP1, или гетеродимерного антитела.

63. Способ по п.13 или 47, где эффективное количество гетеродимерного антитела вводят в сочетании с эффективным количеством абиратерона ацетата или энзалутамида.

64. Способ по любому из пп.13, 14, 47, 48 или 51-63, где антигенсвязывающий белок, который связывает STEAP1, или гетеродимерное антитело вводят подкожно.

65. Способ по любому из пп.47, 48 или 51-64, где рак представляет собой рак предстательной железы.

66. Способ по любому из пп.47, 48 или 51-64, где рак представляет собой саркому Юинга.

67. Антигенсвязывающий белок по любому из пп.1-6, присоединенный к детектируемой метке.

68. Антигенсвязывающий белок по п.67, где метка является радиоактивной.

69. Антигенсвязывающий белок по п.67 или 68, где антигенсвязывающий белок представляет собой Fab-фрагмент.

70. Антигенсвязывающий белок по п.67 или 68, где антигенсвязывающий белок представляет собой фрагмент $F(ab')_2$.

71. Способ детекции STEAP1 у субъекта, включающий введение субъекту антигенсвязывающего белка по любому из пп.67-70 и детекцию метки.

72. Применение антигенсвязывающего белка по любому из пп.67-70 для детекции STEAP1 у субъекта, причем детекция включает детекцию метки.

73. Способ по п.71, в котором метку детектируют с помощью позитронно-эмиссионной томографии.

74. Применение по п.16 или 50, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD1, содержит vhCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 189, vhCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 190, vhCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 191, vlCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 192, vhCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 193, и vlCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 194.

75. Применение по п.74, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD1, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 195, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 196.

76. Применение по п.75, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD1, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196.

77. Применение по любому из пп.74-76, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела.

78. Применение по любому из пп.74-76, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, представляет собой антитело.

79. Применение по любому из пп.74-76, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело.

80. Применение по любому из пп.74-79, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD1, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198.

81. Применение по любому из пп.74-79, где антигенсвязывающий белок, связывающий PD1, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209.

82. Применение по п.16 или 50, где антигенсвязывающий белок анти-PD-1 представляет собой пембролизумаб.

83. Применение по любому из пп.16, 50 или 74-82, где антигенсвязывающий агент анти-PD-l вводят перед антигенсвязывающим белком, который связывает STEAP1, или гетеродимерным антителом.

84. Применение по любому из пп.16, 50 или 74-82, где антигенсвязывающий агент анти-PD-1 вводят одновременно с антигенсвязывающим белком, который связывает STEAP1, или гетеродимерным антителом.

85. Применение по любому из пп.16, 50 или 74-82, где антигенсвязывающий агент против PD-1 вводят после антигенсвязывающего белка, который связывает STEAP1, или гетеродимерного антитела.

86. Применение по любому из пп.15 или 49, где эффективное количество гетеродимерного антитела вводят в сочетании с эффективным количеством абиратерона ацетата или энзалутамида.

87. Применение по любому из пп.15, 16, 49, 50 или 74-86, где антигенсвязывающий белок, который связывает STEAP1, или гетеродимерное антитело вводят подкожно.

88. Применение по любому из пп.49, 50 или 74-87, где рак представляет собой рак предстательной железы.

89. Применение по любому из пп.49, 50 или 74-87, где рак представляет собой саркому Юинга.

Фиг. 1

MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDE
DDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGG
LLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI (**SEQ ID NO: 1**)

Фиг. 2

MESRKDITNQEELWKMKPRRNLEEDDYLHKDTGETSMLKRPVLLHLHQTAHADEFDCPSE
LQHTQELFPQWHLPIKIAAIIASLTFLYTLLREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPM
VSITLLALVYLPGVIAAIVQLHNGTKYKKFPHWLDKWMLTRKQFGLLSFFFAVLHAIYSL
SYPMRRSYRYKLLNWAYQQVQQNKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPS
VSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLLGTIHALIFAWNKWIDIKQFVWYTPPTFMIAVFLPIV
VLIFKSILFLPCLRKKILKIRHGWEDVTKINKTEICSQL (**SEQ ID NO: 2**)

Фиг. 3

Мономер 1	Мономер 2
F405A	T394F
S364D	Y349K
S364E	L368K
S364E	Y349K
S364F	K370G
S364H	Y349K
S364H	Y349T
S364Y	K370G
T411K	K370E
V397S/F405A	T394F
K370R/T411K	K370E/T411E
L351E/S364D	Y349K/L351K
L351E/S364E	Y349K/L351K
L351E/T366D	L351K/T366K
P395T/V397S/F405A	T394F
S364D/K370G	S364Y/K370R
S364D/T394F	Y349K/F405A
S364E/F405A	Y349K/T394F
S364E/F405S	Y349K/T394Y
S364E/T411E	Y349K/D401K
S364H/D401K	Y349T/T411E
S364H/F405A	Y349T/T394F
S364H/T394F	Y349T/F405A
Y349C/S364E	Y349K/S354C
L351E/S364D/F405A	Y349K/L351K/T394F
L351K/S364H/D401K	Y349T/L351E/T411E
S364E/T411E/F405A	Y349K/T394F/D401K
S364H/D401K/F405A	Y349T/T394F/T411E
S364H/F405A/T411E	Y349T/T394F/D401K

Фиг. 4A

Мономер 1	Мономер 2
K370E/T411D	T411K
L368E/K409E	L368K
Y349T/T394F/S354C	S364H/F405A/Y349C
T411E	D401K
T411E	D401R/T411R
Q347E/K360E	Q347R
L368E	S364K
L368E/K370S	S364K
L368E/K370T	S364K
L368E/D401R	S364K
L368E/D401N	S364K
L368E	E357S/S364K
L368E	S364K/K409E
L368E	S364K/K409V
L368D	S364K
L368D/K370S	S364K
L368D/K370S	S364K/E357L
L368D/K370S	S364K/E357Q
T411E/K360E/Q362E	D401K
K370S	S364K
L368E/K370S	S364K/E357Q
K370S	S364K/E357Q
T411E/K360D	D401K
T411E/K360E	D401K
T411E/Q362E	D401K
T411E/N390D	D401K
T411E	D401K/Q347K
T411E	D401K/Q347R
T411E/K360D/Q362E	D401K

Фиг. 4B

Мономер 1	Мономер 2
T411E/K360E/N390D	D401K
T411E/Q362E/N390D	D401K
T411E/Q347R	D401K/K360D
T411E/Q347R	D401K/K360E
T411E/K360	D401K/Q347K
T411E/K360D	D401K/Q347R
T411E/K360E	D401K/Q347K
T411E/K360E	D401K/Q347R
T411E/S364K	D401K/K370S
T411E/K370S	D401K/S364K
Q347E	E357Q
Q347E	E357Q/Q362K
K360D/Q362E	Q347R
K360D/Q362E	D401K
K360D/Q362E	Q347R/D401K
K360E/Q362E	Q347R
K360E/Q362E	D401K
K360E/Q362E	Q347R/D401K
Q362E/N390D	D401K
Q347E/K360D	D401N
K360D	Q347R/N390K
K360D	N390K/D401N
K360E	Y349H
K370S/Q347E	S364K
K370S/E357L	S364K
K370S/E357Q	S364K
K370S/Q347E/E357L	S364K
K370S/Q347E/E357Q	S364K

Фиг. 4C

Мономер 1	Мономер 2
L368D/K370S/Q347E	S364K
L368D/K370S/E357L	S364K
L368D/K370S/E357Q	S364K
L368D/K370S/Q347E/E357L	S364K
L368D/K370S/Q347E/E357Q	S364K
L368E/K370S/Q347E	S364K
L368E/K370S/E357L	S364K
L368E/K370S/E357Q	S364K
L368E/K370S/Q347E/E357L	S364K
L368E/K370S/Q347E/E357Q	S364K
L368D/K370T/Q347E	S364K
L368D/K370T/E357L	S364K
L368D/K370T/E357Q	S364K
L368D/K370T/Q347E/E357L	S364K
L368D/K370T/Q347E/E357Q	S364K
L368E/K370T/Q347E	S364K
L368E/K370T/E357L	S364K
L368E/K370T/E357Q	S364K
L368E/K370T/Q347E/E357L	S364K
L368E/K370T/Q347E/E357Q	S364K
T411E/Q362E	D401K/T411K
T411E/N390D	D401K/T411K
T411E/Q362E	D401R/T411R
T411E/N390D	D401R/T411R
Y407T	T366Y
F405A	T394W
T366Y/F405A	T394W/Y407T
Y407A	T366W
T366S/L368A/Y407V	T366W
T366S/L368A/Y407V/Y349C	T366W/S354C

Фиг. 4D

Мономер 1	Мономер 2
K392D/K409D	E356K/D399K
K370D/K392D/K409D	E356K/E357K/D399K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/N384S/K392N/V397M/Q419E/K447_	Q196K/I199T/N276K
N384S/K392N/V397M/Q419E	N276K
D221E/P228E/L368E	D221R/P228R/K409R
C220E/P228E/L368E	C220R/E224R/P228R/K409R
F405L	K409R
T366I/K392M/T394W	F405A/Y407V
T366V/K409F	L351Y/Y407A
T366A/K392E/K409F/T411E	D399R/S400R/Y407A
L351K	L351E
I199T/N203D/K247Q/R355Q/Q419E/K447_	Q196K/I199T/P217R/P228R/N276K
I199T/N203D/K247Q/R355Q/Q419E/K447_	Q196K/I199T/N276K
I199T N203D K274Q R355Q N384S K392N V397M Q419E DEL447	
N208D Q295E N384D Q418E N421D	
N208D Q295E Q418E N421D	
Q196K I199T P217R P228R N276K	
Q196K I199T N276K	
E269Q E272Q E283Q E357Q	
E269Q E272Q E283Q	
E269Q E272Q	
E269Q E283Q	
E272Q E283Q	
E269Q	

Фиг. 4E

pI-варианты

Константная область	**Замены**
pI_ISO(-)	I199T N203D K274Q R355Q N384S K392N V397M Q419E DEL447
pI_(-)_изостерический_A	N208D Q295E N384D Q418E N421D
pI_(-)_ изостерический_B	N208D Q295E Q418E N421D
pI_ISO(+RR)	Q196K I199T P217R P228R N276K
pI_ISO(+)	Q196K I199T N276K
pI_(+)_ изостерический_A	E269Q E272Q E283Q E357Q
pI_(+)_ изостерический_B	E269Q E272Q E283Q
pI_(+)_изостерический_ E269Q/E272Q	E269Q E272Q
pI_(+)_изостерический_ E269Q/E283Q	E269Q E283Q
pI_(+)_изостерический_ E272Q/E283Q	E272Q E283Q
pI_(+)_изостерический_ E269Q	E269Q

Фиг. 5

Варианты с устранением связывания

Вариант	Вариант(-ы), продолж.
G236R	P329K
S239G	A330L
S239K	A330S/P331S
S239Q	I332K
S239R	I332R
V266D	V266D/A327Q
S267K	V266D/P329K
S267R	S267R/A327Q
H268K	S267R/P329K
E269R	G236R/L328R
299R	E233P/L234V/L235A/G236del/S239K
299K	E233P/L234V/L235A/G236del/S267K
K322A	E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G
A327G	E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G
A327L	E233P/L234V/L235A/G236del
A327N	S239K/S267K
A327Q	267K/P329K
L328E	
L328R	
P329A	
P329H	

Фиг. 6

scFv-мономер (+)	**Fab-мономер (-)**
Асимметричные варианты гетеродимеризации S364K/E357Q	**Асимметричные варианты гетеродимеризации L368D/K370S**
Необязательный заряженный линкер scFv, включая без ограничения $(GKPGS)_4$	**Изостерические pI-замены** N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D
FcKO E233P/L234V/L235A/G236del/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236del/S267K
±428L/434S для FcRn	**±428L/434S для FcRn**
scFv средства, связывающего CD3	**Последовательности Fv для средства, связывающего STEAP1**

scFv-мономер	**Fab-мономер**
Асимметричные варианты гетеродимеризации S364K/E357Q	**Асимметричные варианты гетеродимеризации L368D/K370S**
Необязательный заряженный линкер scFv, включая без ограничения $(GKPGS)_4$	**pI-замены** I199T N203D K274Q R355Q Q419E K447del
FcKO E233P/L234V/L235A/G236del/S267K	FcKO E233P/L234V/L235A/G236del/S267K
±428L/434S для FcRn	**±428L/434S для FcRn**
scFv средства, связывающего CD3	**scFv средства, связывающего STEAP1**

Фиг. 7

Положительно заряженные линкеры scFv

Название	Последовательность	Длина	Заряд	SEQ ID NO:
Gly-Ser 15	GGGGSGGGGSGGGGS	15	0	143
Линкер Whitlow	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	18	+1	144
6paxA_1 (+A)	IRPRAIGGSKPRVA	14	+4	145
+B	GKGGSGKGGSGKGGS	15	+3	146
+C	GGKGSGGKGSGGKGS	15	+3	147
+D	GGGKSGGGKSGGGKS	15	+3	148
+E	GKGKSGKGKSGKGKS	15	+6	149
+F	GGGKSGGKGSGKGGS	15	+3	150
+G	GKPGSGKPGSGKPGS	15	+3	151
+H	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	20	+4	152
+I	GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS	20	+8	153

Отрицательно заряженные линкеры scFv

Название	Последовательность	Длина	Заряд	SEQ ID NO:
Gly-Ser 15	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	20	0	154
3hsc_2 (-A)	STAGDTHLGGEDFD	14	-4	155
-B	GEGGSGEGGSGEGGS	15	-3	156
-C	GGEGSGGEGSGGEGS	15	-3	157
-D	GGGESGGGESGGGES	15	-3	158
-E	GEGESGEGESGEGES	15	-6	159
-F	GGGESGGEGSGEGGS	15	-3	160
-G	GEGESGEGESGEGESGEGES	20	-8	161

Фиг. 8A

Линкеры scFv

GGGGSGGGGSGGGGS	(SEQ ID NO: 162)
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	(SEQ ID NO: 163)
GSTSGSGKPGSGEGSTKG	(SEQ ID NO: 164)
PRGASKSGSASQTGSAPGS	(SEQ ID NO: 165)
GTAAAGAGAAGGAAAGAAG	(SEQ ID NO: 166)
GTSGSSGSGSGGSGSGGGG	(SEQ ID NO: 167)
GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	(SEQ IS NO: 168)

Подходящие линкеры для доменов

KTHTCPPCP("неполный шарнир")	SEQ ID NO:210
EPKSSDKTHTCPPCP ("вариант полного шарнира с C220S")	SEQ ID NO:211
GGGGSGGGGSKTHTCPPCP ("гибкий неполный шарнир")	SEQ ID NO:212
GKPGSGKPGSKTHTCPPCP ("заряжен. неполный шарнир 1")	SEQ ID NO:213
GKPGSKTHTCPPCP ("заряженный неполный шарнир 2")	SEQ ID NO:214

Фиг. 8B

XENP	Гетеродимерный асимметричный вариант, цепь 1	Гетеродимерный асимметричный вариант, цепь 2	Выход гетеро-димера (%)	Tm CH3 (°C)
12757	Отсутствует	Отсутствует	52,7	83,1
12758	L368D/K370S	S364K	94,4	76,6
12759	L368D/K370S	S364K/E357L	90,2	77,2
12760	L368D/K370S	S364K/E357Q	95,2	77,5
12761	T411E/K360E/Q362E	D401K	85,6	80,6
12496	L368E/K370S	S364K	91,5	n.d.
12511	K370S	S364K	59,9	n.d.
12840	L368E/K370S	S364K/E357Q	59,5	n.d.
12841	K370S	S364K/E357Q	90,4	n.d.
12894	L368E/K370S	S364K	41,0	n.d.
12895	K370S	S364K	49,3	n.d.
12896	L368E/K370S	S364K/E357Q	73,9	n.d.
12901	K370S	S364K/E357Q	87,9	n.d.

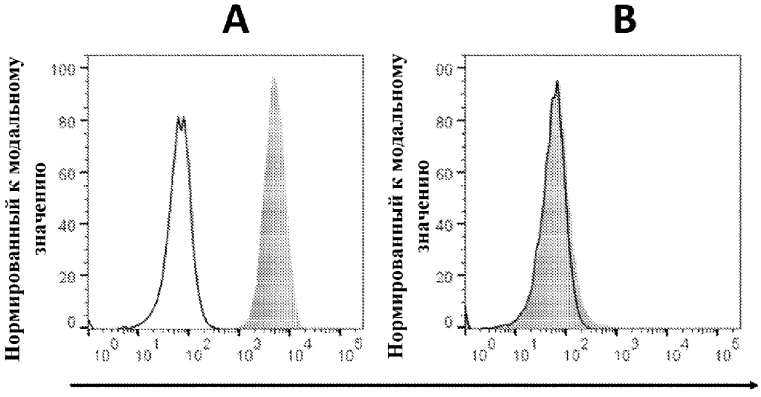
Фиг. 9

ID VH	ID VL	Замены в VH	Замены в VL
H1	L1.4		
H1.307	L1.47	N30S/N100D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.337	L1.47	N30S/N100D/A101D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.317	L1.47	N30S/N35S/N100D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.327	L1.47	N30S/Y52CA/N100D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.88	L1.47	N30S/N100P	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.89	L1.47	N30S/N100D/S100AE	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.90	L1.47	N30S/N100D/S100AP	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.91	L1.47	N30S/Y52CA/N100D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.92	L1.47	N30S/Y58A/N100D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.93	L1.47	N30S/N100E	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.94	L1.47	N30S/N100Q	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.96	L1.47	N30S/N100D/S100AN	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.97	L1.47	N30S/N100D/S100AQ	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.98	L1.47	N30S/Y52CA/N100D/A101D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.99	L1.47	N30S/Y58A/N100D/A101D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.100	L1.47	N30S/N100A/A101D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.101	L1.47	N30S/N100Q/A101D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.102	L1.47	N30S/N100D/S100AE/A101D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.103	L1.47	N30S/N100D/S100AN/A101D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.104	L1.47	N30S/N100D/S100AP/A101D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.105	L1.47	N30S/N100D/S100AQ/A101D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H

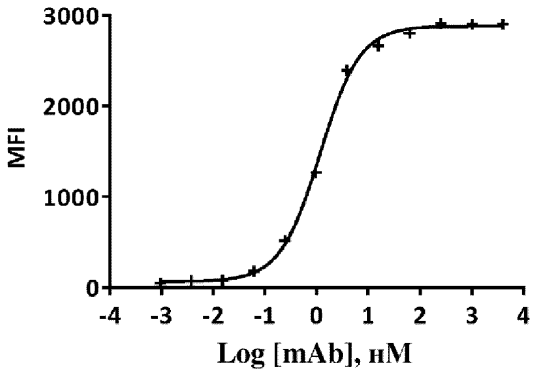
Фиг. 10A

VL ID	VL ID	Замены в VH	Замены в VL
H1.106	L1.47	N30S/Y52CA/Y58A/N100D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.107	L1.47	N30S/Y52CA/Y58A/N100A	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.108	L1.47	N30S/Y52CA/Y58A/N100Q	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H
H1.109	L1.47	N30S/Y52CA/Y58A/N100D/A101D	Q42K/A43S/L75I/E85D/L95H

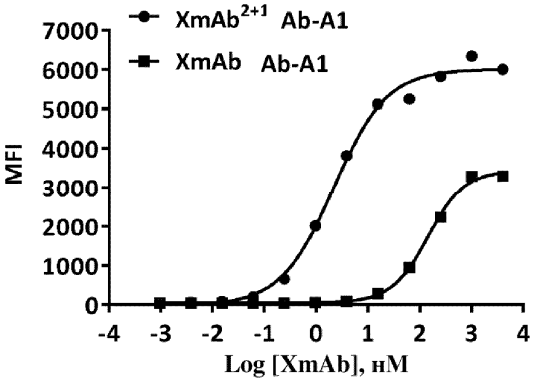
Фиг. 10B



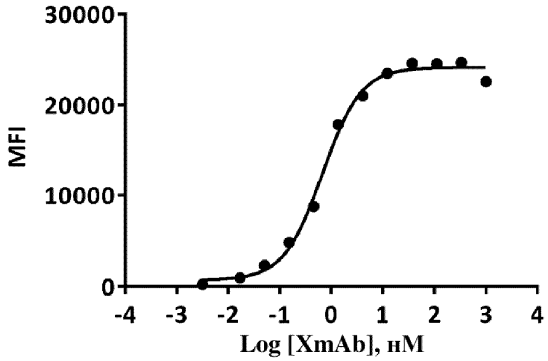
Фиг. 11



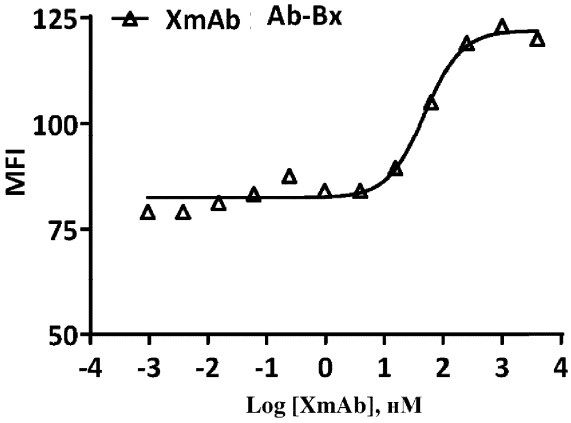
Фиг. 12A



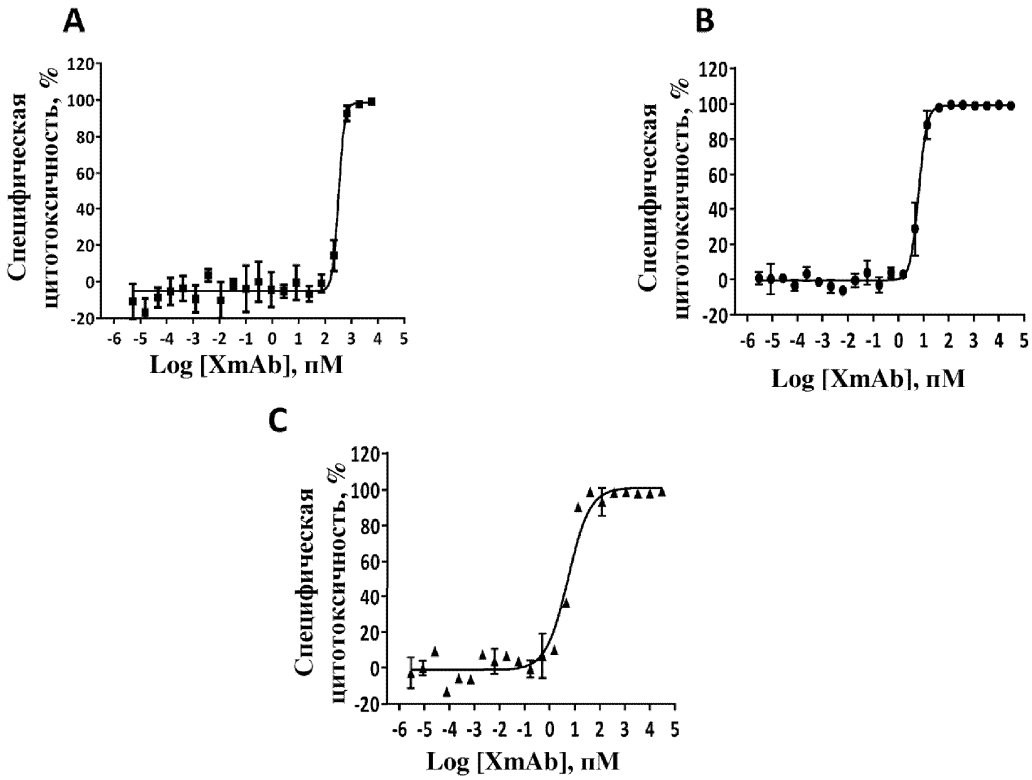
Фиг. 12B



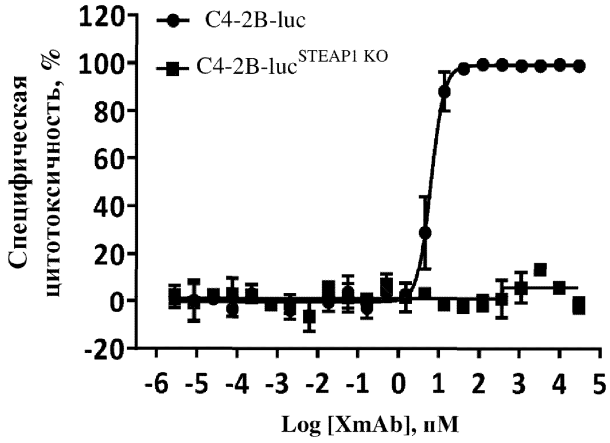
Фиг. 12C



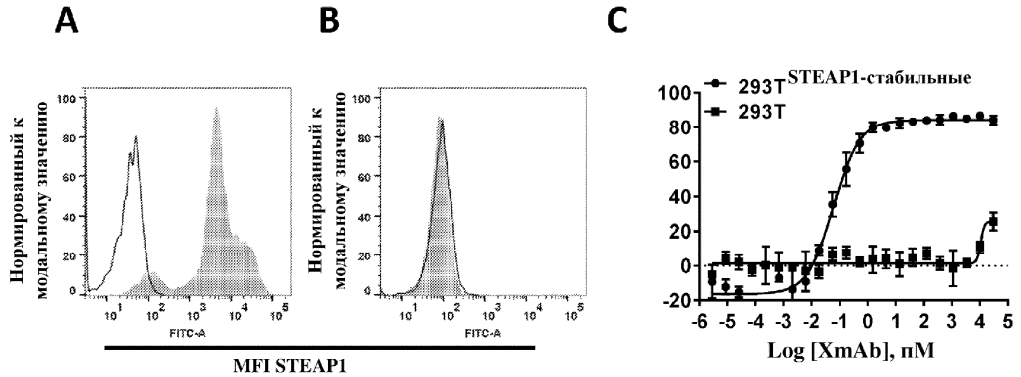
Фиг. 13



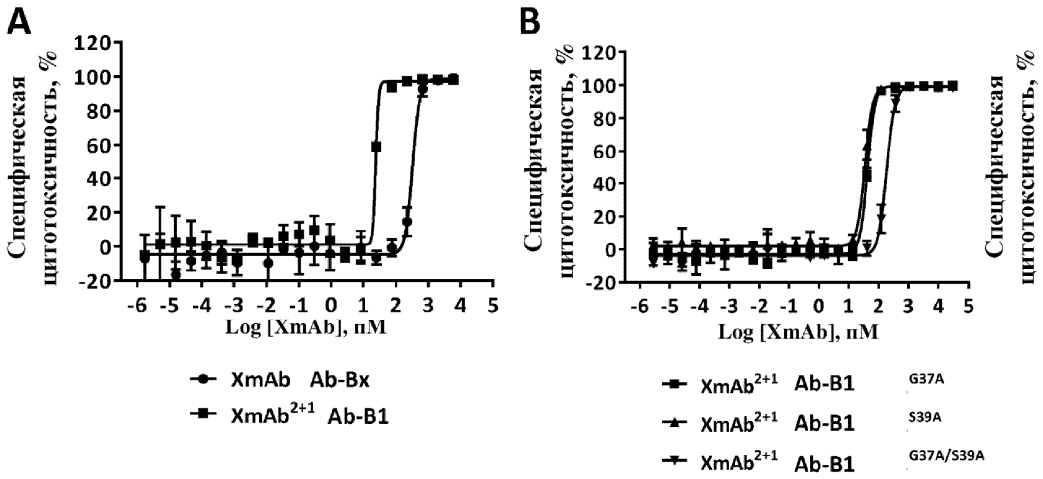
Фиг. 14



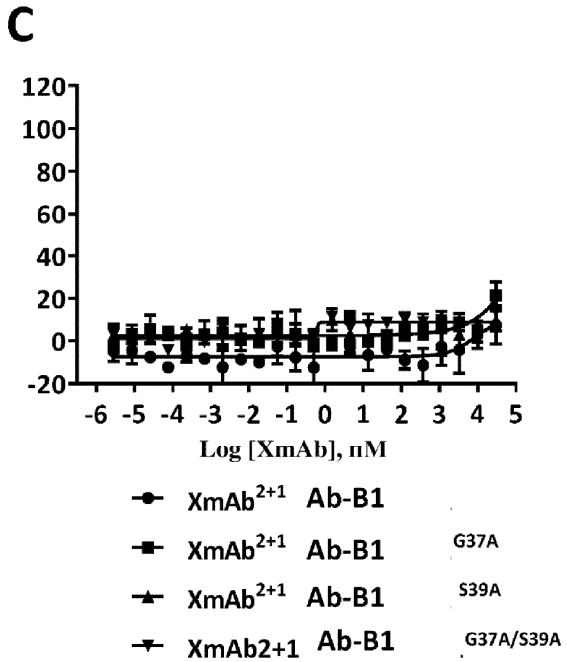
Фиг. 15



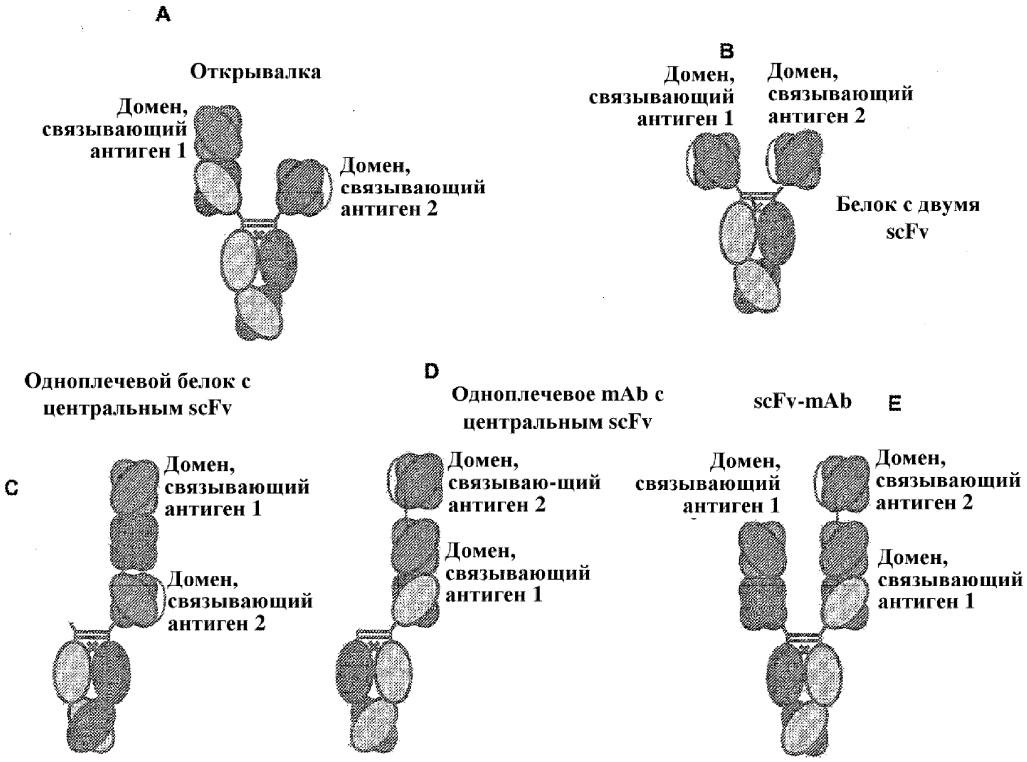
Фиг. 16



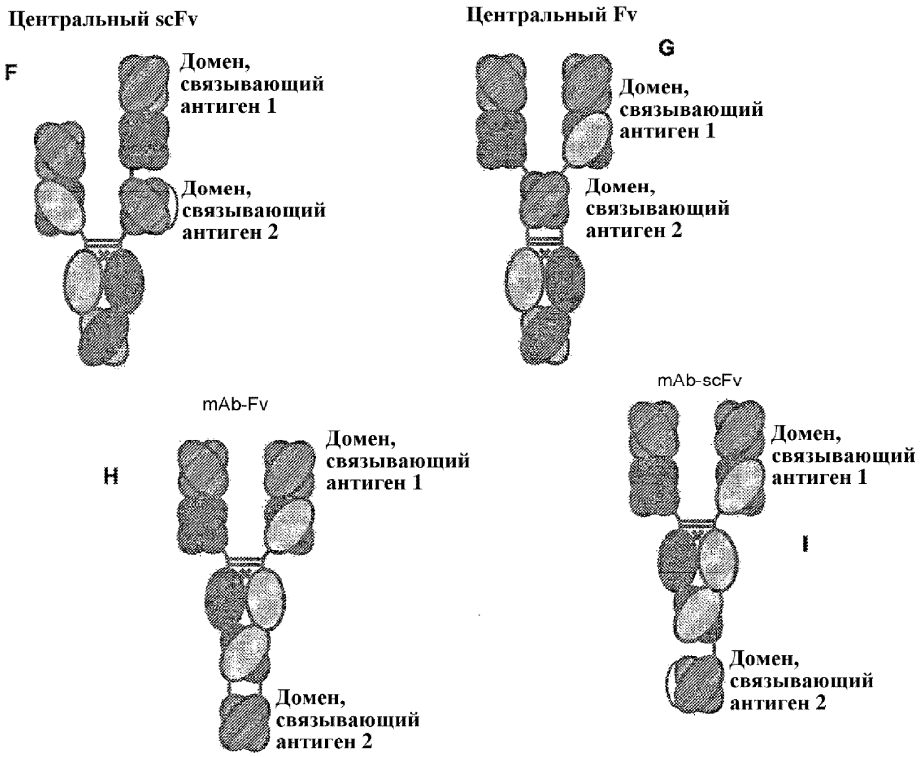
Фиг. 17



Фиг. 17C



Фиг. 18A-E



Фиг. 18F-I

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1.	Эпсилон-цепь CD3 человека	MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNI GSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSK NRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI
2.	STEAP-1 человека	MESRKDITNQEELWKMKPRRNLEEDDYLHKDTGETSMLKRPVLLHLHQTAHADEFDCPSE LQHTQELFPQWHLPIKIAAIIASLTFLYTLLREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPM VSITLLALVYLPGVIAAIVQLHNGTKYKKFPHWLDKWMLTRKQFGLLSFFFAVLHAIYSL SYPMRRSYRYKLLNWAYQQVQQNKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPS VSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLLGTIHALIFAWNKWIDIKQFVWYTPPTFMIAVFLPIV VLIFKSILFLPCLRKKILKIRHGWEDVTKINKTEICSQL
3.	Ab-A, вариабельная область HC	QVQLQQSGAEMMKPGASVKISCKATGYTFSTYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGNTDFNEKFKGKATFTADTS SDTAYMHLSSLTSEDSAVYYCTRWGYYGTRGYFNVWGAGSTVTVSS
4.	Ab-A HCDR1	TYWIE
5.	Ab-A HCDR2	EILPGSGNTDFNEKFKG
6.	Ab-A HCDR3	WGYYGTRGYFNV
7.	Ab-A, вариабельная область LC	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRME AEDAATYYCQQRRSFPYTFGGGTKLEIK
8.	Ab-A LCDR1	SASSSVSYMH
9.	Ab-A LCDR2	STSNLAS
10.	Ab-A LCDR3	QQRRSFPYT
11.	Ab-A1/A2 (N67Q) Xmab^{2+1} LCDR1	RASSSVSYMH
12.	Ab-A1/A2(N67Q) Xmab^{2+1} LCDR2	STSNLAS
13.	Ab-A1/A2 (N67Q) Xmab^{2+1} LCDR3	QQRRSFPYT
14.	Ab-A1/A2 (N67Q) Xmab^{2+1} HCDR1	TYWIE
15.	Ab-A1 Xmab^{2+1} HCDR2	EILPGSGNTDFNEKFQG
16.	Ab-A1/A2 (N67Q) Xmab^{2+1} HCDR3	WGYYGTRGYFNV
17.	Ab-A1/A2 (N67Q) Xmab^{2+1} легкая цепь	MGWSCIILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPAR FSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRRSFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18.	Ab-A1 Xmab^{2+1} тяжелая цепь	MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYWIEWVRQAPGQRLEWMGEILPGSG NTDFNEKFQGRVTFTADTSSDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWGYYGTRGYFNVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS DTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
19.	Ab-A1 Xmab^{2+1} XVHMx	MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYWIEWVRQAPGQRLEWMGEILPGSG NTDFNEKFQGRVTFTADTSSDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWGYYGTRGYFNVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSG KPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKR APGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20.	Ab-A2 (N67Q) Xmab^{2+1} XVHMx	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYWIEWVRQAPGQRLEWMGEIL PGSGQTDFNEKFQGRVTFTADTSSDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWGYYGTRGYFNVWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEW VGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTV SSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTN KRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSKTHTCPPCPA PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
21.	Ab-A2 (N67Q) Xmab^{2+1} HCDR2 (все другие CDR такие же, как в Ab-A1)	EILPGSGQTDFNEKFQG
22.	Ab-B1, вариабельная область тяжелой цепи	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLQWMGWMNTYTGEPTYADDFKGRFAFSLET SARTVSLDINDLKNEDTATYFCTRAGGQLRPGAMDYWGQGTSVTVSS
23.	Ab-B1 HCDR1	NYGMN
24.	Ab-B1 HCDR2	WMNTYTGEPTYADDFKG
25.	Ab-B1 HCDR3	AGGQLRPGAMDY
26.	Ab-B1, вариабельная область легкой цепи	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSFMNWYQQKPGQPPKLLIYVASNLESGIPDRFSGSGSGTDFTLN IHPVEEEDAATYYCQQSNEEPPTFGGGTKLEIK
27.	Ab-B1 LCDR1	KASQSVDYDGDSFMN
28.	Ab-B1 LCDR2	VASNLES
29.	Ab-B1 LCDR3	QQSNEEPPT
30.	Ab-B1 Xmab^{2+1} LCDR1	KASQSVDYDGDSFMN
31.	Ab-B1 Xmab^{2+1} LCDR2	VASNLES
32.	Ab-B1 Xmab^{2+1} LCDR3	QQSNEEPPT
33.	Ab-B1 Xmab^{2+1} HCDR1	NYGMN
34.	Ab-B1 Xmab^{2+1} HCDR2	WMNTYTGEPTYADKFQG
35.	Ab-B1 Xmab^{2+1} HCDR3	AGGQLRPGAMDY
36.	Ab-B1 Xmab^{2+1} легкая цепь	MGWSCIILFLVATATGVHSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVDYDGDSFMNWYLQKPGQPPQLLIYVASNL ESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQSNEEPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
37.	Ab-B1 Xmab^{2+1} тяжелая цепь	MGWSCIILFLVATATGVHSEIQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYTFTNYGMNWVQQAPGQGLEWMGWMNTY TGEPTYADKFQGRVTFTLDTSARTVYMELSSLRSEDTAVYFCARAGGQLRPGAMDYWGQGTMVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
38.	Ab-B1 Xmab^{2+1} XMVHx	MGWSCIILFLVATATGVHSEIQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYTFTNYGMNWVQQAPGQGLEWMGWMNTY TGEPTYADKFQGRVTFTLDTSARTVYMELSSLRSEDTAVYFCARAGGQLRPGAMDYWGQGTMVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVS SGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTN KRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSKTHTCPPCPA PPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
39.	Домен, связывающий CD3, H1_L1.4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV

		TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
40.	Домен, связывающий CD3, H1_L1.4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
41.	Домен, связывающий CD3, H1_L1.4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
42.	Домен, связывающий CD3, H1_L1.4	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
43.	Домен, связывающий CD3, H1.30_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
44.	Домен, связывающий CD3, H1.30_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
45.	Домен, связывающий CD3, H1.30_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
46.	Домен, связывающий CD3, H1.30_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
47.	Домен, связывающий CD3, H1.33_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
48.	Домен, связывающий CD3, H1.33_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
49.	Домен, связывающий CD3, H1.33_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSS
50.	Домен, связывающий CD3, H1.33_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
51.	Домен, связывающий CD3, H1.31_L147	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVT QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQP EDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
52.	Домен, связывающий CD3, H1.31_L147	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVT QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQP EDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
53.	Домен, связывающий CD3, H1.31_L147	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
54.	Домен, связывающий CD3, H1.31_L147	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
55.	Домен, связывающий CD3, H1.32_L147	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
56.	Домен, связывающий CD3, H1.32_L147	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRISKANNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
57.	Домен, связывающий CD3, H1.32_L147	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRISKANNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
58.	Домен, связывающий CD3, H1.32_L147	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
59.	Домен, связывающий CD3, H1.88_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGPSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
60.	Домен, связывающий CD3, H1.88_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGPSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
61.	Домен, связывающий CD3, H1.88_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGPSYVSWFAYWGQGTLVTVSS

62.	Домен, связывающий CD3, H1.88_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
63.	Домен, связывающий CD3, H1.89_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
64.	Домен, связывающий CD3, H1.89_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
65.	Домен, связывающий CD3, H1.89_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFAYWGQGTLVTVSS
66.	Домен, связывающий CD3, H1.89_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
67.	Домен, связывающий CD3, H1.90_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
68.	Домен, связывающий CD3, H1.90_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
69.	Домен, связывающий CD3, H1.90_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFAYWGQGTLVTVSS
70.	Домен, связывающий CD3, H1.90_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
71.	Домен, связывающий CD3, H1.91_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
72.	Домен, связывающий CD3, H1.91_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

73.	Домен, связывающий CD3, H1.91_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
74.	Домен, связывающий CD3, H1.91_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
75.	Домен, связывающий CD3, H1.92_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
76.	Домен, связывающий CD3, H1.92_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
77.	Домен, связывающий CD3, H1.92_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
78.	Домен, связывающий CD3, H1.92_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
79.	Домен, связывающий CD3, H1.93_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGESYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
80.	Домен, связывающий CD3, H1.93_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGESYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
81.	Домен, связывающий CD3, H1.93_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGESYVSWFAYWGQGTLVTVSS
82.	Домен, связывающий CD3, H1.93_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
83.	Домен, связывающий CD3, H1.94_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
84.	Домен, связывающий CD3, H1.94_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV

		TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
85.	Домен, связывающий CD3, H1.94_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
86.	Домен, связывающий CD3, H1.94_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
87.	Домен, связывающий CD3, H1.96_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDNYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
88.	Домен, связывающий CD3, H1.96_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDNYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
89.	Домен, связывающий CD3, H1.96_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDNYVSWFAYWGQGTLVTVSS
90.	Домен, связывающий CD3, H1.96_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
91.	Домен, связывающий CD3, H1.97_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDQYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
92.	Домен, связывающий CD3, H1.97_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDQYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
93.	Домен, связывающий CD3, H1.97_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDQYVSWFAYWGQGTLVTVSS
94.	Домен, связывающий CD3, H1.97_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
95.	Домен, связывающий CD3, H1.98_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
96.	Домен, связывающий CD3, H1.98_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
97.	Домен, связывающий CD3, H1.98_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSS
98.	Домен, связывающий CD3, H1.98_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
99.	Домен, связывающий CD3, H1.99_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
100.	Домен, связывающий CD3, H1.99_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
101.	Домен, связывающий CD3, H1.99_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSS
102.	Домен, связывающий CD3, H1.99_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
103.	Домен, связывающий CD3, H1.100_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
104.	Домен, связывающий CD3, H1.100_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
105.	Домен, связывающий CD3, H1.100_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASYVSWFDYWGQGTLVTVSS
106.	Домен, связывающий CD3, H1.100_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
107.	Домен, связывающий CD3, H1.101_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV

		TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
108.	Домен, связывающий CD3, H1.101_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
109.	Домен, связывающий CD3, H1.101_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFDYWGQGTLVTVSS
110.	Домен, связывающий CD3, H1.101_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
111.	Домен, связывающий CD3, H1.102_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
112.	Домен, связывающий CD3, H1.102_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
113.	Домен, связывающий CD3, H1.102_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDEYVSWFDYWGQGTLVTVSS
114.	Домен, связывающий CD3, H1.102_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
115.	Домен, связывающий CD3, H1.103_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDNYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
116.	Домен, связывающий CD3, H1.103_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDNYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
117.	Домен, связывающий CD3, H1.103_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDNYVSWFDYWGQGTLVTVSS
118.	Домен, связывающий CD3, H1.103_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
119.	Домен, связывающий CD3, H1.104_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
120.	Домен, связывающий CD3, H1.104_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
121.	Домен, связывающий CD3, H1.104_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDPYVSWFDYWGQGTLVTVSS
122.	Домен, связывающий CD3, H1.104_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
123.	Домен, связывающий CD3, H1.105_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDQYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAV VTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
124.	Домен, связывающий CD3, H1.105_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDQYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAV VTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGA QPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
125.	Домен, связывающий CD3, H1.105_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDQYVSWFDYWGQGTLVTVSS
126.	Домен, связывающий CD3, H1.105_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
127.	Домен, связывающий CD3, H1.106_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
128.	Домен, связывающий CD3, H1.106_L1.47 (scFv)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
129.	Домен, связывающий CD3, H1.106_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS

130.	Домен, связывающий CD3, H1.106_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
131.	Домен, связывающий CD3, H1.107_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
132.	Домен, связывающий CD3, H1.107_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
133.	Домен, связывающий CD3, H1.107_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASYVSWFAYWGQGTLVTVSS
134.	Домен, связывающий CD3, H1.107_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
135.	Домен, связывающий CD3, H1.108_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
136.	Домен, связывающий CD3, H1.108_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
137.	Домен, связывающий CD3, H1.108_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
138.	Домен, связывающий CD3, H1.108_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
139.	Домен, связывающий CD3, H1.109_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGSHHHHHH
140.	Домен, связывающий CD3, H1.109_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQ PEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
141.	Домен, связывающий CD3, H1.109_L1.47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKANNYATAYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFDYWGQGTLVTVSS
142.	Домен, связывающий CD3, H1.109_L1.47	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
143.	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGS
144.	Линкер Whitlow	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
145.	Линкер	IRPRAIGGSKPRVA
146.	Линкер	GKGGSGKGGSGKGGS
147.	Линкер	GGKGSGGKGSGGKGS
148.	Линкер	GGGKSGGGKSGGGKS
149.	Линкер	GKGKSGKGKSGKGKS
150.	Линкер	GGGKSGGKGSGKGGS
151.	Линкер	GKPGSGKPGSGKPGS
152.	Линкер	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS
153.	Линкер	GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS
154.	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
155.	Линкер	STAGDTHLGGEDFD
156.	Линкер	GEGGSGEGGSGEGGS
157.	Линкер	GGEGSGGEGSGGEGS
158.	Линкер	GGGESGGGESGGGES
159.	Линкер	GEGESGEGESGEGES
160.	Линкер	GGGESGGEGSGEGGS
161.	Линкер	GEGESGEGESGEGESGEGES
162.	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGS
163.	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
164.	Линкер	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
165.	Линкер	PRGASKSGSASQTGSAPGS
166.	Линкер	GTAAAGAGAAGGAAAGAAG
167.	Линкер	GTSGSSGSGSGGSGSGGGG
168.	Линкер	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS
169.	Ab-A1 XmAb^{2+1}, Ab-A2 (N67Q) XmAb^{2+1}, Ab-B1 XmAb^{2+1}	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSS

	Домен, связывающий CD3, вариабельная область тяжелой цепи	
170.	Ab-A1 XmAb^{2+1}, Ab-A2 (N67Q) XmAb^{2+1}, Ab-B1 XmAb^{2+1}, домен, связывающий CD3, HCDR1	TYAMN
171.	Ab-A1 XmAb^{2+1}, Ab-A2 (N67Q) XmAb^{2+1}, Ab-B1 XmAb^{2+1}, домен, связывающий CD3, HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG
172.	Ab-A1 XmAb^{2+1}, Ab-A2 (N67Q) XmAb^{2+1}, Ab-B1 XmAb^{2+1}, домен, связывающий CD3, HCDR3	HGNFGDSYVSWFAY
173.	Ab-A1 XmAb^{2+} , Ab-A2 (N67Q) XmAb^{2+1}, Ab-B1 XmAb^{2+1}, домен, связывающий CD3, вариабельная область легкой цепи	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTI SGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
174.	Ab-A1 XmAb^{2+1}, Ab-A2 (N67Q) XmAb^{2+1}, Ab-B1 XmAb^{2+1}, домен, связывающий CD3, LCDR1	GSSTGAVTTSNYAN
175.	Ab-A1 XmAb^{2+1}, Ab-A2 (N67Q) XmAb^{2+1}, Ab-B1 XmAb^{2+1}, домен, связывающий CD3, LCDR2	GTNKRAP
176.	Ab-A1 XmAb^{2+1}, Ab-A2 (N67Q) XmAb^{2+1}, Ab-B1 XmAb^{2+1}, домен, связывающий CD3, LCDR3	ALWYSNHWV
177.	STEAP2 человека	MESISMMGSPKSLSETFLPNGINGIKDARKVTVGVIGSGDFAKSLTIRLIRCGYHVVIGS RNPKFASEFFPHVVDVTHHEDALTKTNIIFVAIHREHYTSLWDLRHLLVGKILIDVSNNM RINQYPESNAEYLASLFPDSLIVKGFNVVSAWALQLGPKDASRQVYICSNNIQARQQVIF

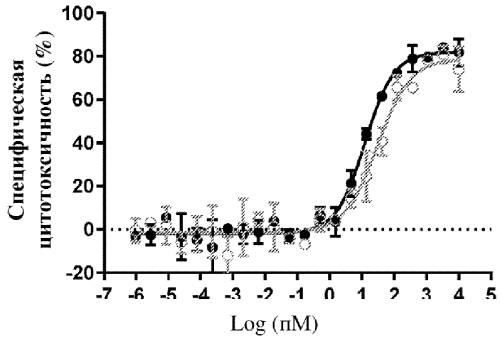
		LARQLNFIPIDLGSLSSAREIENLPLRLFTLWRGPVVVAISLATFFFLYSFVRDVIHPYA RNQQSDFYKIPIEIVNKTLPIVAITLLSLVYLAGLLAAAYQLYYGTKYRRFPPWLETWLQ CRKQLGLLSFFFAMVHVAYSLCLPMRRSERYLFLNMAYQQVHANIENSWNEEEVWRIEMY ISFGIMSLGLLSLLAVTSIPSVSNALNWREFSFIQSTLGYVALLISTFHVLIYGWKRAFE EEYYRFYTPPNFVLALVLPSIVILGKIILFLPCISRKLKRIKKGWEKSQFLEEGMGGTIP HVSPERVTVM
178.	Линкер	GSGGS
179.	Линкер	GGGGS
180.	Линкер	GGGS
181.	Линкер	GFLG
182.	Ab-A1 XmAb^{2+1}, вариабельная область тяжелой цепи	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYWIEWVRQAPGQRLEWMGEILPGSGNTDFNEKFQGRVTFTADTS SDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWGYYGTRGYFNVWGQGTLVTVSS
183.	Ab-A1/A2 (N67Q) XmAb^{2+1}, вариабельная область легкой цепи	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPE DFAVYYCQQRRSFPYTFGQGTKLEIK
184.	Ab-A2 (N67Q) XmAb^{2+1}, вариабельная область тяжелой цепи	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYWIEWVRQAPGQRLEWMGEILPGSGQTDFNEKFQGRVTFTADTS SDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWGYYGTRGYFNVWGQGTLVTVSS
185.	Ab-B1 XmAb^{2+1}, вариабельная область тяжелой цепи	EIQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYTFTNYGMNWVQQAPGQGLEWMGWMNTYTGEPTYADKFQGRVTFTLD TSARTVYMELSSLRSEDTAVYFCARAGGQLRPGAMDYWGQGTMVTVSS
186.	Ab-B1 XmAb^{2+1}, вариабельная область легкой цепи	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVDYDGDSFMNWYLQKPGQPPQLLIYVASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCQQSNEEPPTFGQGTKLEIK
187.	PD-1 человека	PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRF RVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVG VVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYA TIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL
188.	PD-1 яванского макака	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLESPDRPWNAPTFSPALLLVTEGDNATFTCSFSNASESFVLNWYRMSPS NQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTRLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAE VPTAHPSPSPRPAGQFQALVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAAQGTIEARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELD FQWREKTPEPPAPCVPEQTEYATIVFPSGLGTSSPARRGSADGPRSPRPLRPEDGHCSWPL
189.	HC антитела к PD-1	SYDMS

	CDR1	
190.	CDR2 HC антитела к PD-1	LISGGGSQTYYAESVK
191.	CDR3 HC антитела к PD-1	PSGHYFYAMDV
192.	CDR1 LC антитела к PD-1	RASQGISNWLA
193.	CDR2 LC антитела к PD-1	AASSLQS
194.	CDR3 LC антитела к PD-1	QQAESFPHT
195.	HC антитела к PD-1 ВАРИАБЕЛЬНАЯ ОБЛАСТЬ	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSLISGGGSQTYYAESVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYFCASPSGHYFYAMDVWGQGTTVTVSS
196.	LC антитела к PD-1 ВАРИАБЕЛЬНАЯ ОБЛАСТЬ	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIFAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQAESFPHTFGGGTKVEIK
197.	HC антитела к PD-1 ПОЛНОРАЗМЕР-НАЯ	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSLISG GGSQTYYAESVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCASPSGHYFYAMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
198.	LC антитела к PD-1	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIFAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAESFPHTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV

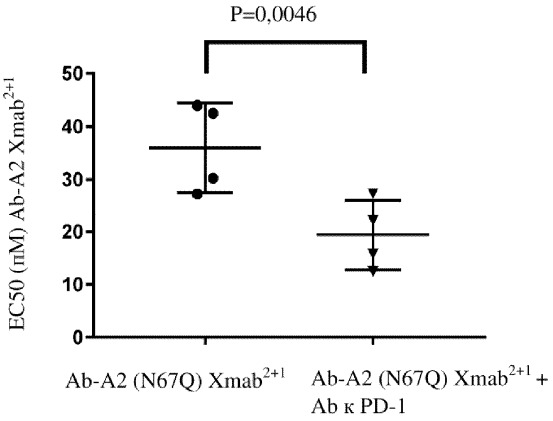
	ПОЛНОРАЗМЕР-НАЯ	CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
199.	Ab-A2 (N67Q) $XmAb^{2+1}$, тяжелая цепь	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYWIEWVRQAPGQRLEWMGEIL PGSGQTDFNEKFQGRVTFTADTSSDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWGYYGTRGYFNVWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPCEEEYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
200.	Ab-A1/A2 (N67Q) $Xmab^{2+1}$ Легкая цепь без сигнальной последовательности	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPE DFAVYYCQQRRSFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
201.	Ab-A1 $Xmab^{2+1}$ Тяжелая цепь без сигнальной последовательности	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYWIEWVRQAPGQRLEWMGEILPGSGNTDFNEKFQGRVTFTADTS SDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWGYYGTRGYFNVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
202.	Ab-A1 $Xmab^{2+1}$ XVHMx без сигнальной последовательности	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYWIEWVRQAPGQRLEWMGEILPGSGNTDFNEKFQGRVTFTADTS SDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWGYYGTRGYFNVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPG SQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAAL TISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS

		RTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
203.	Ab-A2 (N67Q) Xmab 2+1 тяжелая цепь без сигнальной последовательности	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYWIEWVRQAPGQRLEWMGEILPGSGQTDFNEKFQGRVTFTADTS SDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWGYYGTRGYFNVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEEYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEW ESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
204.	Ab-B1 Xmab^{2+1} легкая цепь без сигнальной последовательности	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVDYDGDSFMNWYLQKPGQPPQLLIYVASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCQQSNEEPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
205.	Ab-B1 Xmab^{2+1} тяжелая цепь без сигнальной последовательности	QLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYTFTNYGMNWVQQAPGQGLEWMGWMNTYTGEPTYADKFQGRVTFTLDT SARTVYMELSSLRSEDTAVYFCARAGGQLRPGAMDYWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVE WESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
206.	Ab-B1 Xmab^{2+1} XMVHx без сигнальной последовательности	QLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYTFTNYGMNWVQQAPGQGLEWMGWMNTYTGEPTYADKFQGRVTFTLDT SARTVYMELSSLRSEDTAVYFCARAGGQLRPGAMDYWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGG GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVK GRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGK PGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKA ALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
207.	Ab-A2 (N67Q) Xmab^{2+1} XVHMx	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYWIEWVRQAPGQRLEWMGEILPGSGQTDFNEKFQGRVTFTADTS SDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWGYYGTRGYFNVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
	без сигнальной последовательности	YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPG SQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAAL TISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
208.	HC антитела к PD-1 ПОЛНОРАЗМЕРНАЯ без сигнальной последовательности	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSLISGGGSQTYYAESVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYFCASPSGHYFYAMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
209.	LC антитела к PD-1 ПОЛНОРАЗМЕРНАЯ без сигнальной последовательности	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIFAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQAESFPHTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Фиг. 19

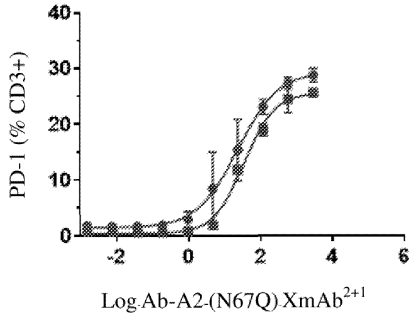


Фиг. 20А



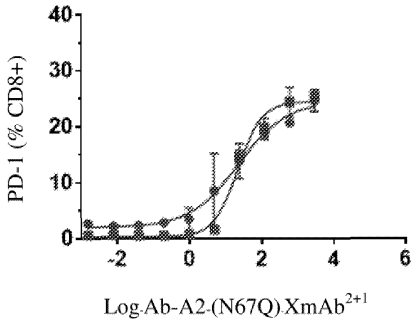
Фиг. 20B

Общие Т-клетки (CD3+)



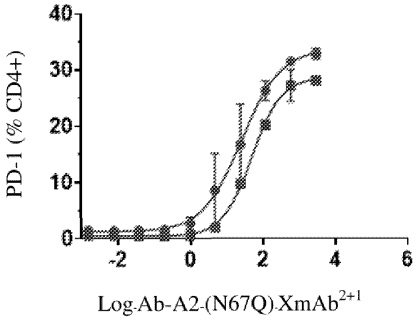
Фиг. 21A

CD8-положительные Т-клетки

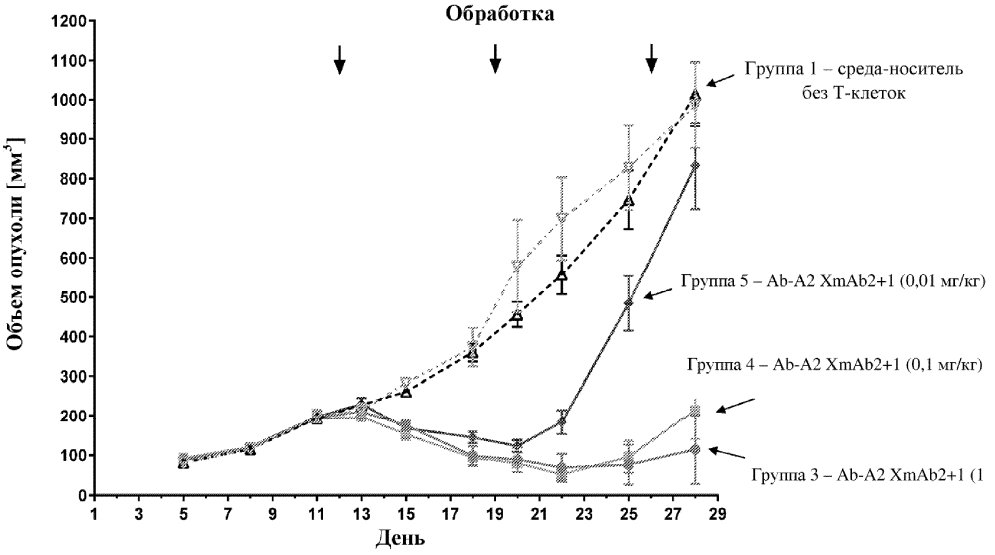


Фиг. 21B

CD4-положительные Т-клетки



Фиг. 21C



Фиг.22

Средние и медианные объемы опухоли для нейробластомы человека SK-N-MC у самок мышей NOD/SCID

Дозовая группа	Параметр	Объем опухоли [мм³]									
		День 5	День 8	День 11	День 13	День 15	День 18	День 20	День 22	День 25	День 28
1 Среда-носитель без Т-клеток	Среднее	81,42	115,24	198,79	212,62	282,70	373,05	578,73	698,38	827,31	985,94
	Медиана	90,28	122,85	203,63	229,86	286,81	323,09	563,09	598,48	673,42	885,10
	SEM	9,84	10,43	15,69	18,48	12,75	48,70	117,46	104,52	106,45	108,87
	Животные [N]	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Значимость	n.p.	n.p.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2 Среда-носитель	Среднее	81,70	115,59	192,91	227,63	260,98	360,22	456,04	557,15	746,68	1013,67
	Медиана	80,44	118,24	196,61	225,01	253,27	348,93	468,93	590,08	837,07	955,14
	SEM	3,26	5,84	5,65	8,43	8,27	22,88	31,99	49,93	73,79	82,53
	Животные [N]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
3 Ab-A2 XmAb2+1 (1,0 мг/кг)	Среднее	90,20	116,48	194,16	210,85	174,59	98,67	89,06	69,26	76,53	114,65
	Медиана	87,90	115,14	197,87	206,94	166,09	78,41	59,90	33,53	27,07	29,77
	SEM	6,06	6,83	5,86	10,05	12,61	24,54	30,99	34,20	49,48	85,58
	Животные [N]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Значимость	n.p.	n.p.	n.s.	n.s.	***	***	***	***	***	***
4 Ab-A2 XmAb2+1 (0,1 мг/кг)	Среднее	92,85	120,80	192,45	196,10	152,32	94,10	80,21	52,33	96,21	214,04
	Медиана	92,42	117,60	197,59	198,67	144,59	88,07	76,73	41,56	55,86	106,87
	SEM	4,26	7,36	5,14	12,56	14,21	9,02	10,31	12,89	40,62	73,43
	Животные [N]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Значимость	n.p.	n.p.	n.s.	n.s.	***	***	***	***	***	***
5 Ab-A2 XmAb2+1 (0,1 мг/кг)	Среднее	88,12	120,82	196,68	230,31	168,00	145,00	122,92	183,51	484,07	832,45
	Медиана	90,29	119,04	200,97	217,31	150,74	121,75	115,60	202,07	431,89	867,08
	SEM	5,07	7,38	5,23	15,01	13,55	14,25	14,81	29,98	69,24	109,11
	Животные [N]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Значимость	n.p.	n.p.	n.s.	n.s.	***	***	***	***	*	n.s.

Однофакторный ANOVA и оценка экспериментальных данных по росту опухоли с помощью апостериорного критерия Даннетта по сравнению с группой 2; значимый: *= p <0,05; **= p < 0,01; *** = p<0,001. Статистический анализ с дня 11 (один день до начала обработки) по день 28.
N = число животных; n.p. = не проводили; n.s. = не значимый; SEM = стандартная ошибка среднего; без = без использования

Фиг. 23