

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202392942 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.02.21

(22) Дата подачи заявки  
2022.04.20

(51) Int. Cl. A61K 47/60 (2017.01)  
A61K 47/65 (2017.01)  
C07K 16/28 (2006.01)  
C07K 16/32 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 43/00 (2006.01)

(54) МОДУЛЯЦИЯ АНТИТЕЛОЗАВИСИМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ

(31) 63/177,218

(32) 2021.04.20

(33) US

(86) PCT/US2022/025610

(87) WO 2022/226100 2022.10.27

(71) Заявитель:

СИДЖЕН ИНК. (US)

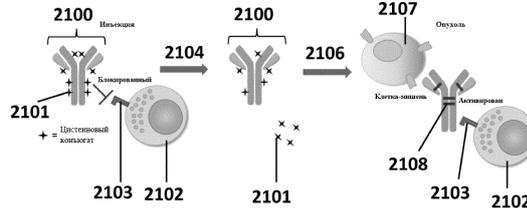
(72) Изобретатель:

Моквист Филип, Ливенгуд Мэттью Р.,  
Лейске Кристофер И., Биндман  
Ной А. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится, среди прочего, к антителам с ковалентно присоединенными биосовместимыми полимерными фрагментами, которые полезны при лечении различных заболеваний, таких как рак и аутоиммунные расстройства.



202392942

A1

A1

202392942

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579354EA/023

### МОДУЛЯЦИЯ АНТИТЕЛОЗАВИСИМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

В данной заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке США № 63/177218, поданной 20 апреля 2021 г., содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII и включенный в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 19 апреля 2022 г., имеет название 114093-718743\_SL.txt и размер 481258 байт.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) представляет собой Fc-зависимую эффекторную функцию, важную для эффективной терапии антителами. ADCC - это иммунная реакция, при которой антитела связываются с клеткой-мишенью или микроорганизмом; затем иммунные клетки связывают антитела и выделяют вещества, которые лизируют клетку-мишень или микроорганизм. См., например, Wang et al., *Prot. Cell* 2018: 9; 67-73. ADCC, опосредованный естественными киллерами (NK)-клетками, в первую очередь запускается подклассами IgG IgG1 и IgG3 через рецептор IgG-Fc (Fc гамма рецептор) IIIa. Связывание Fc-рецептора вызывает высвобождение гранзимов, индуцирующих апоптоз, и перфоринов, которые олигомеризуются и образуют поры в мембранах клеток-мишеней. См., например, Trapani and Smyth, *Nat. Rev. Immunol.* 2002: 2; 735-47 и Smyth, et al., *Mol. Immunol.* 2005: 42; 501-10. Однако, хотя ADCC является важным механизмом действия терапии моноклональными антителами, нецелевое связывание антител или активация иммунных клеток может привести к нежелательным побочным эффектам, таким как реакции, связанные с инфузией (IRR) и синдром системного высвобождения цитокинов (CRS). См., например, Tawara, et al., *J. Immunol.* 2008;180:2294-8 и Wang, et al., *Front. Immunol.* 2015: 6; 368. Действительно, многие из наиболее часто применяемых противораковых иммунотерапий связаны с IRR. См. Caceres, et al., *Ther. Clin. Risk Manag.* 2019: 15; 965-977. Кроме того, ожидается, что антитела с повышенной аффинностью связывания рецептора Fc (FcR) вследствие афукозилирования или генной инженерии в области Fc антитела будут более склонны к проявлению этих нежелательных побочных эффектов. Таким образом, сохраняется потребность в модуляции эффекторной функции терапевтических антител для поддержания эффективности и благоприятной фармакокинетики при одновременном снижении нецелевых эффектов, например, возникающих в результате системного связывания Fc гамма рецептора IIIa.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Аспекты настоящего изобретения относятся к антителу с модулированной эффекторной функцией (MEF), причем антитело MEF содержит модификацию,

усиливающую эффекторную функцию, и модификацию, уменьшающую эффекторную функцию, причем модификация, уменьшающая эффекторную функцию, содержит биосовместимый полимерный фрагмент (ВРМ) с ковалентным присоединением к аминокислоте или посттрансляционную модификацию антитела MEF. В некоторых вариантах осуществления модификация, снижающая эффекторную функцию, является по меньшей мере частично обратимой. В некоторых вариантах осуществления ковалентное присоединение является расщепляемым, расщепление которого по меньшей мере частично обращает вспять модификацию, снижающую эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления ВРМ содержит расщепляемый фрагмент, отдельно от ковалентного присоединения, расщепление которого по меньшей мере частично обращает модификацию, снижающую эффекторную функцию.

В некоторых вариантах осуществления модификация, усиливающая эффекторную функцию, увеличивает аффинность связывания антитела MEF к Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIIIa, Fc $\gamma$ RIIIb или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления модификация, усиливающая эффекторную функцию, включает афукозилирование, расщепление пополам N-ацетил глюкозамина, мутацию Fc-области S298A, мутацию Fc-области E333A, мутацию Fc-области K334A, мутацию Fc-области S239D, мутацию Fc-области I332E, мутацию Fc-области G236A, мутацию Fc-области S239E, мутацию Fc-области A330L, мутацию Fc-области G236A, мутацию Fc-области L234Y, мутацию Fc-области G236W, мутацию Fc-области S296A, мутацию Fc-области F243, R292P мутацию Fc-области, мутацию Fc-области Y300L, мутацию Fc-области V305L, мутацию Fc-области R396L или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления модификация, усиливающая эффекторную функцию, включает афукозилирование.

В некоторых вариантах осуществления аминокислота включает остаток цистеина или остаток метионина. В некоторых вариантах осуществления ковалентное присоединение к остатку цистеина включает дисульфидную связь, тиоэфирную связь, тиоаллильную связь, винилтиоловую связь или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления дисульфидная связь, тиоаллильная связь или их комбинация являются расщепляемыми. В некоторых вариантах осуществления остаток метионина соединяется с ВРМ через сульфанимин. В некоторых вариантах осуществления посттрансляционная модификация включает гликозилирование, нитрозилирование, фосфорилирование, цитруллинирование, сульфенилирование или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления ВРМ содержит ферментативно расщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ферментативно расщепляемый фрагмент содержит последовательность протеазного расщепления, гликозидную группу, карбамат, мочевину, четвертичный аммоний или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления ферментативно расщепляемый фрагмент содержит последовательность протеазного расщепления. В некоторых вариантах осуществления последовательность протеазного расщепления представляет собой последовательность опухолеассоциированного протеазного расщепления. В некоторых вариантах

осуществления последовательность протеазного расщепления представляет собой последовательность расщепления тромбина, катепсина, матриксной металлопротеиназы, активирующего пептида PAR-1, калликреина, гранзима, каспазы, ADAM, кальпаина, простатспецифического антигена, белка активации фибробластов, дипептидилпептидазы IV, или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления модификация, снижающая эффекторную функцию, является по меньшей мере частично обратимой. В некоторых вариантах осуществления, до по меньшей мере частичного обращения модификации, снижающей эффекторную функцию, антитело MEF имеет от 2% до 20% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишённого BPM. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF обладает от 30% до 70% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишённого BPM, после 192-часовой инкубации в плазме человека при 37 °C. В некоторых вариантах осуществления, до по меньшей мере частичного обращения модификации, снижающей эффекторную функцию, антитело MEF имеет от 2% до 20% активности связывания FcγRIII эквивалентного антитела, лишённого BPM. В некоторых вариантах осуществления через 192 часа после введения антитела MEF имеет от 30% до 70% аффинности связывания FcγRIII по сравнению с эквивалентным антителом, не имеющим BPM. В некоторых вариантах осуществления скорость клиренса антитела MEF составляет от 25% до 200% скорости по меньшей мере частичного обращения модификации, снижающей эффекторную функцию.

Аспекты настоящего изобретения обеспечивают антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), связанное с множеством биосовместимых полимерных фрагментов (BPM) и Fc, которая по меньшей мере частично блокирована BPM или их комбинация; при этом BPM из множества BPM присоединен к атому серы остатка цистеина посредством расщепляемого фрагмента, содержащего дисульфидную связь.

Аспекты настоящего изобретения обеспечивают антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), связанное с множеством биосовместимых полимерных фрагментов (BPM) и Fc, которая по меньшей мере частично блокирована BPM; при этом BPM из множества BPM присоединен к остатку метионина посредством расщепляемого фрагмента.

Аспекты настоящего изобретения обеспечивают антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), содержащее по меньшей мере одну Fc-область и связанное с множеством биосовместимых полимерных фрагментов (BPM), содержащих расщепляемые фрагменты и присутствующих в соотношении от 6 до 10 к Fc-областям по меньшей мере одной Fc-области; где множество биосовместимых полимерных фрагментов имеют молекулярную массу от 500 до 2500 дальтон (Да); и где расщепляемые фрагменты имеют скорость расщепления от 0,1 до 0,5 день<sup>-1</sup> в плазме человека при 37 °C.

Аспекты настоящего изобретения относятся к антителу с модулированной эффекторной функцией (MEF), где антитело MEF имеет 1, 2, 3 или 4 восстановленные межцепочечные дисульфидные связи и 2, 4, 6 или 8 биосовместимых полимерных

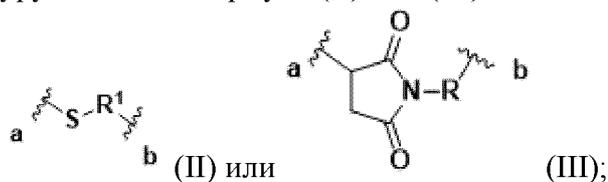
фрагментов (BPM) соответственно; где каждый BPM ковалентно присоединен к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемый фрагмент; и при этом антитело MEF демонстрирует зависящее от времени снижение связывания FcR и, таким образом, соответствующее зависящее от времени снижение эффекторной функции по сравнению с функцией эквивалентного антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF имеет от 2% до 20% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, не обладающего BPM. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF имеет от 2% до 10% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, не обладающего BPM. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF обладает от 30% до 70% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишённого BPM, после 192-часовой инкубации в плазме человека при 37 °C. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF имеет менее 50% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишённого BPM, после расщепления половины его BPM. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент имеет скорость расщепления от 100% до 500% от его физиологической скорости клиренса во время кровообращения *in vivo* у взрослого человека мужского пола. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент имеет скорость расщепления от 50% до 300% от его физиологической скорости клиренса во время кровообращения *in vivo* у взрослого человека мужского пола.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент сконфигурирован для участия во вторичной реакции, которая снижает скорость его расщепления. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент включает сукцинимид, и при этом вторичная реакция включает гидролиз сукцинимида. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент выполнен с возможностью подвергаться расщеплению BPM по меньшей мере в два раза быстрее, чем вторичная реакция в кровотоке *in vivo* у взрослого человека мужского пола.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент ковалентно присоединен к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемую дисульфидную связь или через расщепляемую тиоэфирную связь с негидролизированным сукцинимидным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления негидролизированный сукцинимид способен подвергаться тиоэфирному расщеплению быстрее, чем гидролиз в плазме человека при 37 °C. В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент ковалентно присоединен к атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через тиоэфирную связь с гидролизированным сукцинимидным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент ковалентно присоединен к атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемую дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно Формуле (II) или (III):



где:

$R^1$  представляет собой  $C_2$ - $C_{12}$  алкилен, необязательно прерванный одним из  $-NH-$ ,  $C(=O)-$ ,  $-C(=O)NH-$ ,  $-NH-$  и  $-O-$ ;

$R$  отсутствует или представляет собой  $C_1$ - $C_{12}$  алкилен, необязательно прерванный одним или двумя фенилами,  $-NH-C(=O)-$ ,  $-C(=O)NH-$ ,  $-NH-$ ,  $-O-$ ,  $-O-C(=O)-$ ,  $-C(=O)O-$ ,  $-S-C(=O)-$ ,  $-C(=O)S-$ ,  $-O-C(=O)O-$ ,  $-C(=NR^{1A})$ , ацеталем,  $-O(SO_2)O-$ ,  $-O-[P(=O)(-OH)]O-$ ,  $-C(=N-OH)-$ ,  $-C(=N-NH_2)-$ , и  $-C(R^{1A})=N-NH-$ ; а  $R$  необязательно замещен 1-3 заместителями, независимо выбранными из фенила, оксо и  $-CO_2R^A$ ;  $C_3$ - $C_6$  циклоалкилена; а фенил, необязательно замещенный 1-3 независимо выбранными  $C_1$ - $C_3$  алкокси;

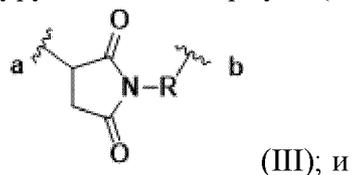
каждый  $R^A$  независимо представляет собой водород или  $C_1$ - $C_6$  алкил;

каждый  $R^{1A}$  независимо представляет собой водород или  $C_1$ - $C_6$  алкил;

где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к остатку цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и

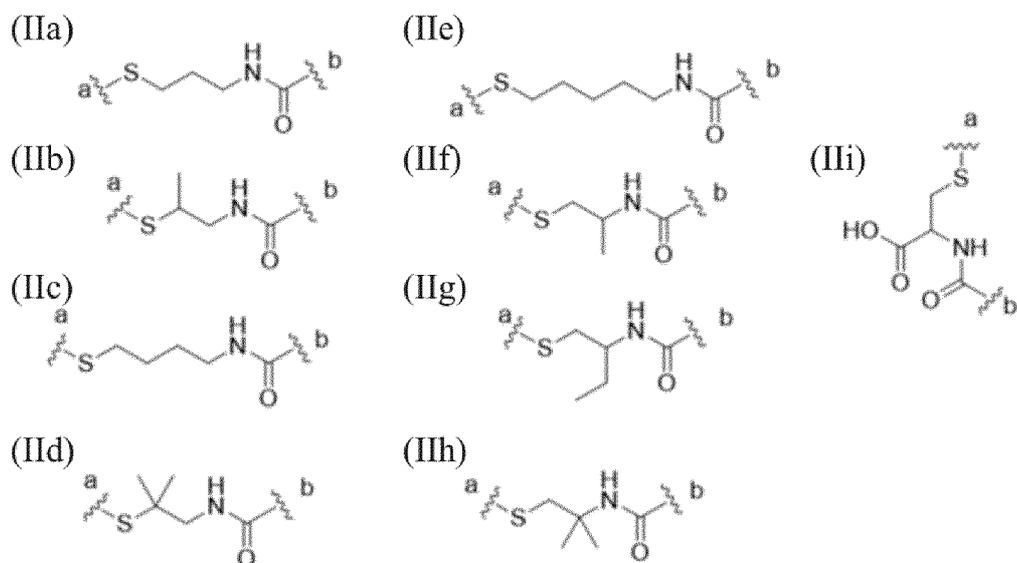
$\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение к ВРМ или остатку расщепляемого фрагмента, который сохраняет ковалентное присоединение к ВРМ.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент имеет структуру согласно Формуле (III):



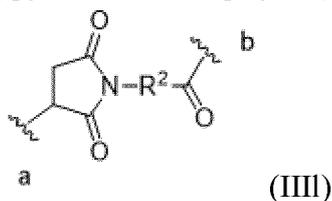
где  $R$  представляет собой  $C_1$ - $C_{12}$  алкилен, прерванный  $-C(=N-NH_2)-$  или  $-C(R^{1A})=N-NH-$ ; или прерванный фенилом и одним из  $-C(=N-NH_2)-$  и  $-C(R^{1A})=N-NH-$ .

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру любой из Формул (IIa)-(IIi):



где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и  $\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение расщепляемого фрагмента к ВРМ.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно Формуле (III):



где:

$R^2$  представляет собой  $C_1$ - $C_{15}$  алкил, необязательно замещенный одним или более гидроксильной группой, галогеном,  $-CN$ ,  $C_1$ - $C_6$  алкилом,  $C_1$ - $C_6$  алкенилом,  $C_1$ - $C_6$  алкинилом,  $C_1$ - $C_6$  алкоксилем,  $C_1$ - $C_6$  тиоалкокси,  $-C_1$ - $C_6$  циклоалкилом,  $-NR^3R^4$ ,  $-C(=O)-R^3$ ,  $-C(=O)-OR^5$ , PEG2-PEG72 или их комбинацией;

$R^3$  и  $R^4$  каждый независимо выбирают из группы, состоящей из H,

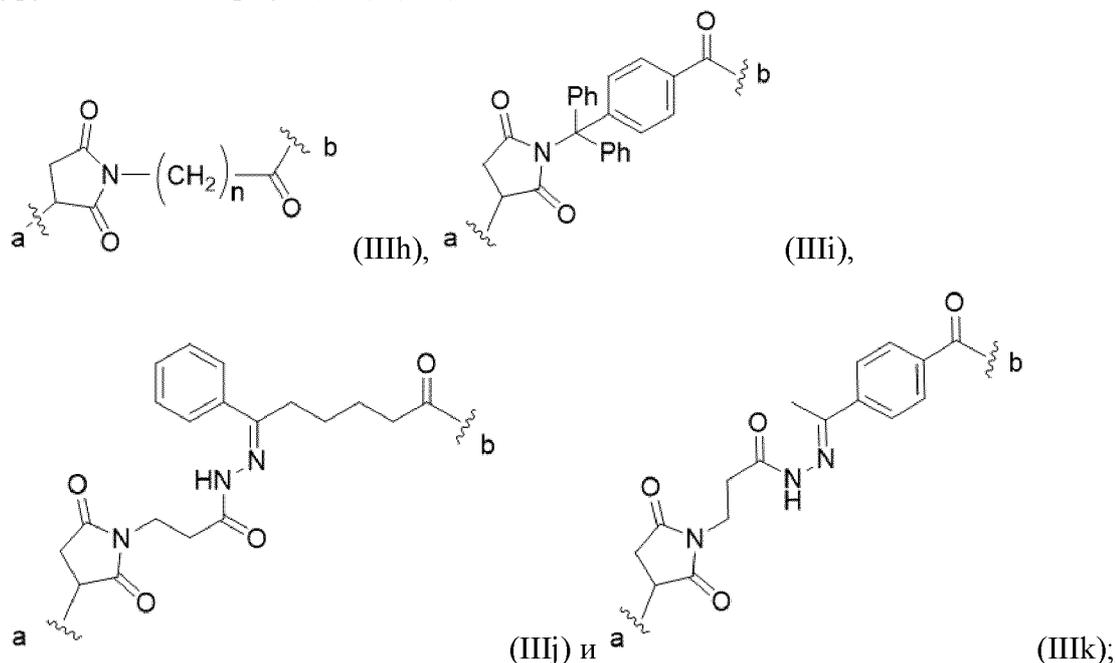
$\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и

$\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение расщепляемого фрагмента к ВРМ.

В некоторых вариантах осуществления,  $R^2$  представляет собой  $C_1$ - $C_{15}$  алкил, необязательно замещенный одним или более гидроксильной группой, галогеном,  $-CN$ ,  $C_1$ - $C_6$  алкилом,  $C_1$ - $C_6$  алкоксилем или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления,  $R^2$  представляет собой  $C_1$ - $C_{12}$  алкил, необязательно замещенный одним или более гидроксильной группой, галогеном,  $-CN$ ,  $C_1$ - $C_3$  алкилом,  $C_1$ - $C_3$  алкоксилем или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления,  $R^2$  представляет собой  $C_1$ - $C_{12}$  алкил, необязательно

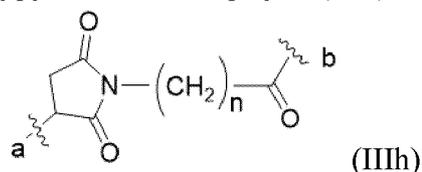
замещенный одним или более гидроксиллом, галогеном или C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> алкилом.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру любой из Формул (IIIh)-(IIIk):



где индекс  $n$  представляет собой целое число от 2 до 8; и  
 где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и  $\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение расщепляемого фрагмента к ВРМ.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно Формуле (IIIh):



где индекс  $n$  представляет собой целое число от 2 до 8; и  
 где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и  $\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение расщепляемого фрагмента к ВРМ.

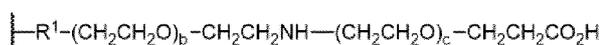
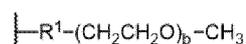
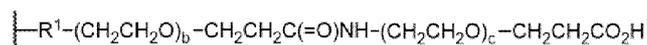
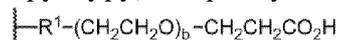
В некоторых вариантах осуществления зависящее от времени снижение связывания FcR антитела MEF характеризуется начальным снижением связывания FcR по меньшей мере от около 50% до около 90% по сравнению с эквивалентным антителом. В некоторых вариантах осуществления первоначальное снижение связывания FcR антитела MEF характеризуется  $K_D$ , которая примерно в 2-1000 раз выше, чем у эквивалентного антитела. В некоторых вариантах осуществления за первоначальным снижением связывания FcR следует восстановление связывания, что является дополнительной характеристикой зависящего от времени снижения связывания FcR, причем восстановление коррелирует с

потерей ВРМ за счет неферментативного расщепления соответствующего расщепляемого фрагмента(фрагментов) в физиологических средах. В некоторых вариантах осуществления физиологическая среда представляет собой плазму позвоночных. В некоторых вариантах осуществления каждый из расщепляемых фрагментов имеет период полужизни из плазмы от около 3 часов до около 96 часов. В некоторых вариантах осуществления восстановление существенно восстанавливает связывание FcR с эквивалентным антителом через период от около 3 часов до около 96 часов *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF является фукозилированным. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF является афукозилированным. В некоторых вариантах осуществления антитело антитела MEF представляет собой терапевтическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой фрагмент полиэтиленгликоля, поликетальный фрагмент, полиглицериновый фрагмент, полисахаридный фрагмент, полисаркозиновый фрагмент, полипептидный фрагмент или полицвиттерионный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой монодисперсный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ содержит монодисперсный полиэтиленгликоль, полиглицерин, полипептид или полисахаридный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой полидисперсный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ содержит полидисперсный полиэтиленгликоль, полиглицерин, полипептид или полисахаридный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет средневесовую молекулярную массу от около 100 дальтон до около 5000 дальтон. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет средневесовую молекулярную массу от около 1 000 дальтон до около 3000 дальтон. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 5 нм до около 25 нм. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 15 нм до около 25 нм. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 10 нм до около 20 нм. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 5 нм до около 15 нм. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 5 нм до около 10 нм. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ содержит монодисперсный фрагмент от PEG2 до PEG72. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ содержит монодисперсный фрагмент от PEG8 до PEG48. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ содержит монодисперсный фрагмент от PEG12 до PEG24. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ содержит монодисперсный разветвленный фрагмент от PEG20 до PEG76; и при этом каждая ветвь содержит по меньшей мере две смежные субъединицы этиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления каждый монодисперсный разветвленный фрагмент от PEG20 до PEG76 имеет от 2 до 8 ветвей. В некоторых вариантах осуществления каждый монодисперсный

разветвленный фрагмент от PEG20 до PEG76 имеет от 2 до 6 ветвей. В некоторых вариантах осуществления каждый монодисперсный разветвленный фрагмент от PEG20 до PEG76 имеет от 2 до 4 ветвей. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой фрагмент PEG4(PEG8)<sub>3</sub> или PEG4(PEG24)<sub>3</sub>. В некоторых вариантах осуществления каждый фрагмент полиэтиленгликоля ВРМ имеет кэп, выбранный из группы, состоящей из -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H и -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:



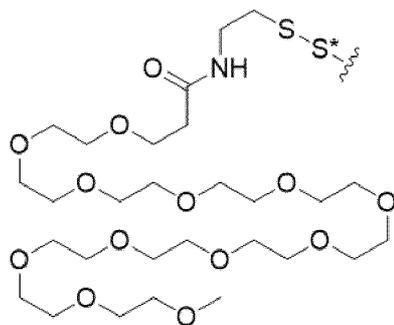
где R<sup>1</sup> представляет собой C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкилен, необязательно прерванный одним из -NH-C(=O)-, -C(=O)NH-, -NH- или -O-, к которому ковалентно присоединена расщепляемый фрагмент, и необязательно замещенный -CO<sub>2</sub>H;

каждый индекс b находится в диапазоне от 2 до 72;

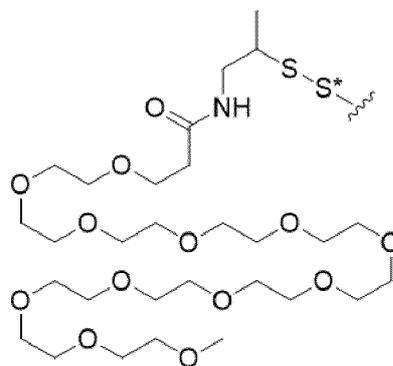
каждый индекс c находится в диапазоне от 1 до 72; и

~ указывает место ковалентного присоединения к расщепляемому фрагменту. В некоторых вариантах осуществления индекс b находится в диапазоне от 6 до 72, а индекс c находится в диапазоне от 1 до 12. В некоторых вариантах осуществления индекс b находится в диапазоне от 8 до 72, а индекс c находится в диапазоне от 1 до 12. В некоторых вариантах осуществления индекс b находится в диапазоне от 10 до 72, а индекс c находится в диапазоне от 1 до 12. В некоторых вариантах осуществления индекс b находится в диапазоне от 12 до 72, а индекс c находится в диапазоне от 1 до 12.

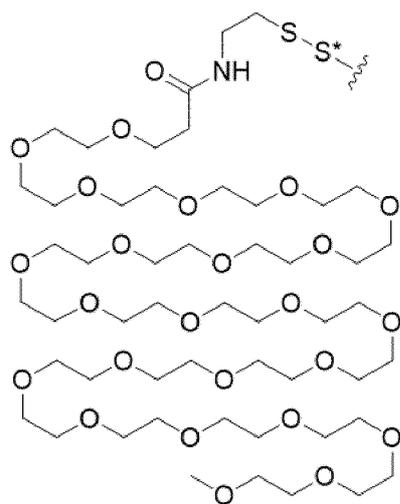
В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ и расщепляемый фрагмент вместе с атомом серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF, к которому ковалентно присоединен расщепляемый фрагмент, имеют структуру согласно любой из формул (IIj-IIn):



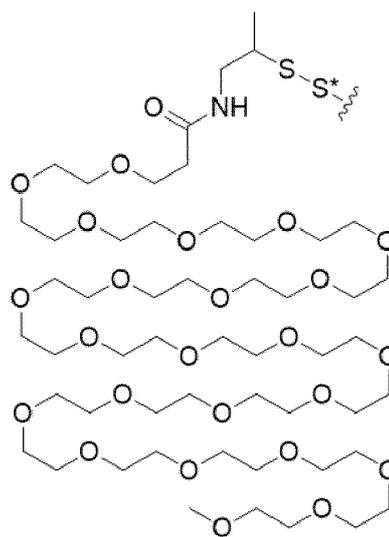
(IIj),



(IIk),

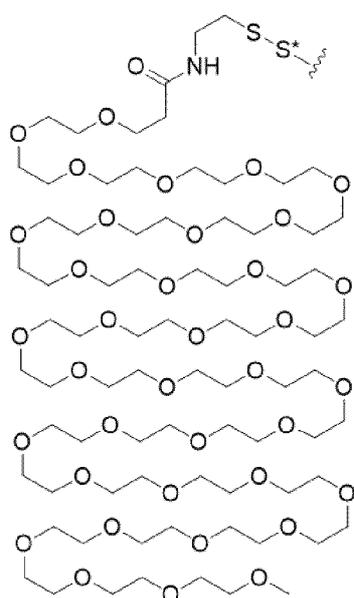


(III),



(IIIм)

и

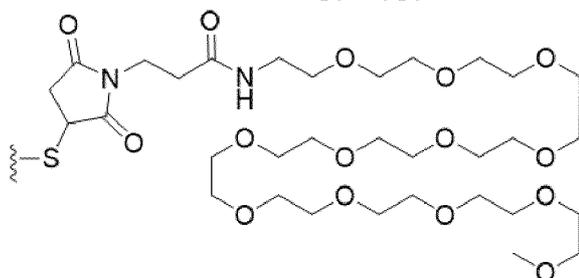


(IIIп);

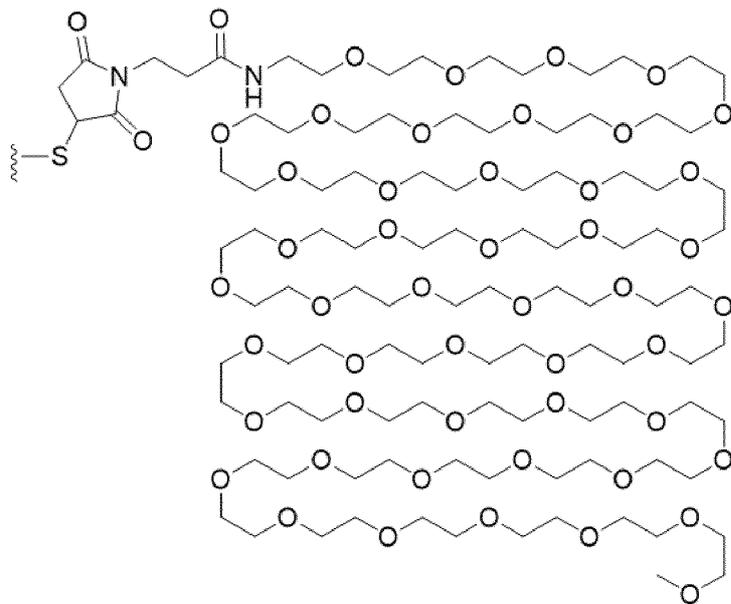
где S\* представляет собой атом серы из остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и

где ~~~~~ указывает на ковалентное присоединение к остатку антитела MEF.

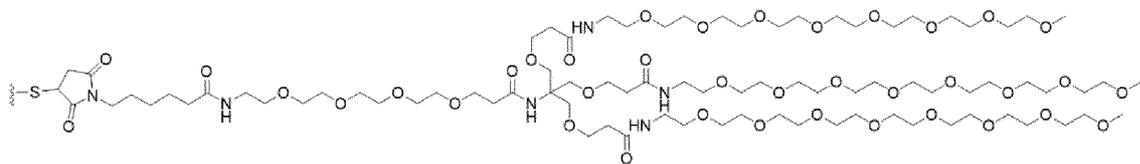
В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ и расщепляемый фрагмент вместе с атомом серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF имеют структуру согласно любой из формул (IIIа)-(IIIг):



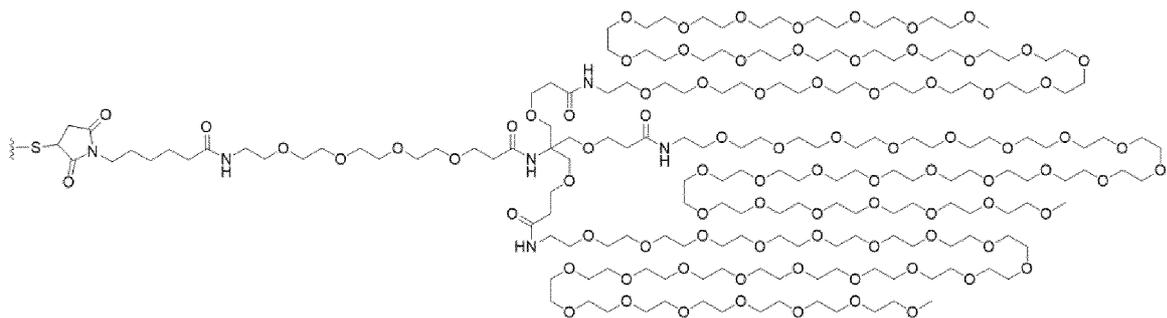
(IIIа),



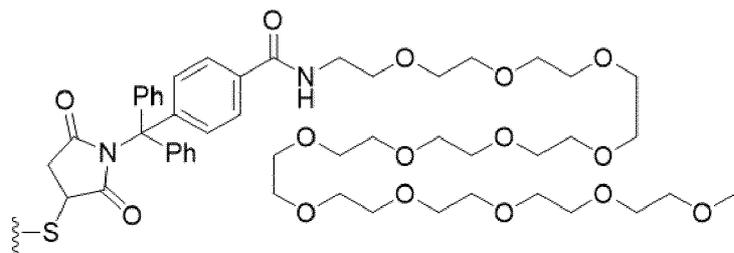
(IIIb),



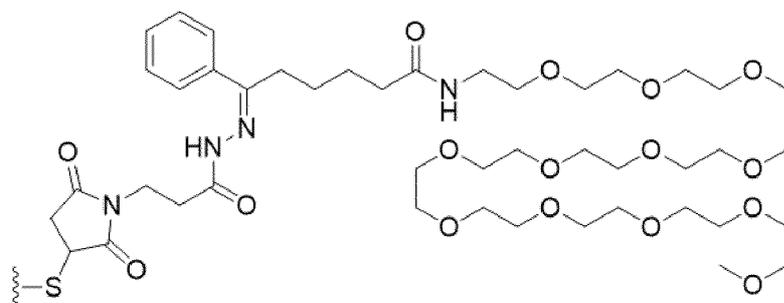
(IIIc),



(III d),

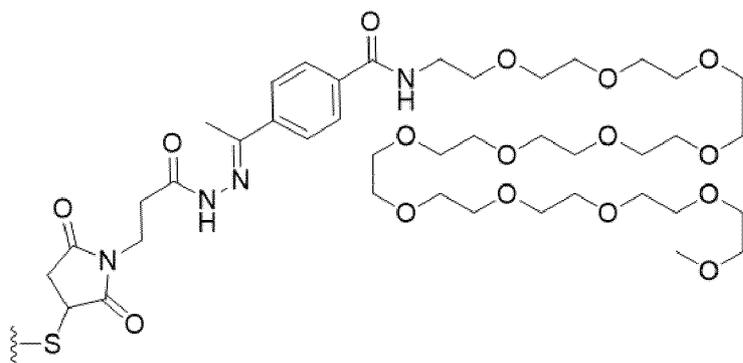


(IIIe),



(III f)

и



(IIIg);

где  $\sim$  указывает на ковалентное присоединение к остальной части цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF.

В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор присутствует на мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc-рецептор гамма Ша. В некоторых вариантах осуществления PBMC представляет собой естественную клетку-киллер. В некоторых вариантах осуществления PBMC обогащена плазмой нормального донора. В некоторых вариантах осуществления нормальный донор представляет собой человека, имеющего генотип Fc-гамма-рецептора III 158 V/V. В некоторых вариантах осуществления снижение связывания Fc-рецептора определяется конкурентным связыванием антитела MEF и меченого Fc-фрагмента IgG, соответствующего изотипу, с ортогонально меченым Fc-рецептором. В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент IgG представляет собой меченый соответствующий изотипу Fc-домен человеческого антитела IgG<sub>1</sub>. В некоторых вариантах осуществления метка Fc-фрагмента IgG, соответствующего изотипу, включает флуорофор. В некоторых вариантах осуществления меченый Fc-фрагмент IgG, соответствующий изотипу, иммобилизован на твердой подложке. В некоторых вариантах осуществления ортогональная метка Fc-рецептора включает биотин. В некоторых вариантах осуществления изоформа Fc-рецептора представляет собой Fc гамма Ша или гамма Шб. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция, которая снижается по сравнению с эквивалентным антителом при введении субъекту антитела MEF, представляет собой антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). В некоторых вариантах осуществления субъектом, которому вводят антитело MEF, является человек. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF представляет собой антитело IgG<sub>1</sub>. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF имеет одну или более мутаций в области Fc; при этом антитело MEF, имеющее одну или более мутаций, обладает более высокой эффекторной функцией по сравнению с эквивалентным антителом. В некоторых

вариантах осуществления антитело MEF представляет собой антитело IgG<sub>1</sub>; и одна или более мутаций в области Fc выбраны из группы, состоящей из S298A, E333A, K334A, S239D, I332E, G236A, S239E, A330L, I332E, G236A, S239D, I332E, G236A, L234Y, G236W, S296A, F243, R292P, Y300L, V305L и P396L.

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF связывается с раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF связывается с иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF связывается с CD40 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело включает ритуксимаб, обинутузумаб, офатумумаб, трастузумаб, алемтузумаб, могамулизумаб, цетуксимаб или динутуксимаб. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности с SEQ ID NO: 890. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности с SEQ ID NO: 891. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 890. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 891. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF имеет константу диссоциации не более 500 нМ для CD40 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF имеет константу диссоциации не более 10 нМ для CD40 человека.

В некоторых вариантах осуществления, когда антитело MEF вводят в популяцию клеток, содержащую одну или более клеток-мишеней, связывание антитела MEF с одной или более клетками-мишенями обеспечивает зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов по сравнению с уровнями периферических цитокинов, обеспечиваемыми путем связывания эквимольного количества эквивалентного антитела. В некоторых вариантах осуществления зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется начальным снижением по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах осуществления зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется начальным снижением по меньшей мере на около 80%. В некоторых вариантах осуществления зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется восстановлением уровней периферических цитокинов до по меньшей мере около 50% по сравнению с эквимольным количеством эквивалентного антитела через период от около 48 часов до около 96 часов. В некоторых вариантах осуществления зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется восстановлением уровней периферических цитокинов до около 100% по сравнению с эквимольным количеством эквивалентного антитела через период от около 48 часов до около 96 часов. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток представляет собой биологический образец; и при этом зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется

начальным снижением уровней периферических цитокинов в супернатанте биологического образца по сравнению с эквимоллярным количеством эквивалентного антитела. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток находится у субъекта; и при этом уровни периферических цитокинов представляют собой системные уровни цитокинов в плазме субъекта. В некоторых вариантах осуществления, когда антитело MEF вводят в популяцию клеток, содержащую одну или более клеток-мишеней, связывание антитела MEF с одной или более клетками-мишенями обеспечивает первоначальное снижение скорости лизиса клеток одной или более клеток-мишеней относительно скорости лизиса клеток, обеспечиваемой связыванием эквимоллярного количества эквивалентного антитела. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток представляет собой биологический образец. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток находится у субъекта. В некоторых вариантах осуществления одна или более клеток-мишеней включает раковые клетки, содержащие антигены, или иммунные клетки, содержащие антигены. В некоторых вариантах осуществления клетки-мишени являются мечеными радиоактивным изотопом. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток дополнительно содержит нормальные РВМС. В некоторых вариантах осуществления нормальные РВМС включают естественные клетки-киллеры.

В некоторых вариантах осуществления введение антитела MEF субъекту обеспечивает снижение  $C_{\max}$  цитокина на около 20-75% по сравнению с введением эквимоллярного количества эквивалентного антитела. В некоторых вариантах осуществления введение антитела MEF субъекту обеспечивает по существу такую же общую  $AUC_{0-\infty}$  антитела по сравнению с введением эквимоллярного количества эквивалентного антитела.

Аспекты настоящего изобретения обеспечивают композицию, содержащую распределение антител MEF, как раскрыто в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит единичную дозу распределения антител MEF. В некоторых вариантах осуществления единичная доза не повышает системные уровни хемотаксического белка-1 моноцитов (MCP-1), фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ), интерлейкина 1 бета (IL1B), интерлейкина 6 (IL6) или интерлейкина 10 (IL10) более чем в 10 раз относительно уровней до введения. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Аспекты настоящего изобретения обеспечивают композицию, содержащую первую популяцию антител MEF; вторую популяцию антител MEF; и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель; при этом ВРМ, присутствующие в первой популяции антител MEF, отличаются от ВРМ, присутствующих во второй популяции антител MEF.

Аспекты настоящего изобретения обеспечивают композицию, содержащую первую популяцию антител MEF; вторую популяцию антител MEF; и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель; при этом расщепляемые фрагменты,

присутствующие в первой популяции антител MEF, отличаются от расщепляемых фрагментов, присутствующих во второй популяции антител MEF.

В некоторых вариантах осуществления единственным активным ингредиентом в композиции является антитело MEF. В некоторых вариантах осуществления процент агрегации антитела MEF в композиции увеличивается примерно в 1-1,1 раза по сравнению с эквивалентным антителом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% антител распределения MEF-антител являются афукозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% антител из множества антител MEF являются афукозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 98% антител распределения MEF-антител являются афукозилированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 98% антител из множества антител MEF являются афукозилированными.

Аспекты настоящего изобретения обеспечивают способ лечения состояния у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает: введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), которое содержит модификацию, уменьшающую эффекторную функцию, и такая модификация, уменьшающая эффекторную функцию, по меньшей мере частично обратима в физиологических условиях; и лечение состояния при поддержании системного уровня цитокина или маркера воспаления не более чем в 10 раз выше уровня до введения.

В некоторых вариантах осуществления цитокин или маркер воспаления представляет собой хемотаксический белок-1 моноцитов (MCP-1), воспалительный белок-1 макрофагов (MIP-1 $\beta$ ), фактор некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), гамма-интерферон (IFN- $\gamma$ ), агонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA), интерлейкин 1 бета (IL1B), интерлейкин 6 (IL6), интерлейкин 10 (IL10) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления цитокин или маркер воспаления представляет собой хемотаксический белок-1 моноцитов (MCP-1), воспалительный белок-1 макрофагов (MIP-1 $\beta$ ), агонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA) или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления модификация включает расщепляемый биосовместимый полимерный фрагмент (BPM), ковалентно присоединенный к аминокислотному остатку, или посттрансляционную модификацию антитела MEF. В некоторых вариантах осуществления до расщепления BPM антитело MEF обладает от 2% до 20% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишённого BPM. В некоторых вариантах осуществления через 192 часа после введения антитело MEF имеет от 30% до 70% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишённого BPM. В некоторых вариантах осуществления скорость клиренса антитела MEF составляет от 25% до 200% от скорости расщепления BPM. В некоторых вариантах осуществления модификация, которая снижает эффекторную функцию антитела MEF, снижает аффинность связывания Fc $\gamma$ RIII антитела MEF.

Аспекты настоящего изобретения обеспечивают способ снижения тяжести реакции, связанной с инфузией, у субъекта, связанной с антителом, включающий внутривенное

введение субъекту композиции, соответствующей настоящему изобретению; где антитело эквивалентно антителу MEF композиции; и при этом тяжесть реакции, связанной с инфузией, снижается с 1 до 4 единиц по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества антитела.

Аспекты настоящего изобретения обеспечивают способ снижения частоты и/или риска развития реакции, связанной с инфузией, у субъекта, связанной с антителом, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию, соответствующую настоящему изобретению; причем антитело эквивалентно антителу MEF композиции; и при этом частота и/или риск развития реакции, связанной с инфузией, снижается по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества эквивалентного антитела.

Аспекты настоящего изобретения обеспечивают способ уменьшения одного или более симптомов реакции, связанной с инфузией, у субъекта, связанной с антителом, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию, соответствующую настоящему изобретению; причем антитело эквивалентно антителу MEF композиции; при этом один или более симптомов реакции, связанной с инфузией, уменьшаются по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества эквивалентного антитела.

Аспекты настоящего изобретения обеспечивают способ снижения  $C_{max}$  активного антитела, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию, соответствующую настоящему изобретению; причем активное антитело эквивалентно антителу MEF композиции; и при этом  $C_{max}$  активного антитела после внутривенного введения композиции антител MEF снижается по сравнению с  $C_{max}$  после внутривенного введения эквимольного количества активного антитела.

Аспекты настоящего изобретения обеспечивают способ задержки максимального связывания антитела с Fc-гамма-рецептором IIIa у субъекта, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию, соответствующую настоящему изобретению; причем антитело эквивалентно антителу MEF композиции; и при этом антитело MEF задерживает связывание с Fc-гамма-рецептором IIIa по сравнению с антителом.

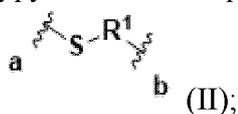
Аспекты настоящего изобретения обеспечивают способ селективного увеличения связывания антитела с Fc-гамма-рецептором IIIa в клетке-мишени у субъекта, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию, соответствующую настоящему изобретению; где антитело эквивалентно антителу MEF композиции; и где соотношение антитела MEF (i), связанного с Fc-гамма-рецептором IIIa в клетке-мишени, и (ii) системно связанного с Fc-гамма-рецептором IIIa, увеличивается по сравнению с соотношением антитела (i), связанного с Fc-гамма-рецептором IIIa в клетке-мишени и (ii) системно связывается с Fc-гамма-рецептором IIIa.

Аспекты настоящего изобретения обеспечивают способ снижения системной активации Fc-гамма-рецептора IIIa у субъекта после введения антитела, включающий

внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию, соответствующую настоящему изобретению; причем антитело эквивалентно антителу MEF композиции; и при этом введение антитела MEF обеспечивает сниженную системную активацию Fc-гамма-рецептора IIIa по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества антитела.

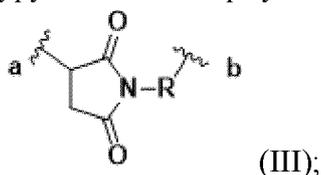
Аспекты настоящего изобретения обеспечивают способ снижения системной продукции цитокинов у субъекта после введения антитела, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию, соответствующую настоящему изобретению; причем антитело эквивалентно антителу MEF композиции; и при этом введение композиции, содержащей антитело MEF, снижает системную продукцию цитокинов по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества антитела.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно Формуле (II):



при этом по меньшей мере около 10% ВРМ отщепляются от антитела MEF в течение около 12 часов и по меньшей мере около 25% ВРМ отщепляются от антитела MEF в течение 48 часов после внутривенного введения.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно Формуле (III):



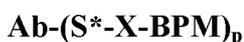
при этом около 10% ВРМ отщепляются от антитела MEF в течение около 12 часов и около 25% ВРМ отщепляются от антитела MEF в течение 48 часов после внутривенного введения.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 10% ВРМ отщепляются от антитела MEF в течение около 12 часов и по меньшей мере около 30% ВРМ отщепляются от антитела MEF в течение 48 часов после внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 20% ВРМ отщепляются от антитела MEF в течение около 12 часов и по меньшей мере около 40% ВРМ отщепляются от антитела MEF в течение 48 часов после внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 30% ВРМ отщепляются от антитела MEF в течение около 12 часов и по меньшей мере около 50% ВРМ отщепляются от антитела MEF в течение 48 часов после внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 50% ВРМ отщепляются от антитела MEF в течение около 12 часов и около 100% ВРМ отщепляются от антитела MEF в течение 48 часов после внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 50% ВРМ

отщепляются от антитела MEF в течение около 12 часов.

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF представляет собой терапевтическое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF выбрано из группы, состоящей из ритуксимаба, обинутумаба, офатумаба, трастузумаба, алемтузумаба, могамулизумаба, цетуксимаба и динутуксимаба.

Аспекты настоящего изобретения относятся к антителу MEF, имеющему структуру:



где:

каждый S\* представляет собой атом серы из остатка цистеина восстановленного межцепочечного дисульфида антитела MEF;

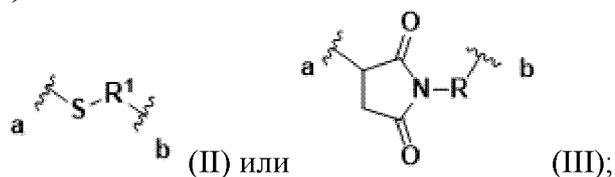
каждый X представляет собой расщепляемый фрагмент; каждый BPM представляет собой фрагмент полиэтиленгликоля, поликетальный фрагмент, полиглицериновый фрагмент, полисахаридный фрагмент, полисаркозиновый фрагмент, полипептидный фрагмент или полицивтерийонный фрагмент;

нижний индекс p равен 2, 4, 6 или 8; и

Ab представляет собой оставшуюся часть антитела.

В некоторых вариантах осуществления каждый X ковалентно присоединен к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемую дисульфидную связь или через расщепляемую тиоэфирную связь с негидролизованным сукцинимидным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления каждый X ковалентно присоединен к атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемую тиоэфирную связь. В некоторых вариантах осуществления каждый X ковалентно присоединен к атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемую дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления каждый X содержит структуру формулы (II) или (III):



где:

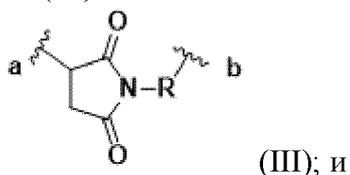
R<sup>1</sup> представляет собой C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкилен, необязательно прерванный одним из -NH-, C(=O)-, -C(=O)NH-, -NH- и -O-;

R отсутствует или представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкилен, необязательно прерванный одним или двумя фенилами, -NH-C(=O)-, -C(=O)NH-, -NH-, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)O-, -S-C(=O)-, -C(=O)S-, -O-C(=O)O-, -C(=NR<sup>1A</sup>), ацеталем, -O(SO<sub>2</sub>)O-, -O-[P(=O)(-OH)]O-, -C(=N-OH)-, -C(=N-NH<sub>2</sub>)-, и -C(R<sup>1A</sup>)=N-NH-; а R необязательно замещен 1-3 заместителями, независимо выбранными из фенила, оксо и -CO<sub>2</sub>R<sup>A</sup>; C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкилена; а фенил, необязательно замещенный 1-3 независимо выбранными C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> алкокси;

каждый  $R^A$  независимо представляет собой водород или  $C_1-C_6$  алкил;  
 каждый  $R^{1A}$  независимо представляет собой водород или  $C_1-C_6$  алкил;  
 где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к остатку цистеина  
 восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и

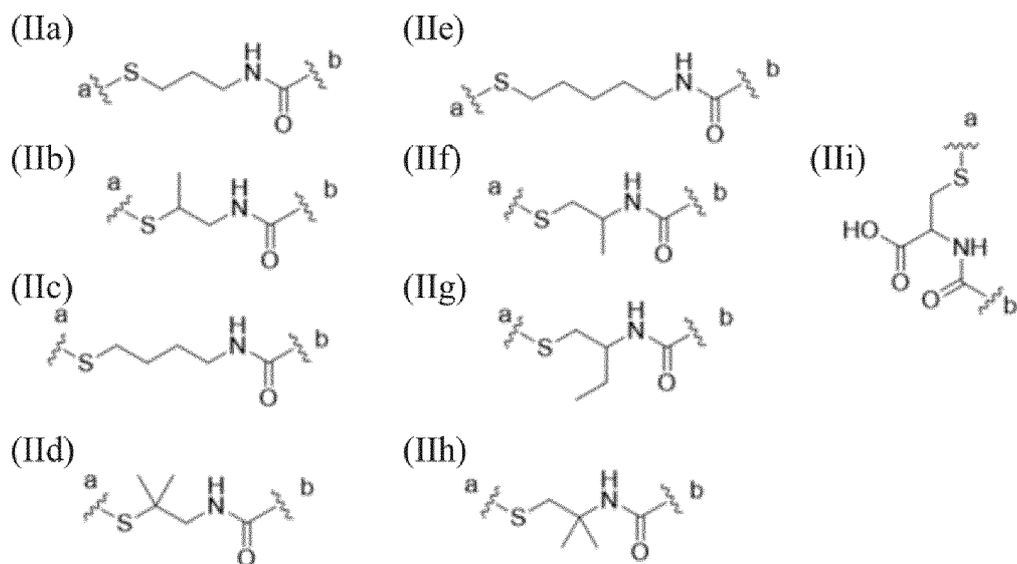
$\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение к ВРМ или оставшейся части  
 X, которая сохраняет ковалентное присоединение к ВРМ.

В некоторых вариантах осуществления каждый X содержит структуру согласно  
 Формуле (III):



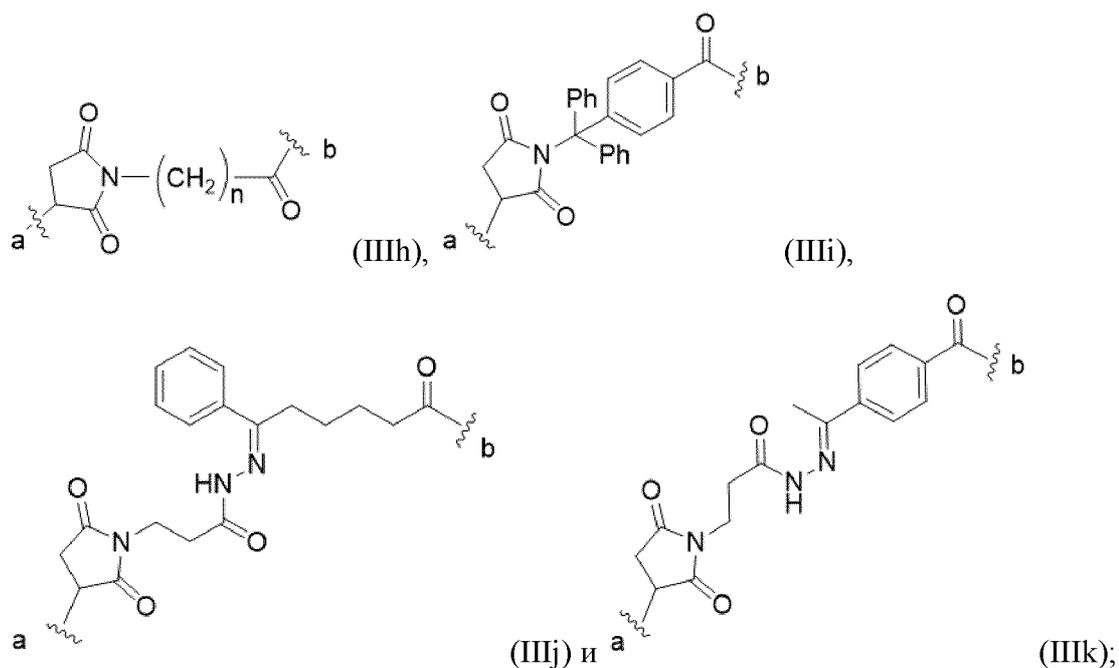
где R представляет собой  $C_1-C_{12}$  алкилен, прерванный  $-C(=N-NH_2)-$  или  $-C(R^{1A})=N-NH-$ ; или прерванный фенилом и одним из  $-C(=N-NH_2)-$  и  $-C(R^{1A})=N-NH-$ .

В некоторых вариантах осуществления каждый X содержит структуру согласно  
 любой из формул (IIa)-(III):



где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы остатка  
 цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и  $\sim$  (b)  
 представляет собой ковалентное присоединение X к ВРМ.

В некоторых вариантах осуществления каждый X содержит структуру согласно  
 любой из формул (IIIh)-(IIIk):

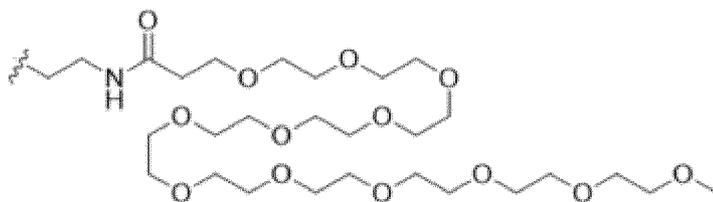


где индекс  $n$  представляет собой целое число от 2 до 8; и  
 где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и  $\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение X к BPM.

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF имеет структуру:



где каждый фрагмент BPM имеет структуру согласно формуле (IVa):



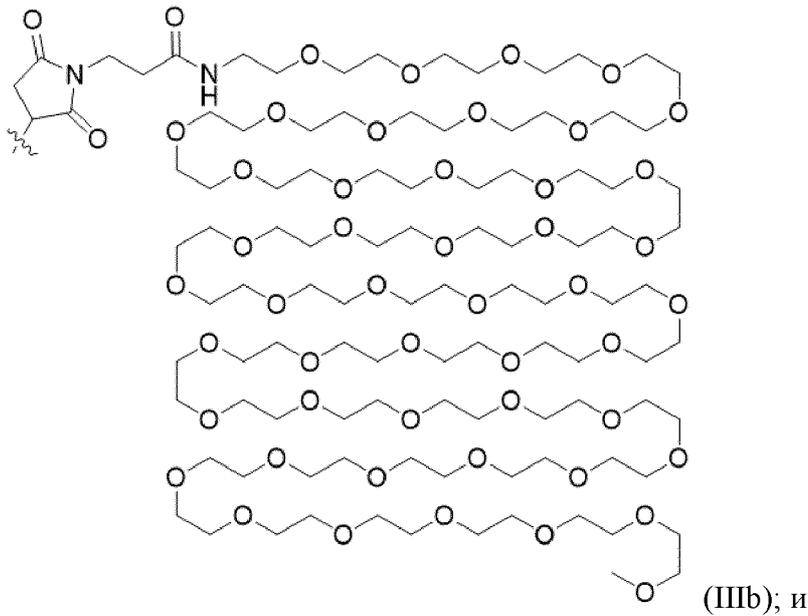
(IVa); и

где  $\sim$  представляет собой ковалентное присоединение к расщепляемому фрагменту.

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF имеет структуру:



где каждый фрагмент -X-BPM имеет структуру согласно формуле (IIIb):

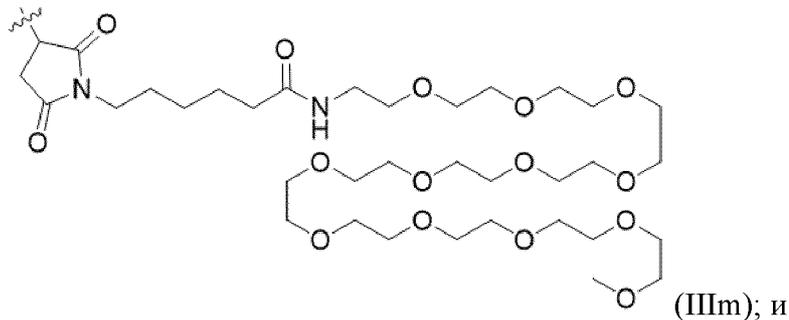


где  $\sim$  представляет собой ковалентное присоединение к  $S^*$ .

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF имеет структуру:

**Ab-(S\*-X-BPM)<sub>p</sub>**

где каждый фрагмент -X-BPM имеет структуру согласно формуле (IIIм):



где  $\sim$  представляет собой ковалентное присоединение к  $S^*$ .

В настоящем документе предложены антитела, имеющие биосовместимые полимерные фрагменты (BPM), ковалентно присоединенные посредством расщепляемых фрагментов, обеспечивающие регулируемую степень взаимодействия Fc-рецептора. Полученные антитела первоначально демонстрируют снижение связывания с Fc-рецептором при введении, но с течением времени демонстрируют увеличение аффинности с Fc-рецептором.

Некоторые варианты осуществления относятся к антителу MEF, где антитело MEF имеет 1, 2, 3 или 4 восстановленные межцепочечные дисульфидные связи и 2, 4, 6 или 8 биосовместимых полимерных фрагментов (BPM) соответственно; где каждый BPM ковалентно присоединен к каждому атому серы каждого остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемый фрагмент; и при этом антитело MEF демонстрирует зависящее от времени снижение связывания FcR и, таким образом, соответствующее зависящее от времени снижение эффекторной функции по сравнению с функцией эквивалентного антитела.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая распределение антител MEF, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитела MEF данного распределения отличаются прежде всего количеством ковалентно присоединенных ВРМ.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая первую популяцию композиции антитела MEF; вторую популяцию антитела MEF; и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель; при этом ВРМ, присутствующие в первой популяции антител MEF, отличаются от ВРМ, присутствующих во второй популяции антител MEF.

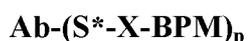
В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая первую популяцию композиции антитела MEF; вторую популяцию композиции антител MEF; и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель; при этом расщепляемые фрагменты, присутствующие в первой популяции антител MEF, отличаются от расщепляемых фрагментов, присутствующих во второй популяции антител MEF.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения тяжести реакции, связанной с инфузией, у субъекта, связанной с антителом, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей антитело MEF; при этом тяжесть реакции, связанной с инфузией, снижается с 1 до 4 единиц по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества антитела; и при этом антитело эквивалентно антителу MEF.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения частоты и/или риска развития реакции, связанной с инфузией, у субъекта, связанной с антителом, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей антитело MEF; причем антитело эквивалентно антителу MEF; и при этом частота и/или риск развития реакции, связанной с инфузией, снижается по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества антитела.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ уменьшения одного или более симптомов реакции, связанной с инфузией, у субъекта, связанной с антителом, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей антитело MEF; причем антитело эквивалентно антителу MEF; и при этом один или более симптомов реакции, связанной с инфузией, уменьшаются по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества антитела.

В некоторых вариантах осуществления предложено антитело MEF, имеющее структуру:



где: каждый S\* представляет собой атом серы из остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; каждый X представляет собой расщепляемый фрагмент; каждый ВРМ представляет собой фрагмент полиэтиленгликоля, поликетальный фрагмент, полиглицериновый фрагмент, полисахаридный фрагмент, полисаркозиновый фрагмент, полипептидный фрагмент или полицвиттерионный

фрагмент; нижний индекс  $p$  равен 2, 4, 6 или 8; и  $Ab$  представляет собой оставшуюся часть антитела.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения  $C_{max}$  активного антитела, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей антитело MEF;

причем активное антитело эквивалентно антителу MEF; при этом  $C_{max}$  активного антитела после внутривенного введения композиции антител MEF снижается по сравнению с  $C_{max}$  после внутривенного введения эквимольного количества активного антитела.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ задержки максимального связывания антитела с Fc-гамма-рецептором IIIa, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей антитело MEF, субъекту, нуждающемуся в этом; причем антитело эквивалентно антителу MEF; и при этом антитело MEF задерживает связывание с Fc-гамма-рецептором IIIa по сравнению с антителом.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ селективного увеличения связывания антитела с Fc-гамма-рецептором IIIa в клетке-мишени у субъекта, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей антитело MEF; причем антитело эквивалентно антителу MEF; и при этом соотношение антитела MEF (i), связанного с Fc-гамма-рецептором IIIa в клетке-мишени, и (ii) системно связанного с Fc-гамма-рецептором IIIa, увеличивается по сравнению с соотношением антитела (i), связанного с Fc-гамма-рецептором IIIa в клетке-мишени и (ii) системно связанного с гамма-рецептором Fc IIIa.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения активации системного Fc-гамма-рецептора IIIa у субъекта после введения антитела, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей антитело MEF, причем антитело эквивалентно антителу MEF; и при этом введение антитела MEF обеспечивает сниженную системную активацию Fc-гамма-рецептора IIIa по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества антитела.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения системной продукции цитокинов у субъекта после введения антитела, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей антитело MEF; причем антитело эквивалентно антителу MEF; и при этом введение композиции, содержащей антитело MEF, снижает системную продукцию цитокинов по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества антитела.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ селективной активации антитела, включающий внутривенное введение композиции, содержащей распределение антител MEF; при этом по меньшей мере около 10% BPM отщепляются от антитела MEF в течение около 12 часов и по меньшей мере около 25% BPM отщепляются от антитела MEF в течение 48 часов.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ селективной активации антитела, включающий внутривенное введение композиции, содержащей распределение антител MEF; при этом по меньшей мере около 25% BPM отщепляются от антитела MEF в

течение около 12 часов и по меньшей мере около 75% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 24 часов.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ селективной активации антитела, включающий внутривенное введение композиции, содержащей распределение антител МЕФ; при этом от около 25% до около 75% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 48 часов.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ селективной активации антитела, включающий внутривенное введение композиции, содержащей распределение антител МЕФ; при этом от около 25% до около 75% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 72 часов.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**На фиг. 1А-В** показана стабильность модифицированных антител анти-CD40-AF-12 (**фиг. 1А**) и анти-CD40-AF-1 (**фиг. 1В**) в плазме крыс по данным анализа капиллярного гель-электрофореза WES.

**На фиг. 2** показана активность FcγRIIIa NFAT и значения EC<sub>50</sub> различных модифицированных антител (анти-CD40-WT, анти-CD40-AF, анти-CD40-AF-10, анти-CD40-AF-14, анти-CD40-AF-15 и анти-CD40-AF-17) по сравнению с контрольным hIgG1k.

**На фиг. 3А-С** показаны три временных изменения активности FcγRIIIa NFAT модифицированных антител (анти-CD40-WT, анти-CD40-AF, анти-CD40-AF-1, анти-CD40-AF-12, анти-BCMA-WT, анти-BCMA-AF и анти-BCMA-AF-12) по сравнению с контрольным hIgG1k в плазме крыс (время в часах).

**На фиг. 4** показана насыщенное связывание различных модифицированных антител (анти-TIGIT-WT, анти-TIGIT-AF, анти-TIGIT-null Fc, анти-TIGIT-AF-1 и анти-TIGIT-AF-12) с клетками CHO, экспрессирующими человеческий FcγRIIIa.

**На фиг. 5А-Д** показана цитокиновая активность PBMC человека, которым вводили различные модифицированные антитела (анти-CD40-WT, анти-CD40-AF, анти-CD40-AF-NEM, анти-CD40-AF-12 и анти-CD40-AF-19) по сравнению с контролем hIgG1k. Цитокиновую активность измеряли для IP-10 (**фиг. 5А**), MIP-1b (**фиг. 5В**), TNFα (**фиг. 5С**) и MIP-1a (**фиг. 5Д**).

**На фиг. 6А-Д** показана продукция цитокинов через 2, 8, 24, 48, 72 часа после введения дозы у мышей с трансгенным человеческим CD40, обработанных различными модифицированными антителами (анти-CD40-WT, анти-CD40-AF, анти-CD40-AF-9, анти-CD40-AF-10, анти-CD40-AF-12) по сравнению с необработанной мышью. Продукция цитокинов измеряли для MCP-1 (**фиг. 6А**), KC (**фиг. 6В**), IP-10 (**фиг. 6С**) и MIP-1b (**фиг. 6Д**).

**На фиг. 7А-В** показана продукция цитокинов через 2, 8, 24, 48, 72 часа после введения дозы у мышей с трансгенным человеческим CD40, обработанных различными модифицированными антителами (анти-CD40-WT, анти-CD40-AF, анти-CD40-AF-1, анти-CD40-AF-2 и анти-CD40-AF-9) по сравнению с необработанной мышью. Продукцию цитокинов измеряли для MCP-1 (**фиг. 7А**) и IP-10 (**фиг. 7В**).

**На фиг. 8А-В** показана активность FcγRIIIa NFAT различных модифицированных антител (анти-CD40-WT, анти-CD40-AF, анти-CD40-AF-NEM 4 нагрузки, анти-CD40-AF-1 с 2, 4 и 6 нагрузками (фиг. 8А) и анти-CD40-AF-12 с нагрузкой 2, 4, 5, 6, 7 и 7,5) (фиг. 8В) по сравнению с контрольным hIgG1k.

**На фиг. 9А-В** показана активность FcγRIIIa NFAT различных модифицированных антител: обинитумаб-WT, обинитумаб-AF и обинитумаб-AF-12 на **фиг. 9А**; и ритуксимаб, и ритуксимаб-AF, и ритуксимаб-AF-12 на **фиг. 9В**; по сравнению с контролем hIgG1k.

**На фиг. 10** показаны данные среднего объема опухоли *in vivo* для различных модифицированных антител (анти-TIGIT-WT, анти-TIGIT-AF, анти-TIGIT-null Fc, анти-TIGIT-AF-1 и анти-TIGIT-AF-12) в модели сингенной опухоли мыши с подкожными опухолями CT26WT.

**На фиг. 11** показаны данные среднего объема опухоли *in vivo* для различных модифицированных антител (анти-CD40-WT, анти-CD40-AF, анти-CD40-AF-1, анти-CD40-AF-9 и анти-CD40-AF-12) в модели опухоли мыши с подкожными опухолями A20.

**На фиг. 12** показаны результаты анализа связывания FcγIIIa с антителами, содержащими PEG и функционализации олигопептид-PEG.

**На фиг. 13** обобщены изменения в соотношении олигомеров PEG и антител после введения крысам.

**На фиг. 14** показан обзор активности CD16a функционализированных PEG12 антител в различные моменты времени после введения дозы крысам.

**На фиг. 15А-Д** обобщены результаты анализов связывания CD16a для нескольких концентраций антител с различными комбинациями модификаций S239D, A330L, I332E и PEG BPM. **На фиг. 15А-В** предложены результаты для антител с и без PEG12. **На фиг. 15С** представлены результаты для двойных мутантов S239D I332E с функционализацией PEG12 и без нее. **На фиг. 15Д** представлены результаты для тройных мутантов S239D A330L I332E с функционализацией PEG12 и без нее.

**На фиг. 16** обобщены уровни MCP-1 у яванских макаков до (ось X «Pre») и после введения неПЭГилированных (анти-CD40-SEA) и ПЭГилированных (анти-CD40-SEA-МС-PEG12) антител.

**На фиг. 17** обобщены уровни антител у яванских макаков после введения неПЭГилированных (анти-CD40-SEA) и ПЭГилированных (анти-CD40-SEA-МС-PEG12) антител.

**На фиг. 18** обобщены уровни В-клеток у яванских макаков после введения неПЭГилированных (анти-CD40-SEA) и ПЭГилированных (анти-CD40-SEA-МС-PEG12) антител.

**На фиг. 19** обобщены уровни MIP-1β у яванских макаков до (ось X «Pre») и после введения неПЭГилированных (анти-CD40-SEA) и ПЭГилированных (анти-CD40-SEA-МС-PEG12) антител.

**На фиг. 20** обобщены уровни IL-1RA у яванских макаков до (ось X «Pre») и после

введения неПЭГилированных (анти-CD40-SEA) и ПЭГилированных (анти-CD40-SEA-МС-PEG12) антител.

**На фиг. 21** описана активность антитела MEF в соответствии с аспектами настоящего изобретения.

**На фиг. 22** показано связывание ВРМ с тиолами, производными межцепочечной дисульфидной связи, антитела, в соответствии с настоящим изобретением.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

Токсичность антител *in vivo* часто связана с их фармакокинетикой и аффинностью к родственным Fc-рецепторам. Для многих методов лечения на основе антител эффекторные функции, опосредованные рецептором Fc, одновременно активируют иммунные реакции, необходимые для эффективности лечения, и вызывают системную токсичность, которая может ограничивать дозировку. В качестве средства контроля активации Fc-рецептора антитела, описанные в настоящем документе, могут включать расщепляемые биосовместимые полимерные фрагменты (ВРМ), которые уменьшают связывание Fc-рецептора в зависимости от времени. Во многих таких случаях полученные модулированные антитела первоначально демонстрируют снижение связывания с Fc-рецептором при введении, но со временем демонстрируют увеличение аффинности к Fc-рецептору.

После введения таких антител расщепляемые фрагменты, которые ковалентно связывают ВРМ с антителом MEF, со временем расщепляются. Расщепление расщепляемых фрагментов высвобождает ВРМ, фрагмент ВРМ и/или аддукт, образованный из части расщепляемого фрагмента и ВРМ. Таким образом, каждое событие расщепления устраняет препятствие связыванию Fc-рецептора, так что, когда все ВРМ высвобождаются, антитела могут взаимодействовать с Fc-рецептором по существу таким же образом, как эквивалентное антитело, лишенное ВРМ. Расщепляемые фрагменты могут быть выбраны так, чтобы обеспечить различные продолжительность и условия расщепления. Таким образом, эти антитела могут иметь увеличенный период полужизни по сравнению с традиционными терапевтическими антителами или эквивалентными антителами, не имеющими ВРМ, без необходимости длительных периодов инфузии. Этот подход может обеспечить настраиваемую активацию антител, а также настройку периода полужизни антитела, сохраняя при этом активность и уменьшая системное высвобождение цитокинов и сопутствующие ему побочные эффекты.

### **Определения**

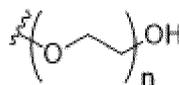
Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. В данном документе описаны способы и материалы для применения в настоящей заявке; также можно использовать другие подходящие способы и материалы, известные в данной области техники. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не подразумевают ограничения. Все публикации, заявки на патенты, патенты, последовательности, записи в

базах данных и другие ссылки, упоминаемые в данном документе, в полном объеме включены посредством ссылки. В случае противоречия настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Когда в данном документе используются торговые наименования, торговое наименование включает состав продукта, воспроизведенный лекарственный препарат и активный(е) фармацевтический(е) ингредиент(ы) продукта под этим торговым наименованием, если из контекста не следует иное.

Термин «биосовместимый полимерный фрагмент» (BPM), используемый в настоящем документе, относится к фрагменту полиэтиленгликоля, поликетальному фрагменту, полиглицериновому фрагменту, полисахаридному фрагменту, полисаркозиновому фрагменту, полипептидному фрагменту и/или полицивиттерионному фрагменту, как описано в настоящем документе. Во многих случаях BPM не включают полимерные группы, связанные с молекулами лекарственного средства. BPM могут быть монодисперсными, имея очень одинаковую степень полимеризации или относительной молекулярной массы (обычно очищаемой из гетерогенной смеси) или полидисперсными, содержащими полимерные цепи неравной длины и имеющими распределение молекулярных масс. Используемый в настоящем документе термин «полидисперсность» может обозначать отношение средневесовой молекулярной массы к среднечисленной молекулярной массе для совокупности BPM. Монодисперсные BPM могут иметь индекс полидисперсности около 1,0 (например, около 1,01, около 1,02, около 1,03, около 1,04, около 1,05, около 1,06, около 1,07, около 1,08, около 1,09, самое большее около 1,09, самое большее около 1,05, или самое большее около 1,03), в то время как полидисперсные BPM могут иметь индекс полидисперсности по меньшей мере 1,10 (например, по меньшей мере около 1,10, по меньшей мере около 1,11, по меньшей мере около 1,12, по меньшей мере около 1,13, по меньшей мере около 1,14, по меньшей мере около 1,15, по меньшей мере около 1,16, по меньшей мере около 1,17, по меньшей мере около 1,18, по меньшей мере около 1,19, по меньшей мере около 1,20, по меньшей мере около 1,3, по меньшей мере около 1,4, по меньшей мере около 1,5, по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 2,5 или по меньшей мере около 3).

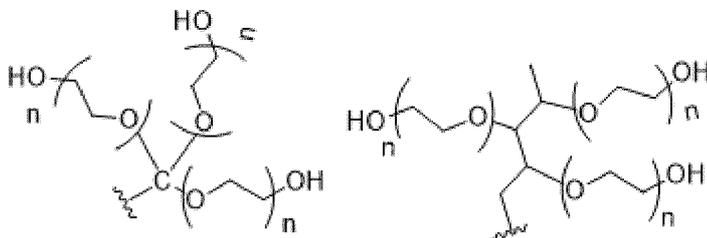
Термин «фрагмент полиэтиленгликоля» (PEG), используемый в настоящем документе, относится к полимеру, состоящему из повторяющихся звеньев этиленгликоля, которые могут быть с прямой или разветвленной цепью. Разветвленный фрагмент PEG может включать в себя основную цепь, такую как алкильная цепь. Во многих аспектах, раскрытых в настоящем документе, фрагмент PEG содержит от 2 до 100 мономеров этиленгликоля, обозначаемых, например, как PEG2- PEG100, PEG2-PEG20, PEG4-PEG40, PEG8-PEG60, PEG10-PEG80, PEG12-PEG100, PEG2-PEG20, PEG2-PEG12, PEG4-PEG20, PEG4-PEG12, PEG8-PEG20, PEG8-PEG12 или PEG20-PEG76. Размер фрагмента PEG также может быть выражен через его среднюю молекулярную массу, а не через определенное количество звеньев PEG, например, от около 100 Да до около 5000 Да. Фрагменты PEG с

прямой цепью могут быть представлены структурой,

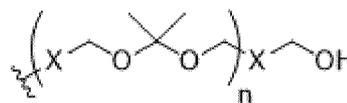


имеющей «n» звеньев

PEG. Разветвленный PEG может быть представлен следующими структурами, где «n» представляет количество единиц PEG:



Термин «поликетальный фрагмент», используемый в настоящем документе, относится к полимеру, состоящему из повторяющихся кетальных звеньев. Размер поликетального фрагмента может быть выражен числом кетальных звеньев (например, 2-20) или может быть выражен его средней молекулярной массой. Поликетали включают,

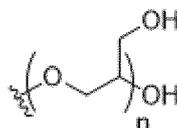


помимо прочего, поли(диметоксиацетонкеталь) и «n» звенья

, где

X представляет собой фенилен или циклогексилен, а «n» представляет собой количество кетальных звеньев.

Термин «полиглицериновая группировка», используемый в настоящем документе, относится к полимеру, состоящему из повторяющихся глицериновых звеньев. Полиглицериновые фрагменты могут быть неразветвленными или разветвленными и содержать от 2 до 48 глицериновых звеньев. Размер полиглицеринового фрагмента также можно выразить через его среднюю молекулярную массу, например, от около 160 Да до около 3600 Да. Полиглицериновые фрагменты могут быть  $\alpha$ -функционализированными,  $\omega$ -функционализированными или функционализированными по каркасу. Примером



полиглицеринового фрагмента является

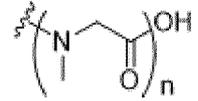
, где «n» представляет собой

количество глицериновых единиц.

Термин «полисахаридный фрагмент», используемый в настоящем документе, относится к цепи независимо выбранных сахаридных единиц. Полисахаридный фрагмент может быть неразветвленным или разветвленным и может содержать одну или более гликозидных связей  $\alpha$ -1,4, гликозидных связей  $\beta$ -1,4, гликозидных связей  $\alpha$ -1,6, гликозидных связей  $\beta$ -1,6 и гликозидных связей  $\alpha$ -1,  $\beta$ -2. Типичные мономеры сахаридов включают, помимо прочего, глюкозу, фруктозу, галактозу, арабинозу, рибозу, гулозу, маннозу, фукозу, рамнозу и их комбинации. Полисахаридные фрагменты могут содержать

от 2 до 12 сахаридных звеньев, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 сахаридных звеньев, и/или могут иметь массу от около 350 дальтон до около 3 500 дальтон.

Термин «полисаркозиновый фрагмент», используемый в настоящем документе, относится к полимеру, содержащему повторяющиеся звенья саркозина (N-метилглицина). В некоторых случаях полисаркозиновый фрагмент может содержать от 2 до 36 отдельных саркозиновых звеньев и/или иметь массу от около 250 дальтон до около 3 000 дальтон. В



некоторых случаях фрагменты полисаркозина могут быть представлены как  $(N(CH_3)CH_2COOH)_n$ , где «n» представляет количество единиц саркозина.

Термин «полипептидный фрагмент», используемый в настоящем документе, относится к разветвленной или неразветвленной цепи независимо выбранных аминокислот (включая природные и неприродные аминокислоты). Примеры аминокислот включают аргинин, гистидин, лизин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, серин, треонин, аспарагин, глутамин, цистеин, глицин, пролин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, тирозин, триптофан, орнитин, цитруллин и бета-аланин. Полипептидные фрагменты могут содержать от 4 до 60, от 10 до 50 или от 10 до 30 отдельных аминокислот и/или иметь массу от около 500 дальтон до около 7 000 дальтон. Полипептидные фрагменты можно представить в виде  $-(AA)_n-$  где «n» представляет количество аминокислот.

Термин «полицвиттерионный фрагмент», используемый в настоящем документе, относится к полимерам, которые несут в своей структурной повторяющейся единице одинаковое количество анионных и катионных групп, так что каждый полицвиттерионный фрагмент имеет чистый нулевой заряд при физиологическом pH, например, бетаин или группы на основе холина, такие как поликарбоксібетаин и карбоксібетаинакриламид. См. Laschewsky, *Polymers* 2014: 6; 1544-1601 и Zhang, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 112, No. 39, pp. 12046-12051 (2015), каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Полицвиттерионные фрагменты могут содержать от 2 до 100 мономеров и/или иметь массу от около 300 до около 5 000 дальтон.

«Физиологический pH», используемый в настоящем документе, может относиться к pH от около 7,3 до около 7,5.

Термин «расщепляемый фрагмент», используемый в настоящем документе, относится к химической группировке, которая расщепляется в физиологических условиях. Расщепляемый фрагмент может расщепляться при множестве физиологических условий, например, в различных местах или микроокружениях внутри человеческого тела, или при специфическом физиологическом состоянии, таком как микроокружение опухоли. Расщепляемый фрагмент может соединять антитело и ВРМ, так что при расщеплении расщепляемого фрагмента ВРМ, к которому он присоединен, высвобождается из антитела. Во многих случаях расщепляемые фрагменты не содержат молекул лекарственного

средства и не присоединены к ним.

В контексте данного документа термин «гидролизуемая группа» может относиться к фрагменту, который подвергается спонтанному гидролитическому расщеплению при определенных условиях или диапазоне условий. Например, гидролизуемая группа может быть инертной в нейтральных и основных растворах, но может подвергаться гидролитическому расщеплению за дни, часы, минуты или секунды в кислых условиях. В некоторых случаях гидролизуемая группа сконструирована так, чтобы подвергаться гидролитическому расщеплению в конкретной физиологической среде, такой как кровь (например, периферическая кровь) или окислительные (например, лизосомальные) или восстановительные (например, цитоплазматические) внутриклеточные компартменты. В некоторых случаях гидролизуемая группа сконструирована для каталитического расщепления, например ферментами, присутствующими в конкретном организме (например, у человека) или конкретной ткани (например, метаболически активной ткани, такой как ткань печени, почки или головного мозга). Гидролизуемая группа может быть сконструирована для расщепления рядом ферментов или конкретным ферментом. Например, гидролизуемая группа может содержать олигопептид последовательности аргинин-аргинин-валин-аргинин, в отношении которого может иметь расщепляющую активность человеческий фурин. Гидролизуемая группа может быть сконфигурирована на расщепление в конкретной среде, такой как эндосомы или лизосомы клеток человека. В таких случаях гидролизуемая группа может быть стабильной за пределами среды, для расщепления в которой она сконструирована. Например, гидролизуемая группа может быть стабильной в кровотоке в периферической крови, но гидролитически расщепляться после поглощения клеткой. Примеры гидролизуемых групп включают дисульфиды, фосфорорганические соединения, такие как эфиры фосфорной кислоты, тиофосфаты и дитиофосфаты, карбаматы, карбонаты, тиоэфиры, четвертичные амины, мочевины, органосульфаты, диорганосульфаты, определенные амиды и сложные эфиры, а также пептиды с сайтами расщепления протеазами.

Термин «антитело», используемый в настоящем документе, охватывает интактные антитела, включая моноклональные антитела, поликлональные антитела, моноспецифические антитела и мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела). Термин «антитело» также может включать части антител или не встречающихся в природе конструкций, включая домены  $V_H$ , домены Fab, конструкции scFv, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела, а также их слитые и синтетические конструкции. Термин «антитело» может включать восстановленные формы антител и фрагменты антигенсвязывающих антител, в которых разорваны одна или несколько межцепочечных дисульфидных связей, которые проявляют желаемую биологическую активность и при условии, что фрагменты антигенсвязывающего антитела обладают как функциональным связыванием с Fc-рецептором, так и областью и необходимым количеством сайтов присоединения для желаемого количества присоединяемых ВРМ. Нативная форма антитела представляет собой тетрамер и состоит из двух идентичных пар цепей

иммуноглобулина, причем каждая пара имеет одну легкую цепь и одну тяжелую цепь. В каждой паре переменные домены легкой и тяжелой цепей (VL и VH) вместе отвечают главным образом за связывание с антигеном. Переменные домены легкой цепи и тяжелой цепи состоят из каркасной области, прерываемой тремя гиперпеременными областями, также называемыми «определяющими комплементарность областями» или «CDR». Константные области могут распознаваться иммунной системой и взаимодействовать с ней. (см., например, Janeway *et al.*, 2001, *Immuno. Biology, 5th Ed.*, Garland Publishing, New York). Антитело включает любой его изотип (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA) или подкласс (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2). Антитело получают от любого подходящего вида. В некоторых аспектах антитело имеет человеческое или мышинное происхождение, а в некоторых аспектах антитело представляет собой человеческое, гуманизированное или химерное антитело.

Термин «терапевтическое антитело», используемый в настоящем документе, относится к антителу, как описано в настоящем документе, которое служит для истощения клеток-мишеней для оказания терапевтического эффекта. Например, терапевтическое антитело может связываться с антигеном, присутствующим на клетке-мишени, таким как опухолеспецифический антиген, что в конечном итоге приводит к гибели этой клетки.

Термин «моноклональное антитело» в данном документе относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени однородных антител, то есть отдельные антитела в составе популяции являются идентичными, за исключением мутаций, происходящих по естественным причинам, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими и направлены против одного антигенного сайта. Определение «моноклональное» указывает на характер антитела, полученного из, по существу, однородной популяции антител, и не должно быть истолковано как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом.

«Интактное антитело» представляет собой антитело, которое содержит антигенсвязывающую переменную область, а также константные домены легкой цепи ( $C_L$ ) и константные домены тяжелой цепи  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  и  $C_{H4}$  в соответствии с классом антитела. Константные домены могут представлять собой константные домены с нативной последовательностью (например, человеческие константные домены человеческой с нативной последовательностью) или их варианты по аминокислотной последовательности.

«Фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, которая включает его антигенсвязывающую или переменную область. Фрагменты антител по настоящему изобретению включают по меньшей мере один остаток цистеина, который обеспечивает сайт для присоединения расщепляемого фрагмента и/или конструкции расщепляемого фрагмента-ВРМ. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела включает Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>.

«Антиген» представляет собой объект, с которым специфически связывается антитело.

«Антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF)» относится к антителу

(как описано в настоящем документе) с одной или более модификациями, которые влияют на его эффекторную функцию. Например, антитело MEF, раскрытое в настоящем документе, может содержать ВРМ или фрагменты одного или более ВРМ (например, часть расщепляемой молекулы, которая остается ковалентно присоединенной к антителу после расщепления), связанные с антителом по атому серы из остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела.

«Эквивалентное антитело» относится к антителу, которое по существу идентично соответствующему антителу MEF, но лишено восстановленных межцепочечных дисульфидных связей, расщепляемых фрагментов и ВРМ, присутствующих в антителе MEF.

Термин «зависящее от времени восстановление», используемый в настоящем документе, относится к уменьшению параметра, свойства и/или биологического процесса из исходного состояния, при этом восстановление обращается вспять с течением времени, так что исходное состояние частично или полностью восстанавливается. В контексте настоящего изобретения степень снижения аффинности связывания Fc-области MEF-антитела с родственным FcR антителом зависит от структуры и количества ВРМ, ковалентно присоединенных к антителу. Для определенной структуры ВРМ первоначальное снижение аффинности связывания FcR и, таким образом, начальное снижение эффекторной функции по сравнению с эффекторной функцией, обеспечиваемой эквивалентным антителом, становится больше по мере увеличения количества ВРМ, ковалентно присоединенных к антителу. Потеря ВРМ антитела MEF с течением времени, например, при воздействии антитела MEF на биологическую среду, связана с кинетикой, при которой аффинность связывания FcR частично или полностью восстанавливается до уровня эквивалентного антитела. Параметр, свойство и/или биологический процесс, связанный с эффекторной функцией, который также снижается по сравнению с его исходным состоянием, также испытывает зависящее от времени снижение, кинетика которого не обязательно совпадает с кинетикой аффинности связывания FcR.

Термины «специфическое связывание» и «специфически связывается» означают, что антитело или фрагмент антитела селективным образом связывается со своим соответствующим целевым антигеном, но не с множеством других антигенов. Как правило, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с аффинностью по меньшей мере около  $1 \times 10^{-7}$  М, например от  $10^{-8}$  М до  $10^{-9}$  М,  $10^{-10}$  М,  $10^{-11}$  М или  $10^{-12}$  М, и связывается с заданным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза превышает аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином), отличным от заданного антигена или близкородственного антигена.

Термин «максимальное связывание с Fc-гамма-рецептором» означает связывающее взаимодействие антитела с Fc-гамма-рецептором, необходимое для получения полного (например, 100%) или близкого к полному ответа от рецептора. Взаимодействие связывания антитела с Fc-гамма-рецептором можно задержать, уменьшить или иным образом модифицировать путем добавления одного или более ВРМ, как описано в

настоящем документе.

Термин «ингибировать» или «ингибирование» означает снижение на измеримое количество или полное предотвращение (например, 100% ингибирования).

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству описанного в настоящем документе антитела MEF, которое эффективно для лечения заболевания или расстройства у млекопитающего. Например, в случае рака терапевтически эффективное количество антитела MEF обеспечивает один или более из следующих биологических эффектов: уменьшение количества раковых клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирование (т.е. замедление до некоторой степени и предпочтительно прекращение) инфильтрации раковых клеток в периферические органы; ингибирование (т.е. замедление до некоторой степени и предпочтительно прекращение) метастазирования опухоли; ингибирование в некоторой степени роста опухоли; и/или облегчение в некоторой степени одного или более симптомов, связанных с раком. В случае противораковой терапии эффективность в некоторых аспектах определяют по оценке времени до прогрессирования заболевания (ВПЗ) и/или определения частоты ответа (ЧО).

Термины «рак» и «раковый» относятся к физиологическому состоянию или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. «Опухоль» содержит множество раковых клеток.

«Аутоиммунное расстройство» в настоящем документе представляет собой заболевание или расстройство, возникающее и направленное против собственных тканей или белков индивидуума.

Термин «субъект», используемый в настоящем документе, относится к индивидууму, которому вводят антитело MEF. Примеры «субъекта» включают, но не ограничиваются этим, млекопитающее, такое как человек, крыса, мышь, морская свинка, отличный от человека примат, свинья, коза, корова, лошадь, собака, кошка, птицу и домашнюю птицу. Как правило, субъект представляет собой крысу, мышь, собаку, отличного от человека примата или человека. В некоторых аспектах субъектом является человек, нуждающийся в терапевтически эффективном количестве антитела MEF.

Термины «лечить» или «лечение», если иное не указано или не подразумевается контекстом, относятся к терапевтическому лечению и профилактическим мерам для предотвращения рецидива, при этом целью является подавление или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, такого как, например, развитие или распространение рака. В целях настоящего изобретения благоприятные или необходимые клинические результаты включают, но не ограничиваются этим, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение состояния заболевания и ремиссию (частичную или полную), выявляемые или невыявляемые. В некоторых аспектах «лечение» также означает продление выживаемости

по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствие лечения. К нуждающимся в лечении относятся те, кто уже страдает этим состоянием или расстройством, а в некоторых аспектах также включают тех, кто склонен к такому состоянию или расстройству.

В контексте рака термин «лечение» включает любое или все из: ингибирования роста опухолевых клеток, раковых клеток или опухоли; ингибирования репликации опухолевых клеток или раковых клеток, уменьшения общей опухолевой нагрузки или уменьшения количества раковых клеток и облегчения одного или более симптомов, связанных с заболеванием.

В контексте аутоиммунного заболевания термин «лечение» включает любое или все из: ингибирования репликации клеток, связанных с состоянием аутоиммунного расстройства, включая, помимо прочего, клетки, которые продуцируют аутоиммунные антитела, уменьшения нагрузки аутоиммунных антител и улучшения одного или более симптомов аутоиммунного заболевания.

Термин «соль», используемый в настоящем документе, относится к органическим или неорганическим солям соединения, такого как ВРМ, например, описанного в настоящем документе, или антитела MEF, как описано в настоящем документе. В некоторых аспектах соединение содержит по меньшей мере одну аминокислотную группу, и, соответственно, с аминокислотной группой могут быть образованы соли добавления кислот. Типовые соли включают, но не ограничиваются этим, такие соли, как сульфат, трифторацетат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, *n*-толуолсульфонат и памоат (т. е. 1,1'-метиленабис-(2-гидрокси-3-нафтоат)). Соль может подразумевать включение другой молекулы, такой как ацетат-ион, сукцинат-ион или другой противоион. Противоион может быть любым органическим или неорганическим фрагментом, который стабилизирует заряд родительского соединения. Кроме того, соль может иметь один или более одного заряженного атома в структуре. В тех случаях, когда в состав кратной соли входит несколько заряженных атомов, иногда присутствуют противоионы. Следовательно, соль может иметь один или более заряженных атомов и/или один или более противоионов. «Фармацевтически приемлемая соль» представляет собой соль, которая подходит для введения субъекту, как описано в данном документе, и в некоторых аспектах включает соли, описанные в P. H. Stahl and C. G. Wermuth, editors, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, Weinheim/Zürich: Wiley-VCH/VHCA, 2002, перечень которых явным образом и в полном объеме включен посредством ссылки в настоящий документ.

Термин «алкил» относится к насыщенному углеводороду с прямой или разветвленной цепью, имеющему указанное количество атомов углерода (например, «C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил» или «C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>» алкил имеет от 1 до 8 или от 1 до 10 атомов углерода соответственно), который является незамещенным, если явно или в контексте не указано иное. Когда число

атомов углерода не указано, алкильная группа имеет от 1 до 6 атомов углерода. Репрезентативные линейные «С<sub>1</sub>-С<sub>8</sub> алкильные» группы включают, но не ограничиваются этим, метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил, н-гептил и н-октил; тогда как разветвленные С<sub>1</sub>-С<sub>8</sub> алкилы включают, но не ограничиваются этим, изопропил, *втор*-бутил, изобутил, *трет*-бутил, изопентил и 2-метилбутил.

Термин «алкилен» относится к двухвалентному незамещенному насыщенному линейному или разветвленному углеводороду с указанным числом атомов углерода (например, С<sub>1</sub>- С<sub>6</sub> алкилен имеет от 1 до 6 атомов углерода), который является незамещенным, если не указано иное явно или в контексте, и имеет два одновалентных радикальных центра, образованных удалением двух атомов водорода от одного и того же или двух разных атомов углерода исходного алкана. Типичные алкиленовые радикалы включают, но не ограничиваются ими: метилен (-СН<sub>2</sub>-), 1,2-этилен (-СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>-), 1,3-пропилен (-СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>-), 1,4-бутилен (-СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>-), и тому подобное.

Термин «алкокси» относится к алкильной группе по определению в данном документе, которая присоединена к молекуле посредством атома кислорода. Например, алкоксигруппы включают, но не ограничиваются этим, метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, втор-бутокси, трет-бутокси, н-пентокси и н-гексокси.

Термин «циклоалкилен» относится к двухвалентному насыщенному циклическому углеводороду с указанным числом атомов углерода (например, С<sub>3</sub>- С<sub>6</sub> циклоалкилен имеет от 3 до 6 атомов углерода), который является незамещенным, если не указано иное явно или в контексте, и имеет два одновалентных радикальных центра, образованных удалением двух атомов водорода от одного и того же или двух разных атомов углерода исходного циклоалкана. Типичные циклоалкиленовые радикалы включают, помимо прочего: 1,2-циклопропилен, 1,3-циклобутилен, 1,3-циклопентлиен, 1,4-циклогексилен и т.п.

Термин «межцепочечная дисульфидная связь» в контексте антитела или антитела МЕФ, как описано в настоящем документе, относится к дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями или тяжелой и легкой цепью.

Термин «около» в отношении числа или числового диапазона означает, что указанные число или числовой диапазон являются приблизительными, например в пределах экспериментальной вариабельности и/или в статистической экспериментальной погрешности, и, таким образом, число или числовой диапазон могут варьироваться  $\pm 10\%$  от указанных числа или числового диапазона.

Термин «прерванный», когда он относится к конкретной функциональной группе, вставленной в алкиленовую группу, включает как разрыв внутри углеродной цепи прямой или разветвленной алкильной группы, так и на конце алкильной группы. Например, гексиленовая группа, прерванная -NHC(=O)-, включает, помимо прочего, -СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>-NHC(=O)-СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>- и -СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>-NHC(=O)-.

Термин «существенный» или «существенно» относится к большинству, т. е. 50% популяции, смеси или образца, как правило, более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% популяции. Термин «по

существу одинаковый» или «по существу идентичный», когда он относится к числу или числовому диапазону, или к последовательности антитела, означает, что указанные число или числовой диапазон являются приблизительными, например в пределах экспериментальной вариабельности и/или в статистической экспериментальной погрешности, и, таким образом, число или числовой диапазон могут варьироваться  $\pm 5\%$  от указанных числа или числового диапазона.

### Антитела

Аспекты настоящего изобретения относятся к антителу с модулированной эффекторной функцией (MEF) с модификацией, уменьшающей эффекторную функцию. Модификация, уменьшающая эффекторную функцию, может представлять собой биосовместимый полимерный фрагмент (BPM). BPM может влиять на аффинность связывания (например, аффинность связывания Fc-рецептора и комплемента), фармакокинетические свойства (например, скорость клиренса), поведение локализации и клеточное поглощение антитела. Поскольку свойства, придаваемые BPM, могут зависеть от его размера, структуры (например, разветвленной или линейной), местоположения и количества (например, 1 или 8 BPM на антителе), модификации BPM могут настраивать антитела для широкого спектра применений. Во многих случаях BPM не влияет или минимально влияет на связывание антигена (например, не блокирует или минимально блокирует паратопы антител), но снижает активность связывания Fc (например, аффинность связывания антитела с Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII, FcRn и/или комплементарными белками).

Во многих случаях BPM настоящего изобретения является расщепляемым. В зависимости от места и химического состава расщепления BPM (например, оставляет ли расщепление рубец на антителе), расщепление BPM может частично или полностью обратить вспять свое влияние на локализацию и активность антитела (например, активность эффекторной функции). В качестве неограничивающего примера можно отметить, что повышенный K<sub>D</sub> для Fc $\gamma$ RIII может быть восстановлен после отщепления BPM от антитела.

Иллюстративный пример активности такого BPM-содержащего антитела *in vivo* изображен на **фиг. 21**, где после инъекции антитело **2100** содержит BPM **2101**, которые могут уменьшать (например, блокировать) взаимодействия с Fc-рецепторами **2103** иммунной клетки **2102** (например, рецептором Fc $\gamma$ RIII на тучной клетке). Во время циркуляции **2104** антитело может отделиться от всех или части своих BPM, например, посредством гидролитического расщепления. После потери BPM **2106** антитело **2100** может восстановить аффинность связывания с Fc-рецептором, восстанавливая или частично восстанавливая свою эффекторную функцию. Антитело может связываться с клеткой-мишенью **2107**, такой как опухолевая клетка, так что его эффекторная функция по меньшей мере частично локализована в участке клетки-мишени. В некоторых случаях (например, когда BPM соединен с тиолом цистеина) после потери BPM может образовываться дисульфидная связь.

Соответственно, расщепляемые BPM могут влиять на активность антител

(например, уменьшать эффекторную функцию) в зависимости от времени. Не будучи связанным теорией, ВРМ может ослаблять эффекторную функцию (например, связывание Fc-FcγR) посредством нескольких механизмов (или комбинаций механизмов). Во многих случаях ВРМ, по меньшей мере, частично блокирует Fc антитела (например, за счет стерической массы), тем самым предотвращая ассоциацию с Fc-рецепторами. Более того, ВРМ может изменять динамику белков (например, растворимость или физиологическую локализацию), тем самым изменяя силу или распространенность взаимодействий с Fc-рецепторами. В некоторых случаях функционализация ВРМ (а в некоторых случаях сопутствующее восстановление дисульфидных связей) может дестабилизировать антитело, тем самым снижая присущую ему аффинность связывания его Fc с рецепторами.

В некоторых случаях однократное расщепление ВРМ восстанавливает активность (например, эффекторную функцию), так что ВРМ эффективно функционирует как переключатель «вкл-выкл» для этой активности. В других случаях расщепление ВРМ восстанавливает лишь часть активности антител. В некоторых случаях, например, показанных на **фиг. 13 и 14**, усиление эффекторной функции может следовать относительно линейной тенденции относительно расщепления ВРМ. В других случаях последовательное расщепление ВРМ от антител с несколькими ВРМ может восстановить различную степень активности. Например, антитело с 8 ВРМ может восстановить только 15% своей максимальной активности эффекторной функции и более 99% своей антигенсвязывающей аффинности после двух расщеплений ВРМ, но восстановить более 50% своей активности эффекторной функции после 4 расщеплений ВРМ.

Как раскрыто в настоящем документе, расщепляемость ВРМ можно использовать для придания временной зависимости активности антитела (например, активности эффекторной функции) и для настройки активности антитела во избежание токсических и нецелевых эффектов. Поддержание эффекторной функции и антигенсвязывающей активности посредством модификаций ВРМ может потребовать выбора плотности, размеров, структур и скоростей расщепления ВРМ, а также мишеней и структуры антител. Настройка антитела MEF для последовательного восстановления эффекторной функции в физиологических условиях (например, в отличие от постоянной потери эффекторной функции при модификации ВРМ) может потребовать нескольких ВРМ, которые способствуют частичной, но не полной потере эффекторной функции, а также скорости расщепления хотя бы частично соразмерно или быстрее, чем клиренс.

Неожиданное открытие, описанное в настоящем документе, заключается в том, что для многих видов лечения частичное снижение эффекторной функции является оптимальным для индукции локализованной (например, в месте опухоли) иммунной активации и предотвращения системной токсичности, индуцированной антителами. Следуя этому наблюдению, многие антитела по настоящему изобретению сконфигурированы так, чтобы проявлять низкую или незначительную эффекторную функцию до расщепления ВРМ и частичную эффекторную функцию после частичного расщепления ВРМ (например, расщепление подмножества ВРМ, связанных с антителом). До расщепления ВРМ антитело

MEF может иметь аффинность связывания с рецептором Fc (например, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIIIa, Fc $\gamma$ RIIIb или рецептором, имеющим по меньшей мере 98% идентичности последовательности с его рецептором) не более 1%, не более 2%, не более 5%, не более 10%, не более 15%, не более 20%, не более 25%, не более 30%, не более 40% или не более 50% от эквивалентного антитела, не имеющего ВРМ (например, один ВРМ или множество ВРМ). В некоторых случаях до расщепления ВРМ антитело MEF имеет от 1% до 30%, от 1% до 10%, от 2% до 20%, от 2% до 12%, от 5% до 25% или от 10% и 30% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишённого ВРМ. В некоторых случаях антитело MEF имеет от 2% до 20% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, не обладающего ВРМ.

В некоторых случаях антитело MEF имеет от 10% до 80%, от 10% до 30%, от 20% до 40%, от 20% до 50%, от 30% до 60% или от 30% до 70% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишённого ВРМ, после 192-часовой инкубации в плазме человека при 37 °С. В некоторых случаях антитело MEF обладает от 30% до 70% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишённого ВРМ, после 192-часовой инкубации в плазме человека при 37 °С.

В некоторых случаях до расщепления ВРМ антитело MEF имеет аффинность связывания Fc $\gamma$ RIIIa не более 1%, не более 2%, не более 5%, не более 10%, не более 15%, не более 20%, не более 25%, не более 30%, не более 40% или не более 50% от эквивалентного антитела, не имеющего ВРМ. В некоторых случаях до расщепления ВРМ антитело MEF имеет от 1% до 30%, от 1% до 10%, от 2% до 20%, от 2% до 12%, от 5% до 25% или от 10% и 30% аффинности связывания Fc $\gamma$ RIIIa эквивалентного антитела, не обладающего ВРМ. В некоторых случаях антитело MEF имеет от 2% до 20% аффинности связывания Fc $\gamma$ RIIIa по сравнению с эквивалентным антителом, не имеющим ВРМ. В некоторых случаях антитело MEF имеет от 10% до 80%, от 10% до 30%, от 20% до 40%, от 20% до 50%, от 30% до 60% или от 30% до 70% аффинности связывания Fc $\gamma$ RIIIa эквивалентного антитела, лишённого ВРМ, после 192-часовой инкубации в плазме человека при 37 °С. В некоторых случаях антитело MEF обладает от 30% до 70% аффинности связывания Fc $\gamma$ RIIIa эквивалентного антитела, лишённого ВРМ, после 192-часовой инкубации в плазме человека при 37 °С.

В некоторых случаях антитело MEF настроено на восстановление от 10% до 50%, от 10% до 30%, от 25% до 40% или от 30% до 50% своей аффинности связывания с Fc-рецептором после расщепления половины (округлено в большую сторону) его ВРМ (как функция аффинности связывания эквивалентного антитела, не обладающего ВРМ). В некоторых случаях антитело MEF настроено на расщепление ВРМ со скоростью от 0,04 до 0,3 день<sup>-1</sup>, от 0,075 до 0,2 день<sup>-1</sup>, от 0,1 до 0,25 день<sup>-1</sup>, от 0,1 до 0,5 день<sup>-1</sup>, от 0,15 и 0,5 день<sup>-1</sup> или от 0,3 до 0,75 день<sup>-1</sup> во время инкубации в плазме человека при температуре 37 °С. В некоторых случаях антитело MEF имеет скорость расщепления ВРМ от 0,075 до 0,2 день<sup>-1</sup> (что соответствует периодам полужизни ВРМ от около 3,5 до около 9,25 дня) во время инкубации в плазме при 37 °С.

В некоторых случаях антитело MEF имеет степень расщепления BPM, которая составляет по меньшей мере 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 250%, по меньшей мере 300%, в по меньшей мере 400% или по меньшей мере 500% от его физиологической скорости клиренса во время кровообращения *in vivo* у взрослого человека мужского пола. В конкретных случаях скорость расщепления антитела MEF составляет от около 50% до около 300% от его физиологической скорости клиренса во время кровообращения *in vivo* у взрослого человека мужского пола. В конкретных случаях скорость расщепления антитела MEF составляет от около 25% до около 200% от его физиологической скорости клиренса во время кровообращения *in vivo* у взрослого человека мужского пола.

Антитело может дополнительно содержать модификацию в дополнение к BPM, такую как мутация, метка или посттрансляционная модификация. Модификация может изменить аффинность связывания антигена, эффекторную функцию, фармакокинетические свойства антитела или их комбинацию. Во многих случаях модификация увеличивает эффекторную функцию антител MEF. В сочетании с BPM, снижающим эффекторную функцию, таким как ПЭГилирование Fc-области, полученное антитело может демонстрировать улучшенную локализацию активности и снижение системных и нецелевых ответов (например, повышение уровня цитокинов в крови). Например, консорциум BPM-модифицированных антител с высокой эффекторной функцией может локализоваться в участках с высокими концентрациями антигена (например, в участках с HER2+ метастатическими раковыми клетками), так что расщепление BPM и сопутствующее усиление или восстановление эффекторной функции непропорционально происходят в целевом сайте. Кроме того, для антител с несколькими BPM модификация, усиливающая эффекторную функцию, может позволить восстановить цитотоксическое или фагоцитарное поведение с меньшим количеством расщеплений BPM (например, может потребоваться расщепление только 1 из 8 BPM для восстановления эффекторной функции, эквивалентной функции аналога антитела, не имеющего модификации, усиливающей эффекторную функцию).

Следуя этим наблюдениям, антитело MEF по настоящему изобретению может содержать модификацию, усиливающую эффекторную функцию, и модификацию, уменьшающую эффекторную функцию, причем модификация, уменьшающая эффекторную функцию, содержит биосовместимый полимерный фрагмент (BPM), ковалентно присоединенный к аминокислоте или посттрансляционную модификацию антитела MEF. В некоторых случаях модификация, усиливающая эффекторную функцию, увеличивает аффинность связывания с FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb или их комбинацией. В некоторых случаях модификация, усиливающая эффекторную функцию, увеличивает аффинность связывания с FcγRIIIa. В некоторых случаях модификация, усиливающая эффекторную функцию, включает афукозилирование, расщепление пополам N-ацетил глюкозамина, мутацию Fc-области S298A, мутацию Fc-области E333A, мутацию Fc-области K334A, мутацию Fc-области S239D, мутацию Fc-области I332E, мутацию Fc-

области G236A, мутацию Fc-области S239E, мутацию Fc-области A330L, мутацию Fc-области G236A, мутацию Fc-области L234Y, мутацию Fc-области G236W, мутацию Fc-области S296A, мутацию Fc-области F243, R292P мутацию Fc-области, мутацию Fc-области Y300L, мутацию Fc-области V305L, мутацию Fc-области P396L или их комбинацию. В некоторых случаях модификация, усиливающая эффекторную функцию, включает афукозилирование.

Используемый в настоящем документе термин «афукозилирование» может обозначать отсутствие фукозы в антителе, может обозначать отсутствие фукозы во множестве антител (например, единичная доза композиции антител) или то, что незначительное количество фукозы включено в сложную N-гликозидную сахарную цепь(и) множества антител. В то время как в сыворотке около 85% антител IgG содержат фукозу, включенную в N-гликозидную сахарную цепь(и), в различных вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, менее чем около 30%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5%, менее чем около 3% антител, менее чем около 2%, менее чем около 1% или менее чем около 0,5% антител из множества антител имеют одну или более фукозных групп в сочетании с ним. В некоторых вариантах осуществления около 2% антител из множества имеют одну или более групп фукозы. В различных вариантах менее чем около, когда менее 30% антител из множества антител содержат фукозные группы, множество антител можно назвать «нефукозилированными» или «афукозилированными». В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% антител из множества являются афукозилированными.

В определенных вариантах осуществления только незначительное количество аналога фукозы (или метаболита, или продукта аналога фукозы) включено в сложную цепь(и) сахара, связанную с N-гликозидом антитела. Например, в различных вариантах осуществления менее чем около 30%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5%, менее чем около 3%, менее чем около 2%, менее чем около 1% или менее чем около 0,5% антител из множества антител имеют коровое фукозилирование аналогом фукозы или метаболитом или продуктом аналога фукозы. В некоторых вариантах осуществления около 2% из множества антител имеют коровое фукозилирование аналогом фукозы или метаболитом или продуктом аналога фукозы.

В некоторых вариантах осуществления менее чем около 30%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5%, менее чем около 3%, менее чем около 2%, менее чем около 1% или менее чем около 0,5% антител из множества антител имеют остаток фукозы в гликановой структуре G0, G1 или G2. (См., например, Raju et al., 2012, MAbs 4: 385-391, фиг. 3.) В некоторых вариантах осуществления около 2% антител из множества антител имеют остаток фукозы в гликановой структуре G0, G1 или G2. В различных вариантах осуществления, когда менее 30% антител из множества антител имеют остаток фукозы в гликановой структуре G0, G1 или G2, антитела композиции можно

назвать «афукозилированными». В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% антител из множества антител лишены фукозы в гликановой структуре G0, G1 или G2. Следует отметить, что к гликанам G0 относятся гликаны G0-GN, которые могут представлять собой моноантенарные гликаны с одним концевым остатком GlcNAc. Гликаны G1 включают гликаны G1-GN, которые могут представлять собой моноантенарные гликаны с одним концевым остатком галактозы. Гликаны G0-GN и G1-GN могут быть фукозилированными или нефукозилированными.

В некоторых случаях модификация, снижающая эффекторную функцию, является по меньшей мере частично обратимой. Например, в некоторых случаях модификация, уменьшающая эффекторную функцию, включает фотопереклюаемый или химически переключаемый домен, выполненный с возможностью взаимного преобразования ВРМ между состояниями, которые дифференциально изменяют эффекторную функцию. Во многих случаях ВРМ настроен на расщепление, которое увеличивает эффекторную функцию антитела. В некоторых случаях аминокислотный остаток включает остаток цистеина или остаток метионина. В некоторых случаях остаток цистеина соединяется с ВРМ с образованием дисульфида, тиоэфира, тиоаллила, винилтиола или их комбинации. В некоторых случаях дисульфидная связь, тиоаллильная связь или их комбинация являются расщепляемыми. В некоторых случаях остаток метионина соединяется с ВРМ через связь S=N (например, в виде сульфанимина). Например, ВРМ может включать оксазиридинкарбоксамид, оксазиридинкетон или оксазиридинкарбоксилат, способный связываться с тиоэфиром метионина.

В некоторых случаях ВРМ содержит ферментативно расщепляемую группу. В некоторых случаях ферментативно расщепляемая группа представляет собой последовательность протеазного расщепления, гликозидную группу, карбамат, мочевины, четвертичный аммоний или их комбинацию. В некоторых случаях ферментативно расщепляемый фрагмент представляет собой последовательность расщепляемого протеазой. В некоторых случаях последовательность протеазного расщепления представляет собой последовательность опухолеассоциированного протеазного расщепления. В некоторых случаях ВРМ содержит фрагмент, который расщепляется в физиологических условиях, например, четвертичный аммиак или карбамат.

ВРМ может быть настроен на расщепление в месте прикрепления к антителу. Например, ВРМ может быть связан с цистеином, полученным из антитела, посредством расщепляемого тиоэфира (например, аддукта цистеин-малеимид), винилового эфира или дисульфидной связи, так что расщепление полностью удаляет ВРМ из антитела. Альтернативно или в дополнение к этому, расщепляемая группа может располагаться внутри ВРМ, так что часть ВРМ остается прикрепленной к антителу после его расщепления. В некоторых случаях ВРМ настроен на гидролитическое расщепление. В некоторых таких случаях расщепление ВРМ демонстрирует зависимость скорости первого порядка в плазме,

спинномозговой жидкости, лимфе или другой жидкости организма. В некоторых случаях расщепление ВРМ зависит от состояния. Например, ВРМ может медленно расщепляться в плазме, но быстро в микроокружении опухоли с низким рН.

В некоторых случаях ВРМ настроен на ферментативное расщепление. Когда ферменты для такого расщепления локализованы в конкретных тканях, клетках или субклеточных компартментах, расщепляемая группа может демонстрировать местносpezifичное или локализованное усиленное расщепление, тем самым активируясь преимущественно в пределах целевых участков. Примеры расщепляемых ВРМ групп включают сайты расщепления протеазами и гидролазами. В некоторых случаях расщепляемая группа включает расщепляемую протеазой пептидную последовательность. В качестве неограничивающих примеров последовательность протеазного расщепления может представлять собой последовательность расщепления тромбином, последовательность расщепления катепсином, последовательность расщепления матриксной металлопротеиназой, последовательность расщепления пептида, активирующего PAR-1, последовательность расщепления калликреином, последовательность расщепления гранзимом, последовательность расщепления каспазой, последовательность расщепления ADAM, последовательность расщепления кальпаином, последовательность расщепления простатспецифического антигена, последовательность расщепления белка активации фибробластов, последовательность расщепления дипептидилпептидазой IV или их комбинацию. В некоторых случаях расщепляемая группа ВРМ включает расщепляемую гликозидную группу. В качестве неограничивающих примеров расщепляемая гликозидная группа может содержать  $\beta$ -D-глюкуронид,  $\beta$ -D-галактозу,  $\beta$ -D-глюкозу,  $\beta$ -D-ксилозу, гексамальтозу,  $\beta$ -L-гулозу,  $\beta$ -L-аллозу,  $\beta$ -L-глюкозу,  $\beta$ -L-галактозу,  $\beta$ -маннозо-6-фосфат,  $\beta$ -L-фукозу,  $\alpha$ -E-маннозу,  $\beta$ -D-фукозу, 6-дезоксид- $\beta$ -D-глюкозу,  $\beta$ -маннозо-6-фосфат, лактозу, мальтозу, целлобиозу, гентиобиозу, мальтотриозу,  $\beta$ -D-GlcNAc,  $\beta$ -D-GalNAc или их комбинацию. Например, расщепляемая группа может включать сайты расщепления  $\beta$ -глюкуронидазой или  $\alpha$ -маннозидазой, расщепляемые лизосомальными  $\beta$ -глюкуронидазами или  $\alpha$ -маннозидазами, тем самым делая линкер (L) инертным перед поглощением лизосомами и расщепляемым после поглощения лизосомами. В некоторых случаях расщепляемая группа ВРМ включает ферментативно расщепляемую гликозидную связь, пептидную связь, карбамат или четвертичный амин. В некоторых случаях фермент такого расщепления связан с раковой клеткой, например внеклеточный катепсин.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемая часть ВРМ настроена на участие во вторичной реакции, которая снижает скорость расщепления ВРМ. Например, когда ВРМ содержит сукцинимид (например, связанный с антителом посредством тиоэфирной связи), сукцинимид может подвергаться реакции гидролиза с образованием карбоксилата и амида, что может замедлять скорость расщепления (например, от цистеина, проученного из антитела). В некоторых случаях расщепляемый фрагмент выполнен с возможностью подвергаться расщеплению ВРМ по меньшей мере в 1,5 раза быстрее, чем

вторичная реакция в кровотоке *in vivo* у взрослого человека мужского пола. В некоторых случаях расщепляемый фрагмент выполнен с возможностью подвергаться расщеплению ВРМ по меньшей мере в 2 раза быстрее, чем вторичная реакция в кровотоке *in vivo* у взрослого человека мужского пола. В некоторых случаях расщепляемый фрагмент выполнен с возможностью подвергаться расщеплению ВРМ по меньшей мере в 2,5 раза быстрее, чем вторичная реакция в кровотоке *in vivo* у взрослого человека мужского пола. В некоторых случаях расщепляемый фрагмент выполнен с возможностью подвергаться расщеплению ВРМ по меньшей мере в 3 раза быстрее, чем вторичная реакция в кровотоке *in vivo* у взрослого человека мужского пола.

В некоторых случаях вторичная реакция может ингибировать или предотвращать полное расщепление ВРМ (например, в плазме при 37°C или в кровотоке *in vivo* у взрослого мужчины). В некоторых случаях по меньшей мере 10% ВРМ остаются прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца инкубации в плазме при 37 °С. В некоторых случаях по меньшей мере 15% ВРМ остаются прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца инкубации в плазме при 37 °С. В некоторых случаях по меньшей мере 20% ВРМ остаются прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца инкубации в плазме при 37 °С. В некоторых случаях по меньшей мере 25% ВРМ остаются прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца инкубации в плазме при 37 °С. В некоторых случаях по меньшей мере 30% ВРМ остаются прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца инкубации в плазме при 37 °С. В некоторых случаях по меньшей мере 35% ВРМ остаются прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца инкубации в плазме при 37 °С. В некоторых случаях по меньшей мере 60% расщепляемых групп ВРМ, которые остались прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца инкубации в плазме при 37 °С, подверглись вторичной реакции. В некоторых случаях по меньшей мере 80% расщепляемых групп ВРМ, которые остались прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца инкубации в плазме при 37 °С, подверглись вторичной реакции.

В некоторых случаях по меньшей мере 10% ВРМ остаются прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца в кровотоке *in vivo* у взрослого человека мужского пола. В некоторых случаях по меньшей мере 15% ВРМ остаются прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца в кровотоке *in vivo* у взрослого человека мужского пола. В некоторых случаях по меньшей мере 20% ВРМ остаются прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца в кровотоке *in vivo* у взрослого человека мужского пола. В некоторых случаях по меньшей мере 25% ВРМ остаются прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца в кровотоке *in vivo* у взрослого человека мужского пола. В некоторых случаях по меньшей мере 30% ВРМ остаются прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца в кровотоке *in vivo* у взрослого человека мужского пола. В некоторых случаях по меньшей мере 35% ВРМ остаются прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца в кровотоке *in vivo* у взрослого человека мужского пола. В некоторых случаях по меньшей мере 60% расщепляемых групп ВРМ, которые остались прикрепленными к антителу МЕФ после одного месяца в кровотоке *in vivo* у взрослого

человека мужского пола, подверглись вторичной реакции. В некоторых случаях по меньшей мере 80% расщепляемых групп ВРМ, которые остались прикрепленными к антителу MEF после одного месяца в кровотоке *in vivo* у взрослого человека мужского пола, подверглись вторичной реакции.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предложено антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), связанное с множеством биосовместимых полимерных фрагментов (ВРМ) и Fc, которая по меньшей мере частично блокирована ВРМ; при этом ВРМ из множества ВРМ присоединен к атому серы остатка цистеина посредством расщепляемой дисульфидной связи. Альтернативно или в дополнение к этому, аспекты настоящего изобретения обеспечивают антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), связанное с множеством биосовместимых полимерных фрагментов (ВРМ), которые по меньшей мере частично уменьшают эффекторную функцию антитела MEF; при этом ВРМ из множества ВРМ присоединен к атому серы остатка цистеина посредством расщепляемой дисульфидной связи.

Определенные варианты осуществления изобретения обеспечивают антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), связанное с множеством биосовместимых полимерных фрагментов (ВРМ) и Fc, которая по меньшей мере частично блокирована ВРМ; при этом ВРМ из множества ВРМ присоединен к остатку метионина посредством расщепляемого фрагмента. Альтернативно или в дополнение к этому, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), связанное с множеством биосовместимых полимерных фрагментов (ВРМ), которые по меньшей мере частично уменьшают эффекторную функцию антитела MEF; при этом ВРМ из множества ВРМ присоединен к остатку метионина посредством расщепляемого фрагмента.

В некоторых случаях ВРМ, по меньшей мере, частично снижает эффекторную функцию антитела путем, по меньшей мере, частичного блокирования Fc-области антитела. В некоторых случаях ВРМ, по меньшей мере, частично снижает эффекторную функцию антитела за счет снижения стабильности антитела. Например, антитело, функционализированное ВРМ, может денатурировать концентрацию гуанидиния на 5%, 10%, 15%, 20% или 25% ниже, чем эквивалентное антитело, не обладающее функционализацией ВРМ.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), содержащее по меньшей мере одну область Fc и связанное с множеством биосовместимых полимерных фрагментов (ВРМ) в соотношении к областям Fc по меньшей мере одной области Fc от 6 до 10; при этом множество биосовместимых полимерных фрагментов имеют молекулярную массу от 500 до 2500 Дальтон (Да) и имеют скорость расщепления от 0,1 до 0,5 день<sup>-1</sup> в плазме человека при 37 °С. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предложено антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), причем антитело MEF имеет множество биосовместимых полимерных фрагментов (ВРМ), при этом каждый ВРМ

ковалентно присоединен к аминокислотным остаткам антитела MEF через расщепляемые фрагменты; и при этом антитело MEF демонстрирует зависящее от времени снижение связывания FcR и, таким образом, соответствующее зависящее от времени снижение эффекторной функции по сравнению с функцией эквивалентного антитела. В некоторых случаях каждый ВРМ ковалентно присоединен к серосодержащим аминокислотным остаткам антитела MEF. В некоторых случаях каждый ВРМ ковалентно присоединен к остаткам цистеина антитела MEF. В некоторых случаях по меньшей мере часть остатков цистеина образуется из дисульфидных связей в антителе MEF до восстановления и связывания ВРМ.

В конкретных случаях настоящее изобретение относится к антителу с модулированной эффекторной функцией (MEF), причем антитело MEF имеет 1, 2, 3 или 4 восстановленные межцепочечные дисульфидные связи и 2, 4, 6 или 8 биосовместимых полимерных фрагментов (ВРМ), соответственно; причем каждый ВРМ ковалентно присоединен к каждому атому серы остатков цистеина каждой восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемый фрагмент; и при этом антитело MEF демонстрирует зависящее от времени снижение связывания FcR и, таким образом, соответствующее зависящее от времени снижение эффекторной функции по сравнению с функцией эквивалентного антитела. В некоторых случаях антитело MEF содержит модификацию, повышающую эффекторную функцию. В некоторых случаях модификация, усиливающая эффекторную функцию, увеличивает аффинность связывания с FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb или их комбинацией. В некоторых случаях антитело MEF включает антитело IgG.

Ссылка на «антитело» как компонент антител MEF по настоящему изобретению относится к антителам, описанным в настоящем документе, таким как терапевтические антитела. В некоторых случаях антитело MEF включает антитело IgG. В некоторых случаях антитело MEF представляет собой антитело IgG. В некоторых случаях антитело IgG представляет собой антитело IgG1.

В некоторых вариантах осуществления зависящее от времени снижение связывания FcR коррелирует с первоначальным присутствием и последующей потерей ВРМ посредством расщепления соответствующего расщепляемого фрагмента(ов), например, в физиологической среде.

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, представленное в настоящем документе, демонстрирует сниженное связывание Fc-области антитела с родственным ему Fc-рецептором по сравнению с эквивалентным антителом, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления связывание с родственным Fc-рецептором снижается на от около 10% до около 99%, например, от около 10% до около 50%, от около 25% до около 75%, от около 50% до около 99% или любое значение между ними. В некоторых вариантах осуществления снижение связывания с Fc-рецептором частично или полностью устраняется за счет расщепления расщепляемых фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, представленное в настоящем

документе, связывается с родственным Fc-рецептором с константой связывания ( $K_D$ ) примерно в 2-1000 раз выше, чем у эквивалентного антитела. В некоторых вариантах осуществления  $K_D$  родственного Fc-рецептора примерно в 2-10 раз выше, примерно в 5-20 раз выше, примерно в 10-50 раз выше, примерно в 25-100 раз выше, примерно в 50-200 раз выше, примерно в 100-300 раз выше, примерно в 200-400 раз выше, примерно в 300-500 раз выше, примерно в 400-600 раз выше, примерно в 500-700 раз выше, примерно в 600-800 раз выше, примерно в 700-900 раз выше, примерно от 800-1 000 раз выше, или любое значение между ними.

В некоторых вариантах осуществления увеличение  $K_D$  Fc-рецептора снижается за счет расщепления расщепляемых фрагментов, тем самым обеспечивая зависящее от времени снижение связывания FcR антитела MEF. В некоторых вариантах осуществления зависящее от времени снижение связывания FcR антитела MEF характеризуется начальным снижением связывания FcR по меньшей мере от около 50% до около 90% по сравнению с эквивалентным антителом. В некоторых вариантах осуществления за первоначальным снижением связывания FcR следует восстановление связывания, что является дополнительной характеристикой зависящего от времени снижения связывания FcR, причем восстановление коррелирует с потерей ВРМ за счет неферментативного расщепления соответствующего расщепляемого фрагмента(фрагментов) в физиологических средах, таких как плазма позвоночных. В некоторых вариантах осуществления первоначальное снижение включает период времени с момента введения антитела MEF субъекту (например, «0 часов» после введения) и около 3 часов после введения антитела MEF субъекту. Например, от около 0 часов до около 2 часов после введения, от около 0 часов до около 1,5 часов после введения, от около 0 часов до около 1 часа после введения, от около 0 часов до около 0,5 часов после введения, около 0,5 часов до около 2 часов после введения или от около 0,5 часов до 1,5 часов после введения.

В некоторых вариантах осуществления период полужизни расщепляемых фрагментов из плазмы составляет от около 3 часов до около 96 часов. Например, период полужизни расщепляемых фрагментов из плазмы может составлять от около 3 часов до около 12 часов, от около 6 часов до около 18 часов, от около 12 часов до около 24 часов, от около 18 часов до около 36 часов, от около 24 часов до около 48 часов, от около 36 часов до около 72 часов, от около 48 часов до около 96 часов, от около 72 до около 120 часов или любое промежуточное значение. В конкретных случаях (например, как показано на **фиг. 13**) период полужизни расщепляемых фрагментов составляет от около 60 до около 150 часов или от около 72 до около 120 часов.

В некоторых вариантах осуществления  $K_D$  для Fc-рецептора увеличивается через от около 3 часа до около 96 часов. Эту величину можно измерить, либо *in vitro*, либо *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления  $K_D$  для Fc-рецептора увеличивается при измерении *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления  $K_D$  Fc-рецептора увеличивается при измерении *in vivo*.  $K_D$  антитела может быть измерено, например, с помощью поляризационно-модулированной разницы коэффициентов отражения при наклонном

падении (OI-RD), поверхностного плазмонного резонанса, интерферометрии, клеточной сортировки, активируемой флуоресценцией (FACS), и с помощью других методов, известных в данной области техники. См., например, Hearty, et al., *Methods Mol. Biol.* 2012; 907: 411-442 and Landry, et al., *Assay Drug Dev. Tech.* 2012; 10: 250-259. В некоторых вариантах осуществления  $K_D$  для Fc-рецептора может быть увеличена через от около 3 часов до около 12 часов, от около 6 часов до около 18 часов, от около 12 часов до около 24 часов, от около 18 часов до около 36 часов, от около 24 часов до около 48 часов, от около 36 часов до около 72 часов, от около 48 часов до около 96 часов или любое промежуточное значение.

В некоторых вариантах осуществления расщепление расщепляемых фрагментов включает приведение в контакт расщепляемых фрагментов с плазмой в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления плазма представляет собой плазму позвоночных. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт расщепляемых фрагментов с плазмой осуществляют *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт расщепляемых фрагментов с плазмой осуществляют *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, представленное в настоящем документе, включает интактное или полностью восстановленное антитело. Термин «полностью восстановленное» относится к антителам, в которых все межцепочечные дисульфидные связи восстановлены с образованием тиолов, которые можно присоединить к расщепляемому фрагменту.

ВРМ может связываться с различными участками антитела. В некоторых случаях ВРМ соединяется с аминокислотным остатком или посттрансляционной модификацией антитела MEF. В некоторых случаях ВРМ соединяется с нативным аминокислотным остатком антитела. В некоторых случаях нативный аминокислотный остаток представляет собой остаток цистеина, остаток метионина, остаток лизина или их комбинацию. В некоторых случаях нативный аминокислотный остаток представляет собой остаток цистеина. В некоторых случаях остаток цистеина восстанавливается из дисульфидной связи антитела перед связыванием ВРМ. В некоторых случаях аминокислотный остаток обеспечивается посредством мутации (например, остаток цистеина оказывается в положении, которое обычно содержит валин). В некоторых случаях посттрансляционная модификация включает гликозилирование, нитрозилирование, фосфорилирование, цитруллинирование, сульфенилирование или их комбинацию. В некоторых случаях ВРМ соединяется с посттрансляционной модификацией антитела MEF.

В некоторых случаях ВРМ соединяется с гликозилированием антител. Соединение ВРМ с гликозилированием может включать химическое или ферментативное присоединение ВРМ-модифицированного гликана к антителу. ВРМ-модифицированный гликан может быть присоединен к гликану, например, с помощью гликозилтрансферазы, или к аминокислотному остатку, например, к серину или треонину, с помощью O-N-ацетилгалактозамин-трансферазы, или к аспарагину, с помощью

олигосахарилтрансферазы. В некоторых случаях соединение ВРМ с гликозилированием может включать химическое или ферментативное присоединение ВРМ к гликозилированию, полученному из антитела. Такое сочетание может включать окисление концевого мономера гликана до соответствующего ему диальдегида, например периодатом натрия, и связывание дитиола или диамина ВРМ с диальдегидом.

В некоторых случаях ВРМ соединяется с нитрозильной группой, полученной из антитела (например, посттрансляционное добавление нитрозилирования). В некоторых случаях нитрозильная группа связана с цистеином, тирозином, триптофаном или метионином. ВРМ может быть электрофильно связан с нитрозилированным остатком после восстановления нитрозильной группы до амина или, в случае нитрозилированного цистеина, путем нуклеофильного замещения, приводящего к образованию дисульфидной связи и замещению оксида азота. В некоторых случаях ВРМ присоединяется к остатку цитруллина антитела через связанный с ВРМ глиоксаль, образуя аддукт гидроксимидазолон с цитруллинмочевинной. В некоторых случаях ВРМ связывают с сульфенилированным остатком антитела с помощью 1,3-циклоалкандиона, такого как 1,3-циклогександион. В некоторых случаях ВРМ присоединяется к фосфорильной группе антитела путем образования аддукта между фосфорилом и карбодиимидом, связанным с ВРМ.

Как описано в настоящем документе, каждый расщепляемый фрагмент может быть ковалентно связан с (i) ВРМ и (ii) атомом серы остатка цистеина. Во многих случаях остаток цистеина происходит из восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела МЕФ. Для каждой межцепочечной дисульфидной связи требуется пара остатков цистеина: один на тяжелой цепи, а другой на легкой или тяжелой цепи. Такая схема соединения изображена на **фиг. 22**, на которой межцепочечные дисульфидные связи **2201** антитела **2200** восстанавливаются **2202** и соединяются с ВРМ **2203**. В некоторых вариантах осуществления после отщепления расщепляемого фрагмента (высвобождения ВРМ) некоторая часть расщепляемого фрагмента остается прикрепленной к антителу МЕФ. В некоторых вариантах осуществления расщепление расщепляемого фрагмента (высвобождение ВРМ) приводит к образованию свободной тиоловой группы цистеина (-SH).

Присоединение расщепляемого фрагмента к антителу МЕФ может осуществляться посредством тиоэфирной связи или дисульфидной связи к атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела. В некоторых вариантах осуществления тиоэфирная связь существует между антителом МЕФ и сукцинимидом, причем расщепляемый фрагмент содержит сукцинимид. В некоторых вариантах осуществления тиоэфирная связь существует между антителом МЕФ и негидролизированным сукцинимидом, причем расщепляемый фрагмент содержит сукцинимид. В некоторых вариантах осуществления дисульфидная связь существует между антителом МЕФ и ВРМ, причем расщепляемый фрагмент содержит дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент ковалентно

присоединен к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемую дисульфидную связь или через расщепляемую тиоэфирную связь с негидролизованным сукцинимидным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент ковалентно присоединен к атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемую дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент ковалентно присоединен к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемую тиоэфирную связь с негидролизованным сукцинимидным фрагментом.

В некоторых случаях антитело MEF содержит соотношение ВРМ и Fc-областей от 2 до 20, от 2 до 10, от 2 до 4, от 4 до 12, от 4 до 10, от 6 до 15, от 6 до 10 или от 8 до 15. В некоторых случаях антитело MEF содержит соотношение ВРМ и антигенсвязывающих фрагментов (Fab) от 1 до 10, от 1 до 5, от 1 до 3, от 2 до 6, от 2 до 4, от 3 до 8, от 3 до 5 или от 4 до 8.

Не будучи связанным какой-либо теорией, когда первый расщепляемый фрагмент, содержащий дисульфидную связь, расщепляется (высвобождая первый ВРМ), образующийся цистеинтиол может предпочтительно образовывать межцепочечную дисульфидную связь с соответствующим остатком цистеина, тем самым расщепляя второй расщепляемый фрагмент, и высвобождая второй ВРМ. Таким образом, считается, что при высвобождении первого ВРМ пары остатков цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи (путем разрыва дисульфидной связи) второй ВРМ, присоединенный к соответствующему остатку цистеина через дисульфидную связь, также будет быть высвобождаться.

В некоторых случаях, по меньшей мере, часть ВРМ связана с тиолами цистеина, восстановительно высвобождаемыми из дисульфидных связей. Аналогично, без привязки к какой-либо теории, полагают, что каждая пара ВРМ может быть связана с соответствующими сульфидными остатками одной восстановленной межцепочечной дисульфидной связи. Таким образом, например, когда каждый расщепляемый фрагмент содержит дисульфидную связь, расщепление будет происходить попарно, так что антитело MEF будет поддерживать четное количество ВРМ до тех пор, пока все ВРМ не будут потеряны. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, как описано в настоящем документе, содержит 2 ВРМ. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, как описано в настоящем документе, содержит 4 ВРМ. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, как описано в настоящем документе, содержит 6 ВРМ. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, как описано в настоящем документе, содержит 8 ВРМ. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, как описано в настоящем документе, содержит 10 ВРМ.

Напротив, также без привязки к какой-либо теории считается, что расщепляемые фрагменты, которые не содержат дисульфидную связь (например, тиоэфирную связь с

сукцинимидом), не обязательно высвобождают ВРМ попарно, как это делают расщепляемые фрагменты, содержащие дисульфидную связь. Соответственно, когда расщепляемый фрагмент не содержит дисульфидную связь, некоторые варианты осуществления антител, описанных в настоящем документе, содержат от 1 до 8 ВРМ.

В некоторых вариантах осуществления, когда каждый ВРМ представляет собой полипептидный фрагмент, каждый расщепляемый фрагмент содержит от 2 до 10 аминокислот. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ВРМ и расщепляемый фрагмент вместе содержат от 12 до 60 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликолевого фрагмента, поликетального фрагмента, полиглицеринового фрагмента, полисахаридного фрагмента, полисаркозинового фрагмента, полипептидного фрагмента и полицивтерийонного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ включает монодисперсный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления монодисперсный фрагмент выбран из: полиэтиленгликолевого фрагмента, поликетального фрагмента, полиглицеринового фрагмента, полисахаридного фрагмента, полисаркозинового фрагмента, полипептидного фрагмента и полицивтерийонного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ состоит по существу из монодисперсного фрагмента, выбранного из: полиэтиленгликолевого фрагмента, поликетального фрагмента, полиглицеринового фрагмента, полисахаридного фрагмента, полисаркозинового фрагмента, полипептидного фрагмента и полицивтерийонного фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ включает полидисперсный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления полидисперсный фрагмент выбран из: полиэтиленгликолевого фрагмента, поликетального фрагмента, полиглицеринового фрагмента, полисахаридного фрагмента, полисаркозинового фрагмента, полипептидного фрагмента и полицивтерийонного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ состоит по существу из полидисперсного фрагмента, выбранного из: полиэтиленгликолевого фрагмента, поликетального фрагмента, полиглицеринового фрагмента, полисахаридного фрагмента, полисаркозинового фрагмента, полипептидного фрагмента и полицивтерийонного фрагмента.

Средняя молекулярная масса ВРМ, как описано в настоящем документе, может быть представлена среднечисловой молекулярной массой ( $M_n$ ), средневесовой молекулярной массой ( $M_w$ ), среднечисленной молекулярной массой по Z ( $M_z$ ) и/или молекулярной массой в максимумах кривой молекулярно-массового распределения ( $M_p$ ). Средняя молекулярная масса ВРМ может быть определена с помощью различных методов аналитической характеристики, таких как эксклюзионная хроматография (SEC).

В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет средневесовую молекулярную массу от около 100 дальтон до около 5000 дальтон. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет средневесовую молекулярную массу от около 100 дальтон до около 1000 дальтон, от около 600 дальтон до

около 1 500 дальтон, от около 800 дальтон до около 2,000 дальтон, от около 1 000 дальтон до около 2 500 дальтон, от около 1 500 дальтон до около 3 000 дальтон, от около 2 000 дальтон до около 3 500 дальтон, от около 2 500 дальтон до около 4 000 дальтон, от около 3 000 дальтон до около 4 500 дальтон, от около 3 500 дальтон до около 5 000 дальтон, или любое значение между ними. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ имеет молекулярную массу от 200 до 1 000 дальтон, от 200 до 2 000 дальтон, от 300 до 1 200 дальтон, от 500 до 1 500 дальтон, от 500 до 2 500 дальтон, от 500 до 5 000 дальтон, от 800 до 3 000 дальтон, от 800 до 6 000 дальтон или от 1 000 до 8 000 дальтон.

Гидродинамический размер ВРМ может влиять на поведение антитела MEF в жидкости, а также влиять на фармакокинетические свойства антитела MEF. Гидродинамический размер, представленный гидродинамическим радиусом ( $R_h$ ) или гидродинамическим диаметром ( $D_h$ ), может быть измерен прямо или косвенно с использованием методов аналитической характеристики, таких как эксклюзионная хроматография (SEC).

В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 5 нм до около 25 нм. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 5 нм до около 10 нм, от около 7,5 нм до около 12,5 нм, от около 10 нм до около 15 нм, от около 12,5 нм до около 17,5 нм, от около 15 нм до около 20 нм. нм, от около 17,5 до около 22,5 нм, от около 20 до около 25 нм или любое значение между ними. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 15 нм до около 25 нм. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 10 нм до около 20 нм. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 5 нм до около 15 нм. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 5 нм до около 10 нм.

В некоторых вариантах осуществления множество ВРМ (например, несколько ВРМ, связанных с антителом или множеством антител) являются полидисперсными. В некоторых вариантах осуществления множество ВРМ являются монодисперсными. В некоторых вариантах осуществления ВРМ являются дискретными, то есть синтезируются поэтапно, а не посредством процесса полимеризации. Дискретные ВРМ обеспечивают наличие единообразных молекул с определенной и конкретной длиной цепи.

В некоторых вариантах осуществления ВРМ включает синтетический полимер, пептид, олигосахарид, жирную кислоту или их комбинацию. В некоторых случаях ВРМ включает PEG, полипропиленгликоль, полибутиленгликоль, полиглицерин, полиглутаминовую кислоту, полимолочную кислоту, полигликолевую кислоту, полиэтилентерефталат, их производное или их комбинацию. В некоторых случаях ВРМ включает PEG, полипропиленгликоль, полиглицерин, их производное или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления множество ВРМ включает множество монодисперсных фрагментов PEG. В некоторых вариантах осуществления множество

полидисперсных ВРМ включает множество полидисперсных фрагментов PEG. В некоторых вариантах осуществления каждый фрагмент ПЭГ содержит дискретные ПЭГ.

В некоторых вариантах осуществления один конец фрагмента ПЭГ напрямую присоединен к антители MEF через расщепляемый фрагмент, а другой конец (или концы в случае разветвленных фрагментов ПЭГ) является свободным и несвязанным (т.е. не присоединенным ковалентно). В некоторых вариантах осуществления свободный и несвязанный конец (или концы) дополнительно содержит кэп, содержащий подходящую функциональную группу, такую как алкил, алкилкарбоновая кислота или алкиламино. В некоторых вариантах осуществления каждый фрагмент PEG дополнительно содержит кэп, выбранный из группы, состоящей из  $-CH_3$ ,  $-CH_2CH_2CO_2H$ ,  $-CH_2CH_2NH_2$  и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления, когда фрагмент PEG является разветвленным, каждая ветвь содержит независимо выбранное количество единиц PEG, например, представляет собой одинаковые или разные химические фрагменты, например, имеющие различную среднюю молекулярную массу или количество единиц PEG.

В некоторых вариантах осуществления, представленных в настоящем документе, единица PEG содержит две мономерные цепи полиэтиленгликоля, присоединенные друг к другу посредством элементов, не являющихся PEG, которые не являются частью повторяющейся структуры PEG, таких как амидогруппа или группа мочевины.

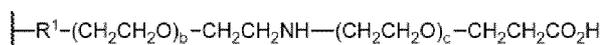
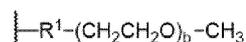
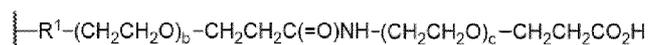
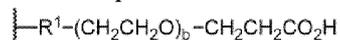
В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ содержит монодисперсный фрагмент от PEG2 до PEG72. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ содержит монодисперсный фрагмент от PEG4 до PEG48. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ содержит монодисперсный фрагмент от PEG8 до PEG48. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ содержит монодисперсный разветвленный фрагмент от PEG20 до PEG76; и при этом каждая ветвь содержит по меньшей мере единицу PEG2. В некоторых вариантах осуществления каждый монодисперсный разветвленный фрагмент от PEG20 до PEG76 содержит от 2 до 8 ветвей. В некоторых вариантах осуществления каждый монодисперсный разветвленный фрагмент от PEG20 до PEG76 содержит от 2 до 4 ветвей. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой фрагмент  $PEG4(PEG8)_3$  или  $PEG4(PEG24)_3$ .

В некоторых вариантах осуществления фрагмент PEG содержит одну или более линейных цепей полиэтиленгликоля, каждая из которых имеет по меньшей мере 8 субъединиц, по меньшей мере 9 субъединиц, по меньшей мере 10 субъединиц, по меньшей мере 11 субъединиц, по меньшей мере 12 субъединиц, по меньшей мере 13 субъединиц, по меньшей мере 14 субъединиц, по меньшей мере 15 субъединиц, по меньшей мере 16 субъединиц, по меньшей мере 17 субъединиц, по меньшей мере 18 субъединиц, по меньшей мере 19 субъединиц, по меньшей мере 20 субъединиц, по меньшей мере 21 субъединицу, по меньшей мере 22 субъединицы, по меньшей мере 23 субъединицы или по меньшей мере 24 субъединицы. В некоторых вариантах осуществления фрагмент PEG содержит в общей сложности по меньшей мере 8 субъединиц, по меньшей мере 10 субъединиц или по меньшей мере 12 субъединиц. В некоторых таких вариантах осуществления фрагмент PEG

содержит в общей сложности не более чем около 72 субъединиц, предпочтительно не более чем в общей сложности около 36 субъединиц. В некоторых вариантах осуществления PEG содержит от около 8 до около 24 субъединиц (называемых от PEG8 до PEG24).

В некоторых вариантах осуществления фрагмент ПЭГ содержит в общей сложности от 8-72, 8-60, 8-48, 8-36 или 8-24 субъединиц, 9-72, 9-60, 9-48, 9-36 или 9-24 субъединиц, 10-72, 10-60, 10-48, 10-36 или 10-24 субъединиц, 11-72, 11-60, 11-48, 11-36 или 11-24 субъединиц, 12-72, 12-60, 12-48, 12-36 или 12-24 субъединиц, 13-72, 13-60, 13-48, 13-36 или 13-24 субъединиц, 14-72, 14-60, 14-48, 14-36 или 14-24 субъединиц, 15-72, 15-60, 15-48, 15-36 или 15-24 субъединиц, 16-72, 16-60, 16-48, 16-36 или 16-24 субъединиц, 17-72, 17-60, 17-48, 17-36 или 17-24 субъединиц, 18-72, 18-60, 18-48, 18-36 или 18-24 субъединиц, 19-72, 19-60, 19-48, 19-36 или 19-24 субъединиц, 20-72, 20-60, 20-48, 20-36 или 20-24 субъединиц, 21-72, 21-60, 21-48, 21-36 или 21-24 субъединиц, 22-72, 22-60, 22-48, 22-36 или 22-24 субъединиц, 23-72, 23-60, 23-48, 23-36 или 23-24 субъединиц, или 24-72, 24-60, 24-48, 24-36 или 24 субъединиц.

Иллюстративные линейные фрагменты PEG включают:



где R<sup>1</sup> представляет собой C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкилен, необязательно прерванный одним из -NH-, C(=O)-, -C(=O)NH-, -NH- или -O-, и необязательно замещенный -CO<sub>2</sub>H (как определено для расщепляемого фрагмента); и где ~~~~ указывает место ковалентного присоединения к расщепляемому фрагменту, каждый индекс b находится в диапазоне от 2 до 72, а каждый индекс c находится в диапазоне от 1 до 72.

В некоторых вариантах осуществления индекс b находится в диапазоне от 6 до 72. В некоторых вариантах осуществления индекс b находится в диапазоне от 8 до 72. В некоторых вариантах осуществления индекс b находится в диапазоне от 10 до 72. В некоторых вариантах осуществления индекс b находится в диапазоне от 12 до 72. В некоторых вариантах осуществления индекс b находится в диапазоне от 6 до 24. В некоторых вариантах осуществления индекс b находится в диапазоне от 8 до 24. В некоторых вариантах осуществления индекс b находится в диапазоне от 12 до 36. В некоторых вариантах осуществления индекс b находится в диапазоне от 24 до 48. В некоторых вариантах осуществления индекс b находится в диапазоне от 36 до 72. В некоторых вариантах осуществления индекс b составляет около 8, около 12 или около 24.

В некоторых вариантах осуществления индекс c находится в диапазоне от 1 до 36. В некоторых вариантах осуществления индекс c находится в диапазоне от 1 до 24. В некоторых вариантах осуществления индекс c находится в диапазоне от 1 до 12. В некоторых вариантах осуществления индекс c находится в диапазоне от 1 до 8. В некоторых

вариантах осуществления индекс  $s$  находится в диапазоне от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления индекс  $s$  составляет около 1, около 2 или около 2.

В некоторых вариантах осуществления сумма индекса  $b$  и индекса  $c$  ( $b+c$ ) находится в диапазоне от 6 до 72. В некоторых вариантах осуществления сумма индекса  $b$  и индекса  $c$  ( $b+c$ ) находится в диапазоне от 8 до 72. В некоторых вариантах осуществления сумма индекса  $b$  и индекса  $c$  ( $b+c$ ) находится в диапазоне от 10 до 72. В некоторых вариантах осуществления сумма индекса  $b$  и индекса  $c$  ( $b+c$ ) находится в диапазоне от 12 до 72. В некоторых вариантах осуществления сумма индекса  $b$  и индекса  $c$  ( $b+c$ ) находится в диапазоне от 6 до 24. В некоторых вариантах осуществления сумма индекса  $b$  и индекса  $c$  ( $b+c$ ) находится в диапазоне от 8 до 24. В некоторых вариантах осуществления сумма индекса  $b$  и индекса  $c$  ( $b+c$ ) находится в диапазоне от 12 до 36. В некоторых вариантах осуществления сумма индекса  $b$  и индекса  $c$  ( $b+c$ ) находится в диапазоне от 24 до 48. В некоторых вариантах осуществления сумма индекса  $b$  и индекса  $c$  ( $b+c$ ) находится в диапазоне от 36 до 72. В некоторых вариантах осуществления сумма индекса  $b$  и индекса  $c$  ( $b+c$ ) составляет около 8, около 12 или около 24.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент ПЭГ составляет от около 300 дальтон до около 5000 дальтон; от около 300 дальтон до около 4000 дальтон; от около 300 дальтон до около 3000 дальтон; от около 300 дальтон до около 2000 дальтон; от около 300 дальтон до около 1000 дальтон; или любое значение между ними. В некоторых таких аспектах фрагмент ПЭГ имеет по меньшей мере 8, 10 или 12 субъединиц. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ имеет по меньшей мере 8, 10 или 12 субъединиц, но не более 72 субъединиц, предпочтительно не более 36 субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления, кроме фрагмента ПЭГ, ковалентно связанного с расщепляемым фрагментом, в антителах, описанных в настоящем документе, не присутствуют другие ПЭГ.

В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой монодисперсный поликетальный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой полидисперсный поликетальный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый поликетальный фрагмент содержит дискретные поликетали. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой поликетальную группу, содержащую 2-10 кетальных единиц, 5-10 кетальных единиц, 5-15 кетальных единиц, 10-20 кетальных единиц или любое промежуточное значение.

В некоторых вариантах осуществления один конец поликетального фрагмента напрямую присоединен к антителу MEF через расщепляемый фрагмент, а другой конец (или концы в случае разветвленного поликетального фрагмента) является свободным и несвязанным (т.е. не присоединенным ковалентно). В некоторых вариантах осуществления свободный и несвязанный конец (или концы) дополнительно содержит кэп, содержащий подходящую функциональную группу, такую как алкил, алкилкарбоновая кислота или алкиламино. В некоторых вариантах осуществления каждый поликетальный фрагмент дополнительно содержит кэп, выбранный из группы, состоящей из  $-CH_3$ ,  $-CH_2CH_2CO_2H$ , -

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$  и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления, когда поликетальный фрагмент является разветвленным, каждая ветвь содержит независимо выбранное количество поликетальных единиц, например, представляет собой одинаковые или разные химические фрагменты, например, имеющие различную среднюю молекулярную массу или количество поликетальных единиц.

В некоторых вариантах осуществления, представленных в настоящем документе, поликетальная единица содержит две мономерные поликетальные цепи, присоединенные друг к другу посредством неполикетальных элементов и которые не являются частью повторяющейся поликетальной структуры.

В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой монодисперсный полиглицериновый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой полидисперсный полиглицериновый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый полиглицериновый фрагмент содержит дискретные полиглицерины. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой полиглицериновый фрагмент, содержащий 2-48 глицериновых единиц, 2-6 глицериновых единиц, 2-12 глицериновых единиц, 6-18 глицериновых единиц, 12-24 глицериновых единиц, 18-36 глицериновых единиц, 24-48 глицериновых единиц или любое промежуточное значение.

В некоторых вариантах осуществления один конец полиглицеринового фрагмента напрямую присоединен к антители МЕФ через расщепляемый фрагмент, а другой конец (или концы в случае разветвленных полиглицериновых фрагментов) является свободным и несвязанным (т.е. не присоединенным ковалентно). В некоторых вариантах осуществления свободный и несвязанный конец (или концы) дополнительно содержит кэп, содержащий подходящую функциональную группу, такую как алкил, алкилкарбоновая кислота или алкиламино. В некоторых вариантах осуществления каждый полиглицериновый фрагмент дополнительно содержит кэп, выбранный из группы, состоящей из  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$  и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления, когда полиглицериновый фрагмент является разветвленным, каждая ветвь содержит независимо выбранное количество полиглицериновых единиц, например, представляет собой одинаковые или разные химические фрагменты, например, имеющие различную среднюю молекулярную массу или количество полиглицериновых единиц.

В некоторых вариантах осуществления, представленных в настоящем документе, полиглицериновая единица содержит две мономерные полиглицериновые цепи, прикрепленные друг к другу посредством неполиглицериновых элементов, которые не являются частью повторяющейся полиглицериновой структуры.

В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой монодисперсный полисахаридный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой полидисперсный полисахаридный фрагмент. В

некоторых вариантах осуществления каждый полисахаридный фрагмент содержит дискретные полисахариды. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой полисахаридный фрагмент, содержащий 2-12 сахаридных единиц, 2-4 сахаридных единиц, 2-6 сахаридных единиц, 2-8 сахаридных единиц, 2-10 сахаридных единиц, 4-8 сахаридных единиц, 6-12 сахаридных единиц или любое промежуточное значение. Типичные группы сахаридов включают, помимо прочего, глюкозу, фруктозу, галактозу, глюкуроновую кислоту, сахарозу, лактозу, мальтозу, фруктозу, трегалозу, целлобиозу, маннозу, фукозу, декстран и любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления один конец полисахаридного фрагмента напрямую присоединен к антителу MEF через расщепляемый фрагмент, а другой конец (или концы в случае разветвленных полисахаридных фрагментов) является свободным и несвязанным (т.е. не присоединенным ковалентно). В некоторых вариантах осуществления одна или более гидроксильных групп на свободном и несвязанном конце (или концах) дополнительно содержат кэп, содержащий подходящую функциональную группу, такую как алкил, алкилкарбоновая кислота или алкиламино. В некоторых вариантах осуществления каждый полисахаридный фрагмент дополнительно содержит кэп, выбранный из группы, состоящей из  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$  и их комбинации, на одной или более гидроксильных группах.

В некоторых вариантах осуществления, когда полисахаридный фрагмент является разветвленным, каждая ветвь содержит независимо выбранное количество полисахаридных единиц, например, представляет собой одинаковые или разные химические фрагменты, например, имеющие различную среднюю молекулярную массу или количество полисахаридных единиц.

В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой монодисперсный полисаркозиновый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой полидисперсный полисаркозиновый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый полисаркозиновый фрагмент содержит дискретные полисаркозины. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой полисаркозиновый фрагмент, содержащий 2-36 единиц саркозина, 2-6 единиц саркозина, 2-8 единиц саркозина, 2-12 единиц саркозина, 4-12 единиц саркозина, 6-12 единиц саркозина, 6-18 единиц саркозина, 12-24 единиц саркозина, 18-30 единиц саркозина, 24-36 единиц саркозина, 30-42 единиц саркозина, 36-48 единиц саркозина или любое промежуточное значение.

В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой монодисперсный полипептидный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой полидисперсный полипептидный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой полипептидный фрагмент, содержащий 3-12 аминокислот, 4-10 аминокислот, 4-8 аминокислот, 5-12 аминокислот, 6-15 аминокислот, 15-50 аминокислот, 15-40 аминокислот, аминокислоты, 15-30 аминокислот, 15-25 аминокислот, 15-20 аминокислот, 20-30 аминокислот, 25-35

аминокислот, 30-40 аминокислот, 35-45 аминокислот, 45-50 аминокислот, 25-40 аминокислот или любое промежуточное значение.

В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой монодисперсный полицивтерсионный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ представляет собой полидисперсный полицивтерсионный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления каждый полицивтерсионный фрагмент содержит дискретные полицивтерсионные единицы. См. Laschewsky.

В некоторых вариантах осуществления антитело к МЕФ, описанное в настоящем документе, представляет собой терапевтическое антитело. Помимо самого антитела, антитела МЕФ, описанные в настоящем документе, не содержат терапевтического фрагмента, т.е. антитела не содержат лекарственного средства. Аналогично, никакое лекарственное средство не присоединяется к какой-либо расщепляемой группе, и никакое лекарственное средство не присоединяется к какому-либо ВРМ. Более того, расщепляемые фрагменты, ВРМ, а также их фрагменты и метаболиты, независимо от того, присоединены ли они к антителу МЕФ или после отщепления от антитела МЕФ, являются терапевтически инертными, то есть они не оказывают терапевтического эффекта на субъекта. Во многих случаях антитела, описанные в настоящем документе, не являются конъюгатами антитело-лекарственное средство.

В НЕКОТОРЫХ ВАРИАНТАХ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ПРЕДЛОЖЕНО АНТИТЕЛУ МЕФ, ИМЕЮЩЕЕ СТРУКТУРУ ФОРМУЛЫ (I):



где: каждый S\* представляет собой атом серы из остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела МЕФ; каждый X представляет собой расщепляемый фрагмент; каждый ВРМ содержит полиэтиленгликолевый фрагмент, поликетальный фрагмент, полиглицериновый фрагмент, полисахаридный фрагмент, полисаркозиновый фрагмент, полипептидный фрагмент или полицивтерсионный фрагмент; нижний индекс p равен 2, 4, 6 или 8; и

Ab представляет собой оставшуюся часть антитела.

Следует понимать, что антитело из описанных в настоящем документе антител МЕФ представляет собой антитело в форме остатка, так что «Ab» в представленных в настоящем документе структурах включает структуру антитела МЕФ.

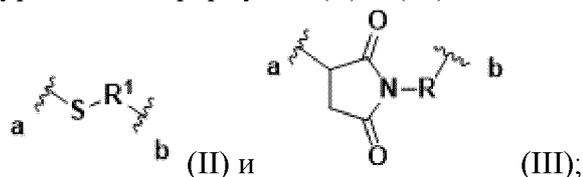
В некоторых вариантах осуществления индекс p представляет собой 2. В некоторых вариантах осуществления индекс p представляет собой 4. В некоторых вариантах осуществления индекс p представляет собой 6. В некоторых вариантах осуществления индекс p представляет собой 8.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент образован из фрагмента акцептора Михаэля. «Акцептор Михаэля», используемый в настоящем документе, относится к  $\alpha,\beta$ -ненасыщенным электрофилам, включая, помимо прочего,  $\alpha,\beta$ -ненасыщенные карбонилы (включая пиридазиндионы),  $\alpha,\beta$ -ненасыщенные сульфонилов,  $\alpha,\beta$ -ненасыщенные нитросы,  $\alpha,\beta$ -ненасыщенные нитрилы, 5-метилпирролоны. В некоторых

вариантах осуществления акцептор Михаэля образуется, например, из малеимида, который при присоединении Михаэля образует сукцинимид. В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент образован из броммалеимида или сульфона.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент образуется из атома серы цистеинтиола из восстановленной межцепочечной дисульфидной связи в антителе MEF, как описано в настоящем документе, и второго атома серы, присоединенного к ВРМ, тем самым образуя дисульфидную связь (-S-S-).

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент выбран из структур согласно формулам (II) и (III):

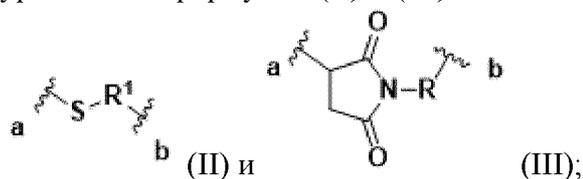


$R^1$  представляет собой  $C_2$ - $C_{12}$  алкилен, необязательно прерванный одним из -NH-C(=O)-, -C(=O)NH-, -NH- и -O-;

R отсутствует или представляет собой  $C_1$ - $C_{12}$  алкилен, необязательно прерываемый одним или двумя фенилами, -NH-, -O-, амид, сложный эфир, тиоэфир, гидразон, имин, оксим, сульфат, сложный эфир фосфорной кислоты или ацеталь; и R необязательно замещен 1-3 заместителями, независимо выбранными из фенила, оксо и  $-CO_2R^A$ ;  $C_3$ - $C_6$  циклоалкилена; и фенил, необязательно замещенный 1-3 независимо выбранными  $C_1$ - $C_3$  алкокси; каждый  $R^A$  независимо представляет собой водород или  $C_1$ - $C_6$  алкил; каждый  $R^{1A}$  независимо представляет собой водород или  $C_1$ - $C_6$  алкил; где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы антитела (например, атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF); и

$\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение к ВРМ или остатку расщепляемого фрагмента, который сохраняет ковалентное присоединение к ВРМ.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент выбран из структур согласно формулам (II) и (III):



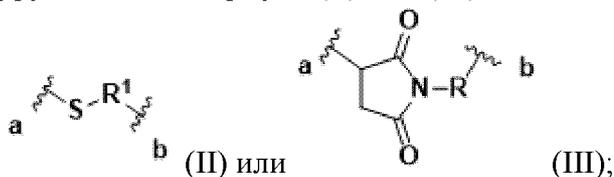
$R^1$  представляет собой  $C_2$ - $C_{12}$  алкилен, необязательно прерванный одним из -NH-C(=O)-, -C(=O)NH-, -NH- и -O-;

R отсутствует или представляет собой  $C_1$ - $C_{12}$  алкилен, необязательно прерванный -NH-C(=O)-, -C(=O)NH-, -NH-, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)O-, -S-C(=O)-, -C(=O)S-, -O-C(=O)O-, -C(=NR<sup>1A</sup>), ацеталь, -O(SO<sub>2</sub>)O-, -O-[P(=O)(-OH)]O-, -C(=N-OH)-, -C(=N-NH<sub>2</sub>)-, и -C(R<sup>1A</sup>)=N-NH-; и R необязательно замещен 1-3 заместителями, независимо выбранными из фенила,

оксо и  $-\text{CO}_2\text{R}^A$ ;  $\text{C}_3\text{-C}_6$  циклоалкилен; и фенил, необязательно замещенный 1-3 независимо выбранными  $\text{C}_1\text{-C}_3$  алкокси; каждый  $\text{R}^A$  независимо представляет собой водород или  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкил; каждый  $\text{R}^{1A}$  независимо представляет собой водород или  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкил; где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы антитела (например, атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF); и

$\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение к ВРМ или остатку расщепляемого фрагмента, который сохраняет ковалентное присоединение к ВРМ.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент имеет структуру согласно Формуле (II) или (III):

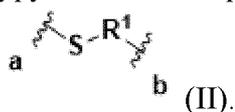


$\text{R}^1$  представляет собой  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$  алкилен, необязательно прерванный одним из  $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-$  и  $-\text{O}-$ ;

$\text{R}$  отсутствует или представляет собой  $\text{C}_1\text{-C}_{12}$  алкилен, необязательно прерванный одним или двумя из фенила,  $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{NR}^{1A})$ , ацеталя,  $-\text{O}(\text{SO}_2)\text{O}-$ ,  $-\text{O}-[\text{P}(=\text{O})(-\text{OH})]\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{N}-\text{OH})-$ ,  $-\text{C}(=\text{N}-\text{NH}_2)-$ , и  $-\text{C}(\text{R}^{1A})=\text{N}-\text{NH}-$ ; и  $\text{R}$  необязательно замещен 1-3 заместителями, независимо выбранными из фенила, оксо и  $-\text{CO}_2\text{R}^A$ ;  $\text{C}_3\text{-C}_6$  циклоалкилен; и фенил, необязательно замещенный 1-3 независимо выбранными  $\text{C}_1\text{-C}_3$  алкокси; каждый  $\text{R}^A$  независимо представляет собой водород или  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкил; каждый  $\text{R}^{1A}$  независимо представляет собой водород или  $\text{C}_1\text{-C}_6$  алкил; где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы антитела (например, цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF); и

$\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение к ВРМ или остатку расщепляемого фрагмента, который сохраняет ковалентное присоединение к ВРМ.

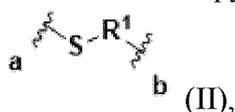
В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно Формуле (II):



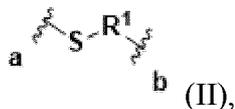
В некоторых вариантах осуществления,  $\text{R}^1$  представляет собой  $\text{C}_2\text{-C}_{12}$  алкилен, необязательно прерванный одним из  $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-$  или  $-\text{O}-$ , и необязательно замещенный  $-\text{CO}_2\text{H}$ . В некоторых вариантах осуществления,  $\text{R}^1$  представляет собой  $\text{C}_2\text{-C}_6$  алкилен, необязательно прерванный одним из  $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ , -

C(=O)NH-, -NH- или -O-, и необязательно замещенный -CO<sub>2</sub>H. В некоторых вариантах осуществления, R<sup>1</sup> прерывается на конце ( ~~~ (b)). В некоторых вариантах осуществления, R<sup>1</sup> представляет собой непрерывный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный -CO<sub>2</sub>H. В некоторых вариантах осуществления, R<sup>1</sup> представляет собой непрерывный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкилен. В некоторых вариантах осуществления, R<sup>1</sup> представляет собой непрерывный линейный C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, такой как н-пропил, н-бутил, н-пентил или н-гексил, необязательно замещенный -CO<sub>2</sub>H. В некоторых вариантах осуществления, R<sup>1</sup> представляет собой непрерывный линейный C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> алкилен. В некоторых вариантах осуществления, R<sup>1</sup> представляет собой непрерывный разветвленный C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> алкилен, необязательно замещенный -CO<sub>2</sub>H. В некоторых вариантах осуществления, R<sup>1</sup> замещен -CO<sub>2</sub>H. В некоторых вариантах осуществления, R<sup>1</sup> представляет собой непрерывный разветвленный C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> алкилен.

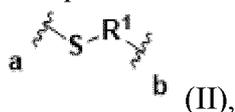
В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент представляет собой структуру формулы (II):



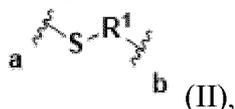
и индекс r равен 2. В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент представляет собой структуру формулы (II):



и индекс r равен 4. В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент представляет собой структуру формулы (II):

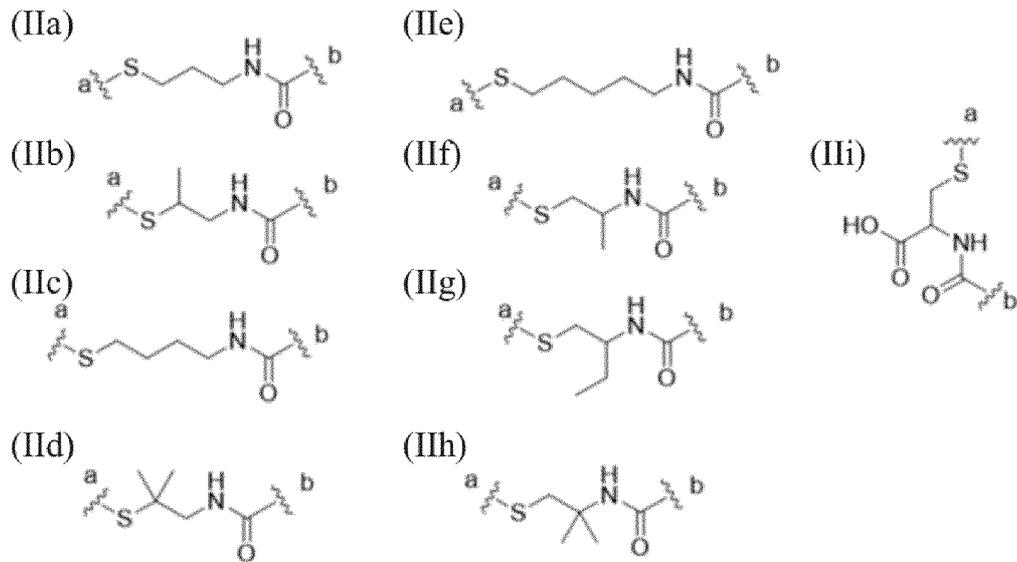


и индекс r равен 6. В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент представляет собой структуру формулы (II):



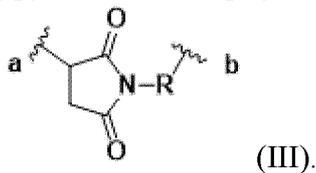
и индекс r равен 8.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент выбран из одной из структур (IIa-IIi), приведенных ниже, где ~~~ (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы антитела (например, атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF); и ~~~ (b) представляет собой ковалентное присоединение расщепляемого фрагмента к ВРМ.



В некоторых вариантах осуществления,  $R^1$  представляет собой  $C_2$ - $C_6$  алкилен, прерванный одним из  $-NH-C(=O)-$ ,  $-C(=O)NH-$ ,  $-NH-$  или  $-O-$ . В некоторых вариантах осуществления,  $R^1$  представляет собой  $C_2$ - $C_6$  алкилен, прерванный  $-NH-C(=O)-$  или  $-C(=O)NH-$ . В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой -этилен- $NH-C(=O)-$  или -этилен- $C(=O)NH-$ . В некоторых вариантах осуществления,  $R^1$  представляет собой  $-C_3$  алкилен  $-NH-C(=O)-$  или  $-C_3$  алкилен- $C(=O)NH-$ . В некоторых вариантах осуществления,  $R^1$  представляет собой  $-C_4$  алкилен- $NH-C(=O)-$  или  $-C_4$  алкилен- $C(=O)NH-$ .

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно Формуле (III):



В некоторых вариантах осуществления  $R$  отсутствует. В некоторых вариантах осуществления  $R$  представляет собой  $C_1$ - $C_{12}$  алкилен, необязательно прерванный одним или двумя фенилами,  $-NH-C(=O)-$ ,  $-C(=O)NH-$ ,  $-NH-$ ,  $-O-$ ,  $-O-C(=O)-$ ,  $-C(=O)O-$ ,  $-S-C(=O)-$ ,  $-C(=O)S-$ ,  $-O-C(=O)O-$ ,  $-C(=NR^{1A})$ , ацеталем, дипептидом,  $-O(SO_2)O-$ ,  $-O-[P(=O)(-OH)]O-$ ,  $-C(=N-OH)-$ ,  $-C(=N-NH_2)-$ , и  $-C(R^{1A})=N-NH-$ ; а  $R$  необязательно замещен 1-3 заместителями, независимо выбранными из фенила, оксо и  $-CO_2R^A$ ;  $C_3$ - $C_6$  циклоалкилена; а фенил, необязательно замещенный 1-3 независимо выбранными  $C_1$ - $C_3$  алкокси.

В некоторых вариантах осуществления  $R$  выбирают из  $C_1$ - $C_{12}$  алкилена, прерванного одним или двумя фенилами,  $-NH-C(=O)-$ ,  $-C(=O)NH-$ ,  $-NH-$ ,  $-O-$ ,  $-O-C(=O)-$ ,  $-C(=O)O-$ ,  $-S-C(=O)-$ ,  $-C(=O)S-$ ,  $-O-C(=O)O-$ ,  $-C(=NR^{1A})$ , ацеталем, дипептидом,  $-O(SO_2)O-$ ,  $-O-[P(=O)(-OH)]O-$ ,  $-C(=N-OH)-$ ,  $-C(=N-NH_2)-$ , и  $-C(R^{1A})=N-NH-$ ; а  $R$  необязательно замещен 1-3 заместителями, независимо выбранными из фенила, оксо и  $-CO_2R^A$ ;  $C_3$ - $C_6$  циклоалкилена; а фенил, необязательно замещенный 1-3 независимо выбранными  $C_1$ - $C_3$  алкокси.

В некоторых вариантах осуществления  $R$  выбирают из  $C_1$ - $C_{12}$  алкилена,

необязательно прерванный одним или двумя фенилами,  $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{NR}^{1\text{A}})$ , ацеталем, дипептидом,  $-\text{O}(\text{SO}_2)\text{O}-$ ,  $-\text{O}-[\text{P}(=\text{O})(-\text{OH})]\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{N}-\text{OH})-$ ,  $-\text{C}(=\text{N}-\text{NH}_2)-$ , и  $-\text{C}(\text{R}^{1\text{A}})=\text{N}-\text{NH}-$ ; а R необязательно замещен 1-3 заместителями, независимо выбранными из фенила, оксо и  $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{A}}$ ;  $\text{C}_3-\text{C}_6$  циклоалкилена; а фенил, необязательно замещенный 1-3 независимо выбранными  $\text{C}_1-\text{C}_3$  алкокси.

В некоторых вариантах осуществления R выбирают из  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$  алкилена прерванного одним или двумя фенилами,  $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{NR}^{1\text{A}})$ , ацеталем, дипептидом,  $-\text{O}(\text{SO}_2)\text{O}-$ ,  $-\text{O}-[\text{P}(=\text{O})(-\text{OH})]\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{N}-\text{OH})-$ ,  $-\text{C}(=\text{N}-\text{NH}_2)-$ , и  $-\text{C}(\text{R}^{1\text{A}})=\text{N}-\text{NH}-$ ; а R необязательно замещен 1-3 заместителями, независимо выбранными из фенила, оксо и  $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{A}}$ ;  $\text{C}_3-\text{C}_6$  циклоалкилена; а фенил, необязательно замещенный 1-3 независимо выбранными  $\text{C}_1-\text{C}_3$  алкокси.

В некоторых вариантах осуществления R выбирают из  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$  алкилена, прерванного фенилом,  $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{NR}^{1\text{A}})$ , ацеталем, дипептидом  $-\text{O}(\text{SO}_2)\text{O}-$ ,  $-\text{O}-[\text{P}(=\text{O})(-\text{OH})]\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{N}-\text{OH})-$ ,  $-\text{C}(=\text{N}-\text{NH}_2)-$  или  $-\text{C}(\text{R}^{1\text{A}})=\text{N}-\text{NH}-$ .

В некоторых вариантах осуществления R выбирают из  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$  алкилена прерванного двумя группами, независимо выбранными из фенила,  $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{NR}^{1\text{A}})$ , ацетала, дипептида,  $-\text{O}(\text{SO}_2)\text{O}-$ ,  $-\text{O}-[\text{P}(=\text{O})(-\text{OH})]\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{N}-\text{OH})-$ ,  $-\text{C}(=\text{N}-\text{NH}_2)-$ , и  $-\text{C}(\text{R}^{1\text{A}})=\text{N}-\text{NH}-$ . В некоторых вариантах осуществления R выбирают из  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$  алкилена прерванного двумя группами, независимо выбранными из фенила,  $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{S}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{S}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{NR}^{1\text{A}})$ , ацетала,  $-\text{O}(\text{SO}_2)\text{O}-$ ,  $-\text{O}-[\text{P}(=\text{O})(-\text{OH})]\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{N}-\text{OH})-$ ,  $-\text{C}(=\text{N}-\text{NH}_2)-$  и  $-\text{C}(\text{R}^{1\text{A}})=\text{N}-\text{NH}-$ ; а R замещен 1 или 2 оксогруппами.

В некоторых вариантах осуществления R представляет собой  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$  алкилен, необязательно замещенный 1-3 заместителями, независимо выбранными из фенила и  $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{A}}$ . В некоторых вариантах осуществления R представляет собой незамещенный  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$  алкилен. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$  алкилен, замещенный 1-3 заместителями, независимо выбранными из фенила и  $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{A}}$ . В некоторых вариантах осуществления R представляет собой  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$  алкилен, замещенный двумя или тремя фенильными группами. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$  алкилен, замещенный двумя фенильными группами и  $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{A}}$ .

В некоторых вариантах осуществления  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$  алкилен представляет собой  $\text{C}_2-\text{C}_6$  алкилен. В некоторых вариантах осуществления  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$  алкилен представляет собой  $\text{C}_2$  алкилен,  $\text{C}_3$  алкилен,  $\text{C}_4$  алкилен,  $\text{C}_5$  алкилен,  $\text{C}_6$  алкилен,  $\text{C}_7$  алкилен или  $\text{C}_8$  алкилен. В некоторых вариантах осуществления  $\text{C}_1-\text{C}_{12}$  алкилен представляет собой  $\text{C}_2$  алкилен,  $\text{C}_3$  алкилен или  $\text{C}_4$  алкилен. В некоторых вариантах осуществления алкилен является разветвленным, например 2-пропил, 2-гексил, 3-пентанил или трет-бутил. В некоторых вариантах осуществления алкилен имеет неразветвленную цепь, например метилен, этилен, пропилен, бутилен, пентилен или гексилен.

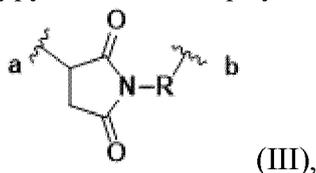
В некоторых вариантах осуществления R представляет собой C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкилен, такой как циклопропилен, циклобутилен, циклопентилен или циклогексилен.

В некоторых вариантах осуществления R представляет собой фенил, необязательно замещенный 1-3 независимо выбранными C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> алкокси. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой незамещенный фенил. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой фенил, замещенный 1-3 независимо выбранными C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> алкокси. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой 2,4,6-триметоксифенил.

В некоторых вариантах осуществления каждый R<sup>A</sup> представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления каждый R<sup>A</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил. В некоторых вариантах осуществления один или более R<sup>A</sup> представляет собой водород, а оставшиеся R<sup>A</sup> представляют собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил. В некоторых вариантах осуществления один или более R<sup>A</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, а оставшиеся R<sup>A</sup> представляют собой водород.

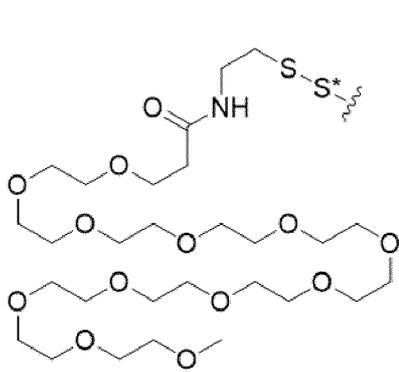
В некоторых вариантах осуществления каждый R<sup>1A</sup> представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления каждый R<sup>1A</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил. В некоторых вариантах осуществления один или более R<sup>1A</sup> представляет собой водород, а оставшиеся R<sup>1A</sup> представляют собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил. В некоторых вариантах осуществления один или более R<sup>1A</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, а оставшиеся R<sup>1A</sup> представляют собой водород.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент имеет структуру согласно Формуле (III):

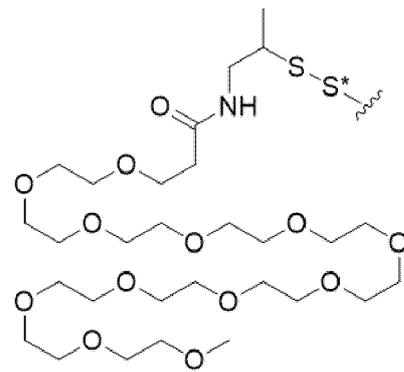


и дополнительно содержит функциональную группу, выбранную из сложного эфира, карбоната, амида, имида, ацетала, дипептида, сульфата, сложного фосфатного эфира, оксима, тиоэфира и гидразона, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутая функциональная группа способна расщепляться путем гидролиза, что приводит к потере соответствующего ВРМ, при этом вышеупомянутая функциональная группа содержит остальную часть расщепляемого фрагмента. В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент дополнительно содержит гидразон.

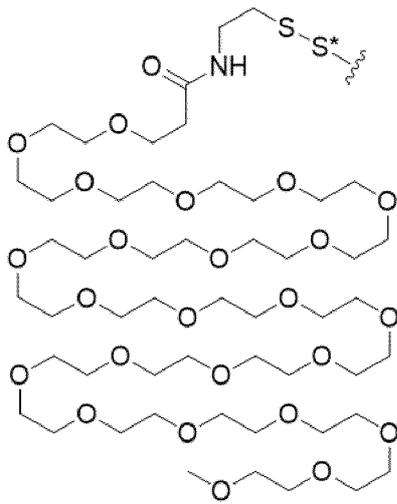
В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ и расщепляемый фрагмент вместе с атомом серы антитела (например, атомом серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела МЕФ, как описано в настоящем документе) имеет структуру согласно любому из вариантов осуществления формул (IIj-III):



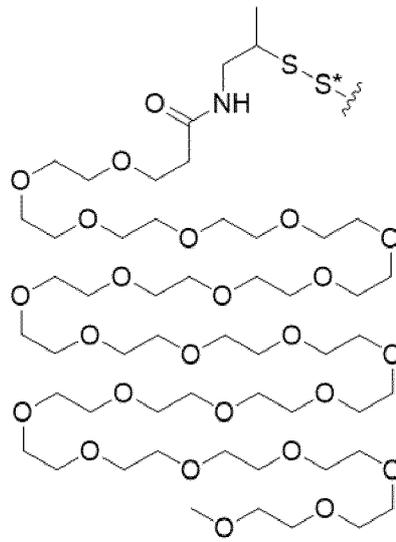
(IIj),



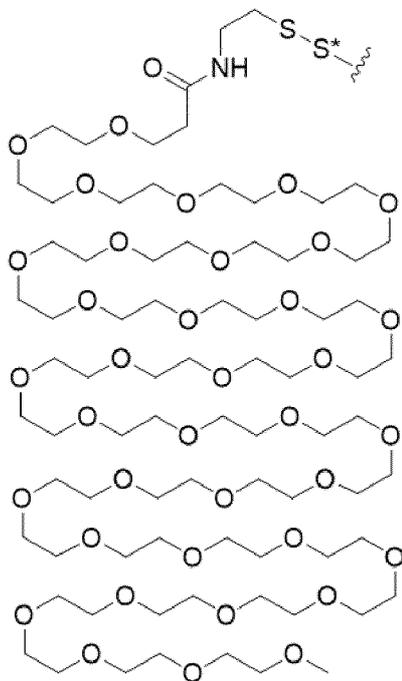
(IIk),



(III),



(IIm), и

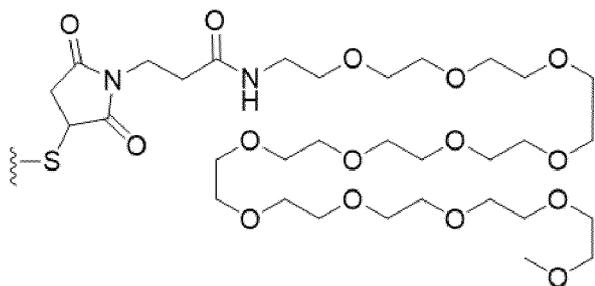


(IIIn);

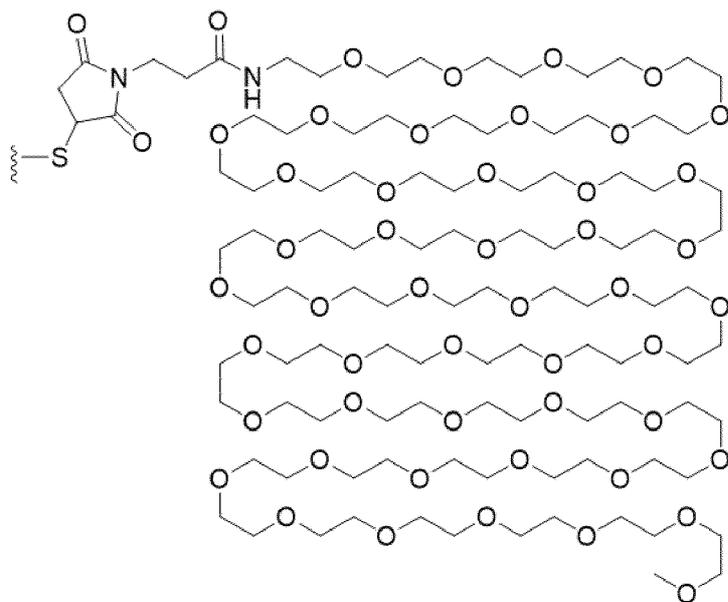
где S\* представляет собой атом серы антитела (например, атом серы из цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF); и где  $\sim$  указывает на ковалентное присоединение к остальной части антитела MEF.

В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ и расщепляемый фрагмент вместе с атомом серы антитела (например, атомом серы цистеинового остатка

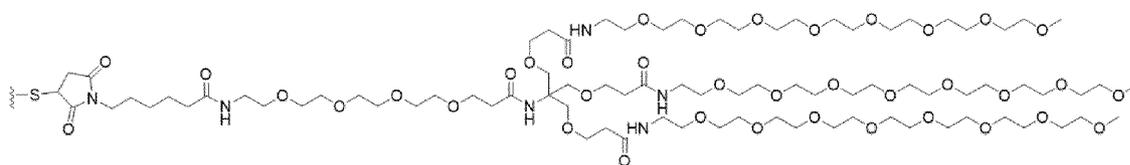
восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF) имеет структуру любой из формул (IIIa)-(IIIg):



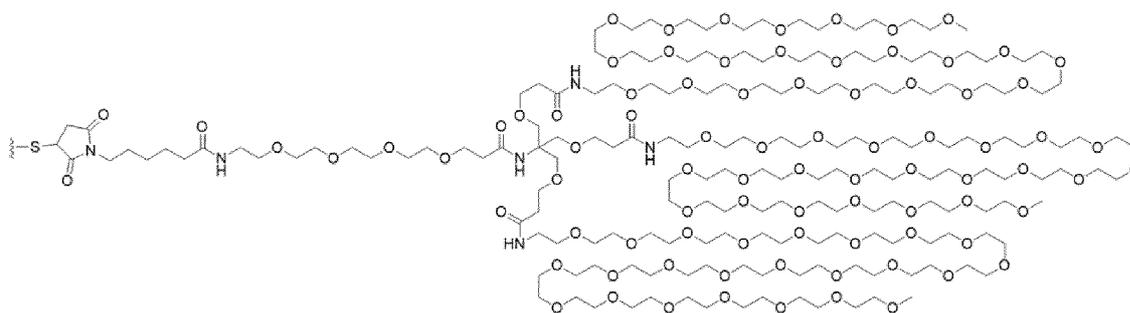
(IIIa),



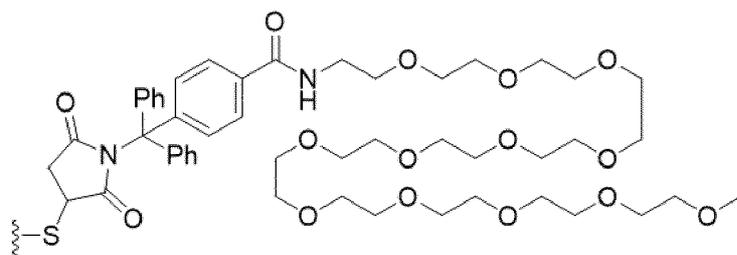
(IIIb),



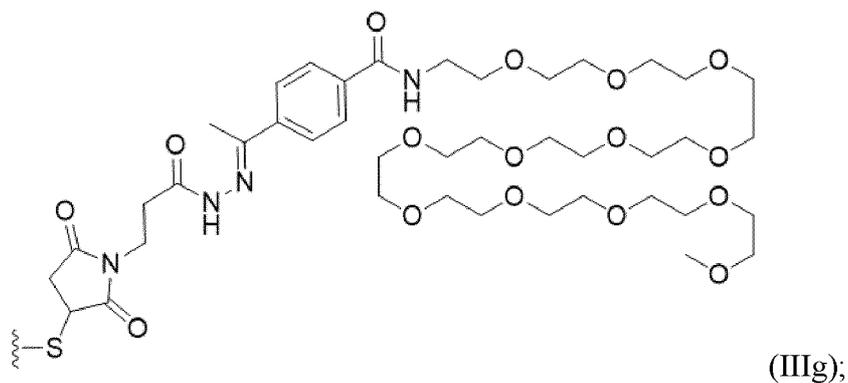
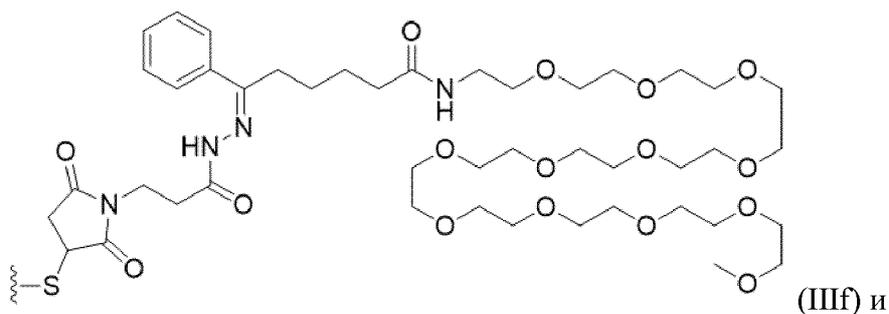
(IIIc),



(IIId),

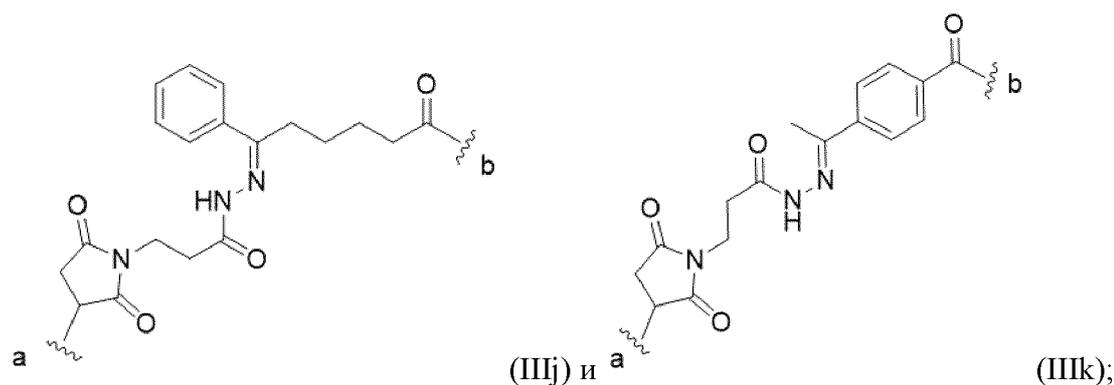
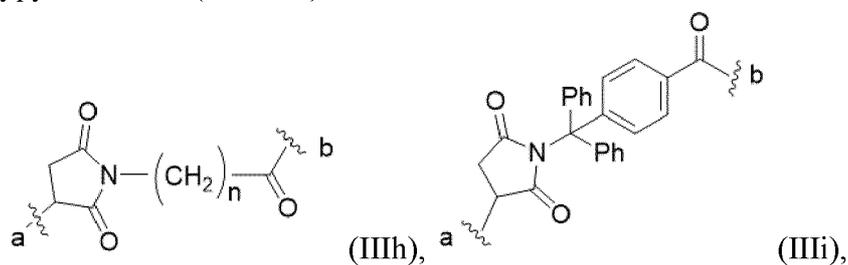


(IIIe),



где  $\sim$  указывает на ковалентное присоединение к атому серы антитела (например, оставшейся части цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF).

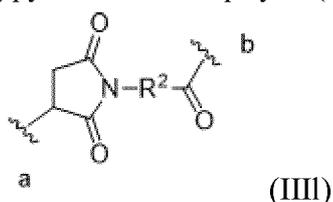
В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру любой из (IIIh-IIIk):



где индекс  $n$  представляет собой целое число от 2 до 8;

$\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы антитела (например, атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF); и  $\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение расщепляемого фрагмента к ВРМ.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно Формуле (III):



где:

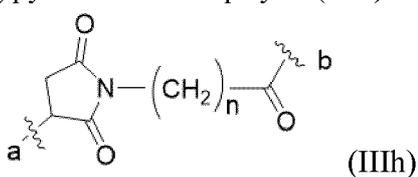
$R^2$  представляет собой  $C_1-C_{15}$  алкил, необязательно замещенный одним или более гидроксильной группой, галогеном,  $-CN$ ,  $C_1-C_6$  алкилом,  $C_1-C_6$  алкенилом,  $C_1-C_6$  алкинилом,  $C_1-C_6$  алкоксилем,  $C_1-C_6$  тиоалкокси,  $-C_1-C_6$  циклоалкилом,  $-NR^3R^4$ ,  $-C(=O)-R^3$ ,  $-C(=O)-OR^5$ , PEG2-PEG72 или их комбинацией;

$R^3$  и  $R^4$  каждый независимо выбирают из группы, состоящей из H,

~~~~ (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы антитела (например, атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF); и

~~~~ (b) представляет собой ковалентное присоединение к ВРМ. В некоторых вариантах осуществления,  $R^2$  представляет собой  $C_1-C_{15}$  алкил, необязательно замещенный одним или более гидроксильной группой, галогеном,  $-CN$ ,  $C_1-C_6$  алкилом,  $C_1-C_6$  алкоксилем или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления,  $R^2$  представляет собой  $C_1-C_{12}$  алкил, необязательно замещенный одним или более гидроксильной группой, галогеном,  $-CN$ ,  $C_1-C_3$  алкилом,  $C_1-C_3$  алкоксилем или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления,  $R^2$  представляет собой  $C_1-C_{12}$  алкил, необязательно замещенный одним или более гидроксильной группой, галогеном или  $C_1-C_3$  алкилом.

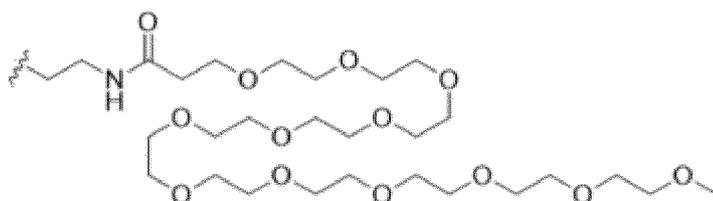
В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент имеет структуру согласно Формуле (IIIh):



где индекс n представляет собой целое число от 2 до 8; и

где ~~~~ (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы антитела (например, атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF); и ~~~~ (b) представляет собой ковалентное присоединение расщепляемого фрагмента к ВРМ.

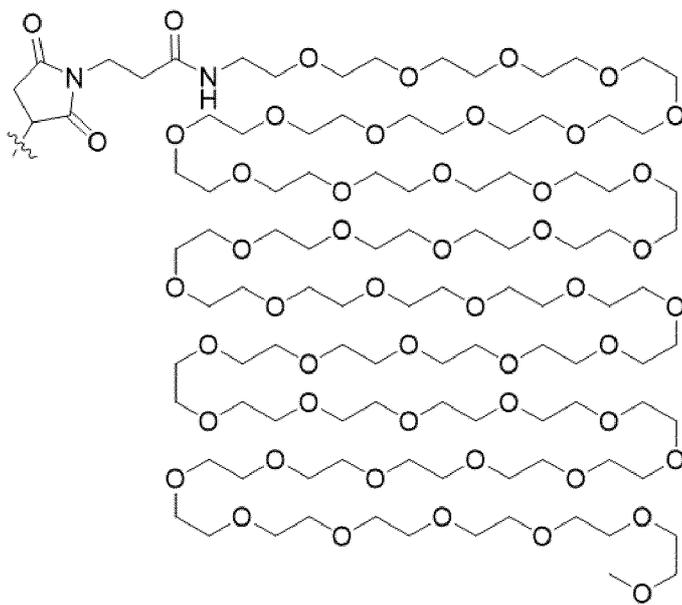
В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ имеет структуру согласно Формуле (IVa):



(IVa)

где  $\sim$  представляет собой ковалентное присоединение к расщепляемому фрагменту.

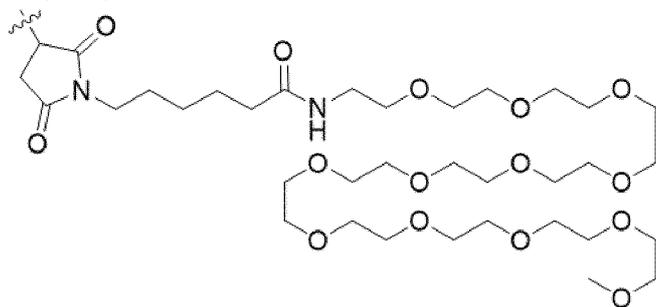
В некоторых вариантах осуществления фрагмент -X-ВРМ имеет структуру согласно Формуле (IIIb):



(IIIb)

где  $\sim$  представляет собой ковалентное присоединение к S\*.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент -X-ВРМ имеет структуру согласно Формуле (IIIм):



формула (IIIм)

где  $\sim$  представляет собой ковалентное присоединение к S\*.

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, как описано в настоящем документе, содержит ВРМ, ковалентно прикрепленные преимущественно в шарнирной области антитела, например, более 50% ВРМ ковалентно присоединены в шарнирной области, более 75% ВРМ ковалентно присоединены в шарнирной области, или более 90% ВРМ ковалентно присоединены в шарнирной области. В некоторых вариантах

осуществления антитело MEF, как описано в настоящем документе, содержит ВРМ, ковалентно прикрепленные преимущественно в области Fab антитела, например, более 50% ВРМ ковалентно присоединены в области Fab, более 75% ВРМ ковалентно присоединены в области Fab, или более 90% ВРМ ковалентно присоединены в области Fab. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, как описано в настоящем документе, содержит ВРМ, ковалентно присоединенные только в шарнирной области антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, как описано в настоящем документе, содержит ВРМ, ковалентно присоединенные только к области Fab антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, представляет собой антитело IgG<sub>1</sub>. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, представляет собой антитело IgG<sub>2</sub>. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, представляет собой антитело IgG<sub>3</sub>. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, представляет собой антитело IgG<sub>4</sub>. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, представляет собой моноспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, представляет собой мультиспецифическое (например, биспецифическое) антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, представляет собой поликлональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой гуманизованное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитела MEF, описанные в настоящем документе, присутствуют в форме соли. В некоторых вариантах осуществления антитела MEF, описанные в настоящем документе, присутствуют в форме фармацевтически приемлемой соли.

#### ***Мишени антитела***

Различные аспекты настоящего изобретения обеспечивают антитела MEF, сконфигурированные для связывания с рядом целевых видов. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF связывается с раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF связывается с антигеном раковой клетки, который находится на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF связывается с иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF связывается с антигеном иммунной клетки, который находится на поверхности иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, направлены против антигена раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления антитела направлены против бактериального антигена. В некоторых вариантах осуществления антитела направлены против антигена, родственного вирусу. В

некоторых вариантах осуществления антитела направлены против антигена иммунных клеток.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает функционально активный фрагмент, производное или аналог антитела, которое иммуноспецифично связывается с клетками-мишенями (например, антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами) или другими антителами, связанными с опухолевыми клетками или матриксом. В этом отношении «функционально активный» означает, что фрагмент, производное или аналог способны иммуноспецифически связываться с целевыми клетками. Антигенная специфичность антител определяется аминокислотной последовательностью их области, определяющей комплементарность (CDR). Чтобы определить, какие последовательности CDR связывают антиген, как правило используют синтетические пептиды, содержащие последовательности CDR, в анализе связывания с антигеном любым методом анализа связывания, известным в данной области техники (например, анализ BIA) (см., например, Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md; Kabat E *et al.*, 1980, *J. Immunology* 125(3):961-969).

Кроме того, применимыми антителами являются рекомбинантные антитела, такие как химерные и гуманизированные моноклональные антитела, содержащие как человеческие, так и нечеловеческие части, которые как правило получают, используя стандартные технологии рекомбинантных ДНК. Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части происходят от разных видов животных, например, имеющие переменную область, происходящую от мышинового моноклонального и человеческого иммуноглобулина. См., например, патент США № 4816567; и патент США № 4816397, которые полностью в настоящий документ посредством ссылки. Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител от видов, отличных от человека, имеющие одну или несколько областей, определяющих комплементарность (CDR) от видов, отличных от человека, и каркасную область из молекулы иммуноглобулина человека. (См., например, патент США № 5585089, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.) Такие химерные и гуманизированные моноклональные антитела можно получить с помощью методов рекомбинантной ДНК, известных в данной области, например, с использованием способов, описанных в Berter *et al.*, 1988, *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura *et al.*, 1987, *Cancer. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.*, 1985, *Nature* 314:446-449 и Shaw *et al.*, 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, 1985, *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4:214; патент США № 5,225,539; Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.*, 1988, *Science* 239:1534; и Beidler *et al.*, 1988, *J. Immunol.* 141:4053-4060; каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Применимые поликлональные антитела представляют собой гетерогенные

популяции молекул антител, полученные из сыворотки иммунизированных животных. Применимые моноклональные антитела представляют собой гомогенные популяции антител к конкретной антигенной детерминанте (например, антигену раковой клетки, вирусному антигену, микробному антигену, белку, пептиду, углеводу, химическому веществу, нуклеиновой кислоте или их фрагментам). Моноклональное антитело (mAb) к представляющему интерес антигену можно получить с использованием любого метода, известного в данной области техники, который предусматривает получение молекул антител с помощью непрерывных клеточных линий в культуре.

Применимые моноклональные антитела включают, но не ограничиваются этим, человеческие моноклональные антитела, гуманизированные моноклональные антитела или химерные человеческо-мышинные (или других видов) моноклональные антитела. Антитела включают полноразмерные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Человеческие моноклональные антитела можно получать любым из многочисленных способов, известных в данной области техники (например, Teng *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:7308-7312; Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4:72-79; and Olsson *et al.*, 1982, *Meth. Enzymol.* 92:3-16).

В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой полностью человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, получают с использованием трансгенных мышей, которые не способны экспрессировать эндогенные гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, но которые способны экспрессировать гены тяжелой и легкой цепей человека.

Антитела, иммуноспецифичные к антигену раковых клеток, коммерчески доступны или производятся любым способом, известным специалисту в данной области, таким как, например, методы химического синтеза или рекомбинантной экспрессии. Нуклеотидную последовательность, кодирующую антитела, иммуноспецифичные к антигену злокачественных клеток, получают коммерчески, например, из базы данных GenBank или подобной базы данных, литературных публикаций или путем обычного клонирования и секвенирования.

Антитело MEF может содержать модификацию, усиливающую его эффекторную функцию. Сочетание зависящего от времени ингибирования эффекторной функции (например, сайт-селективного ПЭГилирования, как раскрыто в вариантах осуществления в настоящем документе) с модификациями, усиливающими эффекторную функцию, может привести к контролируемому высокоэффективному лечению. Поскольку антитело, раскрытое в настоящем документе, может локализоваться в целевом участке, таком как конкретный тип раковой клетки, модификации, усиливающие эффекторную функцию, могут усиливать локализованные иммунные ответы во время лечения, тогда как зависящее от времени ингибирование эффекторной функции может предотвратить гиперактивацию иммунитета и вредные системные эффекты.

В некоторых случаях модификация, повышающая эффекторную функцию, включает

изменение гликозилирования. Во многих антителах (например, во многих антителах IgG) гликозилирование Fc-области влияет на связывание с широким спектром белков, которые могут изменять системный клиренс и иммунную активацию, включая FcR (например, FcγR), FcRns и белки комплемента. Во многих случаях изменение гликозилирования влияет не только на силу взаимодействий антитело-рецептор, но и на типы рецепторов, которые преимущественно связываются с антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, содержит одну или более фукозильных групп. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, является афукозилированным. В некоторых вариантах осуществления каждый ВРМ содержит одну или более фукозильных групп, но антитело MEF является афукозилированным (т.е. Без фукозильных групп, непосредственно присоединенных к антителу MEF). В некоторых случаях антитело MEF, описанное в настоящем документе, содержит одну или более галактозных групп. В некоторых случаях антитело MEF не содержит галактозной группы. В некоторых случаях антитело MEF сиалилировано (содержит фрагмент сиаловой кислоты). В некоторых случаях антитело MEF не сиалилировано.

В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, содержит одну или более мутаций в Fc-области (например, в каждой тяжелой цепи Fc-области); при этом антитело MEF, имеющее одну или более мутаций, обладает более высокой эффекторной функцией по сравнению с эквивалентным антителом без одной или более мутаций. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой антитело IgG<sub>1</sub>; и одна или более мутаций в Fc-области выбраны из группы, состоящей из S298A, E333A, K334A, S239D, I332E, G236A, S239E, A330L, G236A, L234Y, G236W, S296A, F243, R292P, Y300L, V305L и P396L. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций выбраны из: S298A/E333A/K334A, S239D/I332E, G236A/S239E/A330L/I332E, S239D/I332E, L234Y/G236W/S296A, G236A, F243, R292P, Y300L, V305L и P396L. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций представляют собой одну мутацию. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций представляют собой две мутации. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций представляют собой три мутации. В некоторых вариантах осуществления одна или более мутаций представляют собой четыре или более мутаций. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, содержащее одну или более мутаций в Fc-области, как описано в настоящем документе, представляет собой афукозилированное антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой известное антитело для лечения рака (например, антитело, одобренное FDA и/или EMA). Антитела, иммуноспецифичные относительно антигена раковой клетки, получают коммерческим путем или любым способом, известным специалисту в данной области техники, таким как, например, методы рекомбинантной экспрессии. Нуклеотидную последовательность, кодирующую антитела, иммуноспецифичные к антигену

злокачественных клеток, получают коммерчески, например, из базы данных GenBank или подобной базы данных, литературных публикаций или путем обычного клонирования и секвенирования.

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, используются для лечения аутоиммунного заболевания в соответствии с композициями и способами, описанными в настоящем документе. Антитела, иммуноспецифичные к антигену клетки, которая отвечает за выработку аутоиммунных антител, можно получить, если они недоступны коммерчески или иным образом, любым способом, известным специалисту в данной области, таким как, например, методы химического синтеза или рекомбинантной экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, предназначены для рецептора или рецепторного комплекса, экспрессируемого на активированном лимфоците. Рецептор или рецепторный комплекс может содержать член надсемейства генов иммуноглобулина, член надсемейства рецепторов TNF, интегрин, рецептор цитокинов, рецептор хемокинов, главный белок гистосовместимости, лектин или белок контроля комплемента.

Типовые антигены приведены ниже. Типовые антитела, которые связывают указанный антиген, приведены в скобках.

В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой опухолеассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой трансмембранный белок. Например, следующие антигены являются трансмембранными белками: ANTXR1, BAFF-R, CA9 (типичные антитела включают гирентуксимаб), CD147 (типичные антитела включают гавилимомаб и метузумаб), CD19, CD20 (типичные антитела включают дивозилимаб и ибритутумаб тиуксетан), CD274, также известный как PD-L1 (типичные антитела включают адебрелимаб, атезолизумаб, гаривулимаб, дурвалумаб и авелумаб), CD30 (типичные антитела включают иратумумаб и брентуксимаб), CD33 (типичные антитела включают линтузумаб), CD352, CD45 (типичные антитела включают апамистамаб), CD47 (типичные антитела включают летаплимаб и магролимаб), CLPTM1L, DPP4, EGFR, ERVMER34-1, FASL, FSHR, FZD5, FZD8, GUCY2C (типичные антитела включают индусатумаб), IFNAR1 (типичные антитела включают фаралимомаб), IFNAR2, LMP2, MLANA, SIT1, TLR2/4/1 (типичные антитела включают томаралимаб), TM4SF5, TMEM132A, TMEM40, UPK1B, VEGF и VEGFR2 (типичные антитела включают гентуксимаб).

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой трансмембранный транспортный белок. Например, следующие антигены являются трансмембранными транспортными белками: ASCT2 (типичные антитела включают идактамаб), MFSD13A, Mincle, NOX1, SLC10A2, SLC12A2, SLC17A2, SLC38A1, SLC39A5, SLC39A6, также известный как LIV1 (типичные антитела включают ладиратузумаб), SLC44A4, SLC6A15, SLC6A6, SLC7A11 и SLC7A5.

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген

представляет собой трансмембранный или мембраноассоциированный гликопротеин. Например, следующие антигены являются трансмембранными или мембраноассоциированными гликопротеинами: CA-125, CA19-9, CAMPATH-1 (типичные антитела включают алемтузумаб), карциноэмбриональный антиген (типичные антитела включают арцитумомаб, цергугузумаб, амуналейкин и лабетузумаб), CD112, CD155, CD24, CD247, CD37 (типичные антитела включают лилотомаб), CD38 (типичные антитела включают фелзартамаб), CD3D, CD3E (типичные антитела включают форалумаб и теплизумаб), CD3G, CD96, CDCP1, CDH17, CDH3, CDH6, CEACAM1, CEACAM6, CLDN1, CLDN16, CLDN18.1 (типичные антитела включают золбетуксимаб), CLDN18.2 (типичные антитела включают золбетуксимаб), CLDN19, CLDN2, CLEC12A (типичные антитела включают теподитамаб), DPEP1, DPEP3, DSG2, эндосиалин (типичные антитела включают онтуксизумаб), ENPP1, EPCAM (типичные антитела включают адекватумумаб), FN, FN1, Gp100, GPA33, gpNMB (типичные антитела включают глембатуумаб), ICAM1, L1CAM, LAMP1, MELTF, также известный как CD228, NCAM1, нектин-4 (типичные антитела включают энфортумаб), PDPN, PMSA, PROM1, PSCA, PSMA, Siglecs 1-16, SIRPa, SIRPg, TACSTD2, TAG-72, тенасцин, тканевый фактор, также известный как TF (типичные антитела включают тизотумаб) и ULBP1/2/3/4/5/6.

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой трансмембранную или мембраноассоциированную рецепторную киназу. Например, следующие антигены являются трансмембранными или мембраноассоциированными рецепторными киназами: ALK, Ax1 (типичные антитела включают тилвестамаб), VMPR2, DCLK1, DDR1, рецепторы EPHA, EPHA2, ERBB2, также известный как HER2 (типичные антитела включают трастузумаб, бевацизумаб, пертузумаб и маргетуксимаб), ERBB3, FLT3, PDGFR-B (типичные антитела включают ринукумаб), PTK7 (типичные антитела включают кофетузумаб), RET, ROR1 (типичные антитела включают цирмтузумаб), ROR2, ROS1 и Tie3.

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой мембраноассоциированный или мембранолокализованный белок. Например, следующие антигены являются мембраноассоциированными или мембранолокализованными белками: ALPP, ALPPL2, ANXA1, FOLR1 (типичные антитела включают фарлетузумаб), IL13Ra2, IL1RAP (типичные антитела включают ниданилимаб), NT5E, OX40, мутант Ras, RGS5, RhoC, SLAMF7 (типичные антитела включают элотузумаб) и VSIR.

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой трансмембранный сопряженный с G-белком рецептор (GPCR). Например, следующие антигены являются GPCR: CALCR, CD97, GPR87 и KISS1R.

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой ассоциированный с клеточной поверхностью рецептор или клеточный поверхностный рецептор. Например, следующие антигены являются ассоциированными с клеточной поверхностью рецептор и/или клеточными поверхностными рецепторами: B7-

DC, антиген созревания В-клеток (BCMA), CD137, CD 244, CD3 (типичные антитела включают отеликсизумаб и визилизумаб), CD48, CD5 (типичные антитела включают золимомаб аритокс), CD70 (типичные антитела включают кузатузумаб и ворсетузумаб), CD74 (типичные антитела включают милатузумаб), CD79A, CD-262 (типичные антитела включают тигатузумаб), DR4 (типичные антитела включают мапатумумаб), FAS, FGFR1, FGFR2 (типичные антитела включают апрутумаб), FGFR3 (типичные антитела включают вофатамаб), FGFR4, GTR (типичные антитела включают рагифилимаб), Grс3 (типичные антитела включают рагифилимаб), HAVCR2, HLA-E, HLA-F, HLA-G, LAG-3 (типичные антитела включают энцелимаб), LY6G6D, LY9, MICA, MICB, MSLN, MUC1, MUC5AC, NY-ESO-1, OY-TE51, PVRIG, антиген Sialyl-Thomsen-Nouveau, белок сперматозоидов 17, TNFRSF12 и uPAR.

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой хемокиновый рецептор или цитокиновый рецептор. Например, следующие антигены являются хемокиновыми рецепторами или цитокиновыми рецепторами: CD115 (типичные антитела включают аксатилимаб, кабирализумаб и эмактузумаб), CD123, CXCR 4 (типичные антитела включают улокуплумаб), IL-21R и IL-5R (типичные антитела включают бенрализумаб).

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой костимулирующий экспрессируемый на поверхности белок. Например, следующие антигены являются костимулирующими экспрессируемыми на поверхности белками: B7-H3 (типичные антитела включают эноблитузумаб и омбуртамаб), B7-H4, B7-H6 и B7-H7.

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой транскрипционный фактор или ДНК-связывающий белок. Например, следующие антигены являются транскрипционными факторами: ETV6-AML, MYCN, PAX3, PAX5 и WT1. Следующий белок представляет собой ДНК-связывающий белок: BORIS.

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой интегральный мембранный белок. Например, следующие антигены являются интегральными мембранными белками: SLITRK6 (типичные антитела включают сиртратумаб), UPK2 и UPK3B.

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой интегрин. Например, следующие антигены являются интегриновыми антигенами: альфа v бета 6, ITGAV (типичные антитела включают абитузумаб), ITGB6 и ITGB8.

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой гликолипид. Например, следующие антигены являются гликолипидными антигенами: FucGM1, GD2 (типичные антитела включают динутуксимаб), GD3 (типичные антитела включают митумомаб), GloboH, GM2 и GM3 (типичные антитела включают ракотумомаб).

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой клеточно-поверхностный рецептор гормона. Например, следующие антигены являются клеточно-поверхностными рецепторами гормонов: AMHR2 и рецептор андрогена.

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой трансмембранную или мембраноассоциированную протеазу. Например, следующие антигены являются трансмембранными или мембраноассоциированными протеазами: ADAM12, ADAM9, TMPRSS11D и металлопротеиназа.

В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген aberrantly экспрессируется у индивидов, имеющих рак. Например, следующие антигены могут aberrantly экспрессироваться у индивидов, имеющих рак: AFP, AGR2, AKAP-4, ARTN, BCR-ABL, компонент комплемента C5, CCNB1, CSPG4, CYP1B1, De2-7 EGFR, EGF, Fas-связанный антиген 1, FBP, G250, GAGE, HAS3, HPV E6 E7, hTERT, IDO1, LCK, легумин, LYPD1, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGEA3, MAGEA4, MAGEC2, MerTk, ML-IAP, NA17, NY-BR-1, p53, мутант p53, PAP, PLAVI, полисиаловая кислота, PR1, PSA, контрольные точки транслокации саркомы, SART3, sLe, SSX2, сурвивин, Tn, TRAIL, TRAIL1, TRP-2 и XAGE1.

В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой ассоциированный с иммунными клетками антиген. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с иммунными клетками антиген представляет собой трансмембранный белок. Например, следующие антигены являются трансмембранными белками: BAFF-R, CD163, CD19, CD20 (типичные антитела включают гавилимомаб и метузумаб), CD25 (типичные антитела включают дивозилимаб и ибритутумаб тиуксетан), CD274, также известный как PD-L1 (типичные антитела включают адебрелимаб, атезолизумаб, гаривулимаб, дурвалумаб и авелумаб), CD30 (типичные антитела включают иратумумаб и брентуксимаб), CD33 (типичные антитела включают линтузумаб), CD352, CD45 (типичные антитела включают апамистамаб), CD47 (типичные антитела включают летаплимаб и магролимаб), CTLA4 (типичные антитела включают ипилимумаб), FASL, IFNAR1 (типичные антитела включают фаралимомаб), IFNAR2, LAYN, LILRB2, LILRB4, PD-1 (типичные антитела включают ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб, балстилимаб, будигалимаб, гептанолимаб, торипалимаб и пидилизумаб), SIT1 и TLR2/4/1 (типичные антитела включают томаралимаб).

В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с иммунными клетками антиген представляет собой трансмембранный транспортный белок. Например, Mincle представляет собой трансмембранный транспортный белок.

В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с иммунными клетками антиген представляет собой трансмембранный или мембраноассоциированный гликопротеин. Например, следующие антигены являются трансмембранными или мембраноассоциированными гликопротеинами: CD112, CD155, CD24, CD247, CD28,

CD30L, CD37 (типичные антитела включают лилотомаб), CD38 (типичные антитела включают фелзартамаб), CD3D, CD3E (типичные антитела включают форалумаб и теплизумаб), CD3G, CD44, CLEC12A (типичные антитела включают теподитамаб), DCIR, DCSIGN, дектин 1, дектин 2, ICAM1, LAMP1, Siglecs 1-16, SIRPa, SIRPg и ULBP1/2/3/4/5/6.

В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с иммунными клетками антиген представляет собой трансмембранную или мембраноассоциированную рецепторную киназу. Например, следующие антигены являются трансмембранными или мембраноассоциированными рецепторными киназами: Ax1 (типичные антитела включают тилвестамаб) и FLT3.

В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с иммунными клетками антиген представляет собой мембраноассоциированный или мембранолокализованный белок. Например, следующие антигены являются мембраноассоциированными или мембранолокализованными белками: CD83, IL1RAP (типичные антитела включают ниданилимаб), OX40, SLAMF7 (типичные антитела включают элотузумаб) и VSIR.

В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с иммунными клетками антиген представляет собой трансмембранный сопряженный с G-белком рецептор (GPCR). Например, следующие антигены являются GPCR: CCR4 (типичные антитела включают могамулизумаб-кркс), CCR8 и CD97.

В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с иммунными клетками антиген представляет собой ассоциированный с клеточной поверхностью рецептор или клеточный поверхностный рецептор. Например, следующие антигены являются ассоциированными с клеточной поверхностью рецептор и/или клеточными поверхностными рецепторами: B7-DC, BCMA, CD137, CD2 (типичные антитела включают сиплизумаб), CD 244, CD27 (типичные антитела включают варлилумаб), CD278 (типичные антитела включают феладилумаб и вопрателимаб), CD3 (типичные антитела включают отеликсизумаб и визилизумаб), CD40 (типичные антитела включают дацетузумаб и лукатумумаб), CD48, CD5 (типичные антитела включают золимомаб аритокс), CD70 (типичные антитела включают кусатузумаб и ворсетузумаб), CD74 (типичные антитела включают милатузумаб), CD79A, CD-262 (типичные антитела включают тигатузумаб), DR4 (типичные антитела включают мапатумумаб), GITR (типичные антитела включают рагифилимаб), HAVCR2, HLA-DR, HLA-E, HLA-F, HLA-G, LAG-3 (типичные антитела включают энцелимаб), MICA, MICB, MRC1, PVRIG, антиген Sialyl-Thomsen-Nouveau, TIGIT (типичные антитела включают этигилимаб), Trem2 и uPAR.

В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с иммунными клетками антиген представляет собой хемокиновый рецептор или цитокиновый рецептор. Например, следующие антигены являются хемокиновыми рецепторами или цитокиновыми рецепторами: CD115 (типичные антитела включают аксатилимаб, кабирализумаб и эмактузумаб), CD123, CXCR4 (типичные антитела включают улокуплумаб), IL-21R и IL-5R (типичные антитела включают бенрализумаб).

В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с иммунными клетками

антиген представляет собой костимулирующий экспрессируемый на поверхности белок. Например, следующие антигены являются костимулирующими экспрессируемыми на поверхности белками: В7-Н3 (типичные антитела включают эноблитузумаб и омбуртамаб), В7-Н4, В7-Н6 и В7-Н7.

В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с иммунными клетками антиген представляет собой периферический мембранный белок. Например, следующие антигены являются периферическими мембранными белками: В7-1 (типичные антитела включают галиксимаб) и В7-2.

В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с иммунными клетками антиген аберрантно экспрессируется у индивидов, имеющих рак. Например, следующие антигены могут аберрантно экспрессироваться у индивидов, имеющих рак: компонент комплемента С5, IDO1, LCK, MerTk и Tyrol.

В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой ассоциированный со стромальными клетками антиген. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный со стромальными клетками антиген представляет собой трансмембранный или мембраноассоциированный белок. Например, следующие антигены являются трансмембранными или мембраноассоциированными белками: FAP (типичные антитела включают сибротузумаб), IFNAR1 (типичные антитела включают фаралимомаб) и IFNAR2.

В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой CD30. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD30, например, как описано в Международной патентной публикации № WO 02/43661. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD30 представляет собой сAC10, которое описано в Международной патентной публикации № WO 02/43661. сAC10 также известно как брентуксимаб. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD30 содержит CDR сAC10. В некоторых вариантах осуществления CDR определены по схеме нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления CDR определены по схеме нумерации Chothia. В некоторых вариантах осуществления CDR определены по схеме нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR определены по схеме нумерации AbM. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD30 содержит CDR-Н1, CDR-Н2, CDR-Н3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD30 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 95% по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% идентичной аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD30 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой CD70. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с CD70, например, как описано в Международной патентной публикации № WO 2006/113909. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к CD70 h1F6, которое описано в Международной патентной публикации № WO 2006/113909. h1F6 также известно как ворсетузумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую три CDR из SEQ ID NO: 12, и переменную область легкой цепи, содержащую три CDR из SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления CDR определены по схеме нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления CDR определены по схеме нумерации Chothia. В некоторых вариантах осуществления CDR определены по схеме нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR определены по схеме нумерации AbM. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD70 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 95% по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD30 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой вспомогательный белок рецептора интерлейкина-1 (IL1RAP). IL1RAP представляет собой корецептор рецептора IL1 (IL1R1) и необходим для сигнализации интерлейкина-1 (IL1). IL1 был связан с резистентностью к определенным схемам химиотерапии. IL1RAP сверхэкспрессируется в различных солидных опухолях, как на раковых клетках, так и в опухолевом микроокружении, но характеризуется низкой экспрессией на нормальных клетках. IL1RAP также сверхэкспрессируется в гемопоэтических стволовых клетках и их предшественниках, что делает его кандидатом для нацеливания при хроническом миелоидном лейкозе (ХМЛ). Также было показано, что IL1RAP сверхэкспрессируется при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ). Связывание антитела с IL1RAP может блокировать передачу сигнала от IL-1 и IL-33 в клетки и позволять NK-клеткам распознавать опухолевые клетки и впоследствии уничтожать их за счет антителозависимой клеточной

цитотоксичности (АЗКЦ).

В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой ASCT2. ASCT2 также известен как SLC1A5. ASCT2 представляет собой повсеместно экспрессируемый, обладающий широкой специфичностью, натрий-зависимый обменник нейтральных аминокислот. ASCT2 участвует в транспорте глутамина. ASCT2 сверхэкспрессируется при различных видах рака и тесно связан с плохим прогнозом. Было показано, что понижающая регуляция ASCT2 подавляет внутриклеточные уровни глутамина и последующий метаболизм глутамина, включая выработку глутатиона. Вследствие его высокой экспрессии при многих видах рака ASCT2 является потенциальной терапевтической мишенью. Эти эффекты замедляли рост и пролиферацию, повышали апоптоз и аутофагию, а также повышали окислительный стресс и подавление пути mTORC1 при плоскоклеточной карциноме головы и шеи (ПККГШ). Кроме того, сайленсинг ASCT2 улучшал ответ на цетуксимаб при ПККГШ.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с TROP2. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20 и 21, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой сацитузумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28 и 29, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой дапототамаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с MICA. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36 и 37, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой h1D5v11 hIgG1K. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44 и 45, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 46, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой MICA.36 hIgG1K G236A. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52 и 53, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой h3F9 H1L3 hIgG1K. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 56, 57, 58, 59, 60 и 61, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой CM33322 Ab28 hIgG1K.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD24. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 64, 65, 66, 67, 68 и 69, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой SWA11.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с ITGav. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 72, 73, 74, 75, 76 и 77, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой интетумумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 80, 81, 82, 83, 84 и 85, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой абитузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с gpA33. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 88, 89, 90, 91, 92 и 93, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с IL1R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99, 100 и 101, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой ниданилимаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с EpCAM. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 104, 105, 106, 107, 108 и 109, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой адекватумумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 112, 113, 114, 115, 116 и 117, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой Ep157305. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 120, 121, 122, 123, 124 и 125, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой Ep3-171. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 128, 129, 130, 131, 132 и 133, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат

вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой E<sub>p</sub>3622w94. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 136, 137, 138, 139, 140 и 141, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 143. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой E<sub>p</sub>ING1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 144, 145, 146, 147, 148 и 149, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 150, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой E<sub>p</sub>Ab2-6.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD352. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 152, 153, 154, 155, 156 и 157, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой h20F3.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CS1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 160, 161, 162, 163, 164 и 165, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 166, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 167. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой элотузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD38. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 168, 169, 170, 171, 172 и 173, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 174, и вариабельную

область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой даратумумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD25. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 176, 177, 178, 179, 180 и 181, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 182, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 183. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой даклизумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с ADAM9. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 184, 185, 186, 187, 188 и 189, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 190, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой chMAbA9-A. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 192, 193, 194, 195, 196 и 197, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 199. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой hMAbA9-A.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD59. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 200, 201, 202, 203, 204 и 205, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 207.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD25. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой Clone123.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD229. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой h8A10.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем

документе, связывается с CD19. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 208, 209, 210, 211, 212 и 213, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой денитузумаб, который также известен как hBU12. См. WO2009052431.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD70. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 216, 217, 218, 219, 220 и 221, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой ворсетузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с B7H4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 224, 225, 226, 227, 228 и 229, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 230, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 231. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой мирзотамаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD138. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 232, 233, 234, 235, 236 и 237, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 238, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 239. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой индатуксумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD166. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 240, 241, 242, 243, 244 и 245, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 247. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой пралузатамаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD51. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 248, 249, 250, 251, 252 и 253, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 254, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 255. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой интетумумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD56. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 256, 257, 258, 259, 260 и 261, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 263. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой лорвотузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD74. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 264, 265, 266, 267, 268 и 269, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 270, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 271. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой милатузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CEACAM5. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 272, 273, 274, 275, 276 и 277, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 279. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой лабентузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CanAg. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 280, 281, 282, 283, 284 и 285, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную

область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 286, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 287. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой кантузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с DLL-3. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 288, 289, 290, 291, 292 и 293, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 294, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 295. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой ровальпитузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с DPEP-3. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 296, 297, 298, 299, 300 и 301, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 302, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 303. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой тамринтамаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с EGFR. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 304, 305, 306, 307, 308 и 309, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 311. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой лапритуксимаб. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 312, 313, 314, 315, 316 и 317, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 318, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 319. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой лосатуксизумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 320, 321, 322, 323, 324 и 325, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 326, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 327. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой серклуамаб. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 328, 329, 330, 331, 332 и 333, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 335. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой цетуксимаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с FRa. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 336, 337, 338, 339, 340 и 341, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 343. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой мирветуксимаб. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 344, 345, 346, 347, 348 и 349, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 350, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 351. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой фарлетузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с MUC-1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 352, 353, 354, 355, 356 и 357, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 358, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 359. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гатипотузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с мезотелином. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 360, 361, 362, 363, 364 и 365, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

366, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 367. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой анетумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с ROR-1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 368, 369, 370, 371, 372 и 373, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 374, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 375. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой зиловертамаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с ASCT2. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с B7H4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 376, 377, 378, 379, 380 и 381, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 382, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 383. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой 20502. См. WO2019040780.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с B7-H3. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 384, 385, 386, 387, 388 и 389, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 390, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 391. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой chAb-A (BRCA84D). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 392, 393, 394, 395, 396 и 397, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 398, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 399. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой hAb-B. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 400, 401, 402, 403, 404 и 405, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную



область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 454, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 455. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой AbV\_huAb3-v2.6. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 456, 457, 458, 459, 460 и 461, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 462, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 463. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой AbV\_huAb13-v1-CR. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 464, 465, 466, 467, 468 и 469, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 470, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 471. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой 8H9-6m. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 472, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 473. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой m8517. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 474, 475, 476, 477, 478 и 479, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 480, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 481. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой TPP-5706. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 482, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 483. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой TPP-6642. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 484, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 485. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой TPP-6850.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CDCP1. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой 10D7.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем

документе, связывается с HER3. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 486, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 487. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой патритумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 488, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 489. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой серибантумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 490, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 491. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой эльгемтумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 492, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 493. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой лумретузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с RON. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой Zt/g4.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с клаудином-2.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с HLA-G.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с РТК7. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 494, 495, 496, 497, 498 и 499, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 500, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 501. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой РТК7 mab 1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 502, 503, 504, 505, 506 и 507, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 508, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 509. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой РТК7 mab 2. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 510, 511, 512, 513, 514 и 515, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат

вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 516, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 517. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой РТК7 mab 3.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с LIV1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 518, 519, 520, 521, 522 и 523, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 524, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 525. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой ладиратузумаб, который также известен как hLIV22 и hglg. См. WO2012078668.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с avb6. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 526, 527, 528, 529, 530 и 531, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 532, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 533. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой h2A2. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 534, 535, 536, 537, 538 и 539, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 540, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 541. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой h15H3.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD48. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 542, 543, 544, 545, 546 и 547, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 548, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 549. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой hMEM102. См. WO2016149535.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные

последовательности SEQ ID NO: 550, 551, 552, 553, 554 и 555, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 556, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 557. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой SG-559-01 LALA mAb.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с IGF-1R. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 558, 559, 560, 561, 562 и 563, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 564, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 565. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой циксутумумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с клаудином-18.2. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 566, 567, 568, 569, 570 и 571, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 572, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 573. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой золбетуксимаб (175D10). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 574, 575, 576, 577, 578 и 579, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 580, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 581. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой 163E12.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с нектином-4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 582, 583, 584, 585, 586 и 587, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 588, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 589. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой энфортумаб. См. WO 2012047724.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с SLTRK6. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 590, 591, 592, 593, 594 и 595, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариabельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 596, и вариabельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 597. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой сиртратумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD228. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 598, 599, 600, 601, 602 и 603, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариabельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 604, и вариabельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 605. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой hL49. См. WO 2020/163225.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD142 (тканевым фактором; TF). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 606, 607, 608, 609, 610 и 611, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариabельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 612, и вариabельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 613. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой тисотумаб. См. WO 2010/066803.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с STn. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 614, 615, 616, 617, 618 и 619, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариabельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 620, и вариabельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 621. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой h2G12.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD20. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 622, 623, 624, 625, 626 и 627, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариabельную область тяжелой цепи,

включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 628, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 629. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой ритуксимаб. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой обинитумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с HER2. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 630, 631, 632, 633, 634 и 635, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 636, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 637. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой трастузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с FLT3.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD46.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с GloboH.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с AG7.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с мезотелином.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с FCRH5.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с ETBR.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с Tim-1.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с SLC44A4.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с ENPP3.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD37.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CA9.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с Notch3.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с EphA2.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с TRFC.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с PSMA.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с LRRC15.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с 5T4.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD79b. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 638, 639, 640, 641, 642 и 643, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 644, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 645. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полатузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с NaPi2B. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 646, 647, 648, 649, 650 и 651, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 652, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 653. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой лифастузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с Muc16. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 654, 655, 656, 657, 658 и 659, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 660, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 661. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой софитузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с STEAP1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 662, 663, 664, 665, 666 и 667, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную

область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 668, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 669. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой вандортузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с BCMA. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 670, 671, 672, 673, 674 и 675, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 676, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 677. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой белантамаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с c-MET. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 678, 679, 680, 681, 682 и 683, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 684, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 685. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой телисотузумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с EGFR. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 686, 687, 688, 689, 690 и 691, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 692, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 693. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой депатукизумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с SLAMF7. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 694, 695, 696, 697, 698 и 699, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 700, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 701. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой азинтукизумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем

документе, связывается с SLITRK6. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 702, 703, 704, 705, 706 и 707, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 708, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 709. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой сиртратумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с C4.4a. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 710, 711, 712, 713, 714 и 715, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 716, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 717. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой лупартумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с GCC. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 718, 719, 720, 721, 722 и 723, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 724, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 725. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой индусатумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с Ax1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 726, 727, 728, 729, 730 и 731, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 732, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 733. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой энапотумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с gpNMB. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 734, 735, 736, 737, 738 и 739, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 740, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 741. В некоторых вариантах осуществления антитело

представляет собой глембатумумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с рецептором пролактина. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 742, 743, 744, 745, 746 и 747, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 748, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 749. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой ролинсатамаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с FGFR2. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 750, 751, 752, 753, 754 и 755, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 756, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 757. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой апрутумаб.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CDCP1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 758, 759, 760, 761, 762 и 763, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 764, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 765. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное CUB4 #135 HC4-H. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 766, 767, 768, 769, 770 и 771, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 772, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 773. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой CUB4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 774, 775, 776, 777, 778, 779, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 780, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 781.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой CP13E10-WT. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 782, 783, 784, 785, 786 и 787, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 788, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 789. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой CP13E10-54HCv13-89LCv1.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с ASCT2. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 790, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 791. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой KM8094a. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 792, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 793. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой KM8094b. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 794, 795, 796, 797, 798 и 799, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 800, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 801. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой KM4018.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD123. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 802, 803, 804, 805, 806 и 807, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 808, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 809. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой h7G3. См. WO 2016201065.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с GPC3. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 810, 811, 812, 813, 814 и 815, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 816, и переменную

область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 817. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой hGPC3-1. См. WO 2019161174.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с B6A. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 818, 819, 820, 821, 822 и 823, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 824, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 825. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой h2A2. См. PCT/US20/63390. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 826, 827, 828, 829, 830 и 831, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 832, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 833. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой h15H3. См. WO 2013/123152.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с PD-L1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 834, 835, 836, 837, 838 и 839, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 840, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 841. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой SG-559-01. См. PCT/US2020/054037.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с TIGIT. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 842, 843, 844, 845, 846 и 847, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 848, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 849. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой клон 13 (также известный как ADI-23674 или mAb13). См. WO 2020041541.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с STN. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные

последовательности SEQ ID NO: 850, 851, 852, 853, 854 и 855, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 856, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 857. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой 2G12-2B2. См. WO 2017083582.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с CD33. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 858, 859, 860, 861, 862 и 863, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 864, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 865. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой h2H12. См. WO2013173496.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с NTBA (также известным как CD352). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 866, 867, 868, 869, 870 и 871, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 872, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 873. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой h20F3 HDLD. См. WO 2017004330.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с BCMA. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 874, 875, 876, 877, 878 и 879, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 880, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 881. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой SEA-BCMA (также известное как hSG16.17; в настоящем документе «SEA» означает афукозилирование антитела). См. WO 2017/143069.

В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем документе, связывается с тканевым фактором (также известным как TF). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 882, 883, 884, 885, 886 и 887, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антитело содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 888, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 889. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой тисотумаб. См. WO 2010/066803 и US 9150658.

Таблица последовательностей

| SEQ ID NO | Описание     | Последовательность   |
|-----------|--------------|--|
| 1         | cAC10 CDR-H1 | DYYIT  |
| 2         | cAC10 CDR-H2 | WIYPGSGNTKYNEKFKG  |
| 3         | cAC10 CDR-H3 | YGNWYFAY   |
| 4         | cAC10 CDR-L1 | KASQSVDFDGD SYMN   |
| 5         | cAC10 CDR-L2 | AASNLES  |
| 6         | cAC10 CDR-L3 | QQSNEDPWT  |
| 7         | cAC10 VH     | QIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYYITWVK<br>QKPGQGLEWIGWIYPGSGNTKY<br>NEKFKGKATLTVDTSSSTAFMQLSSLTSED TAVYFCAN<br>YGNWYFAYWGQGTQVTVSA   |
| 8         | cAC10 VL     | DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGD SYMN<br>WYQQKPGQPPKVLIIYAASNLES<br>GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDP<br>WTFGGGTKLEIK  |
| 9         | cAC10 HC     | QIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYYITWVK<br>QKPGQGLEWIGWIYPGSGNTKY<br>NEKFKGKATLTVDTSSSTAFMQLSSLTSED TAVYFCAN<br>YGNWYFAYWGQGTQVTVSAAST<br>KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSS<br>GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV<br>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG<br>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYN<br>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK<br>TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP<br>PVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 10        | cAC10 HC v2  | QIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYYITWVK<br>QKPGQGLEWIGWIYPGSGNTKY<br>NEKFKGKATLTVDTSSSTAFMQLSSLTSED TAVYFCAN<br>YGNWYFAYWGQGTQVTVSAAST<br>KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSS<br>GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV<br>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG   |

|    |          |  |
|----|----------|--|
|    |          | <p>PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN<br/> WYVDGVEVHNAKTKPREEQYN<br/> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK<br/> TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br/> LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP<br/> PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW<br/> QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>   |
| 11 | cAC10 LC | <p>DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSYMN<br/> WYQQKPGQPPKVLIIYAASNLES<br/> GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDP<br/> WTFGGGTKLEIKR<br/> TVAAPSVMFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ<br/> WKVDNALQSGNSQESVTEQDS<br/> KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT<br/> KSFNRGEC</p>  |
| 12 | h1F6 VH  | <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNW<br/> VRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTY<br/> ADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCA<br/> RDYGDYGM DYWGQGT TTVTVSS</p>   |
| 13 | h1F6 VL  | <p>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMH<br/> WYQQKPGQPPKLLIYLASNLES<br/> GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREV<br/> PWTFGQGTKVEIK</p>   |
| 14 | h1F6 HC  | <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNW<br/> VRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTY<br/> ADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCA<br/> RDYGDYGM DYWGQGT TTVTVSSAS<br/> TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS<br/> WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL<br/> YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP<br/> KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS<br/> VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW<br/> YVDGVEVHNAKTKPREEQYNST<br/> YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TIS<br/> KAKGQPREPQVYTLPPSRDEL T<br/> KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV<br/> LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ<br/> GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> |
| 15 | h1F6 LC  | <p>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMH<br/> WYQQKPGQPPKLLIYLASNLES<br/> GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREV<br/> PWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF<br/> IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL<br/> QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS<br/> STLTL SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>  |

|    |              |   |
|----|--------------|---|
| 16 | TROP2 CDR-H1 | NYGMN   |
| 17 | TROP2 CDR-H2 | WINTYTGEPTYTDDFKG   |
| 18 | TROP2 CDR-H3 | GGFGSSYWYFDV  |
| 19 | TROP2 CDR-L1 | KASQDVSIABA   |
| 20 | TROP2 CDR-L2 | SASYRYT   |
| 21 | TROP2 CDR-L3 | QQHYITPLT   |
| 22 | TROP2 VH     | QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNW<br>VKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPT<br>YTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCA<br>RGGFGSSYWYFDVWGQGS�TVSS |
| 23 | TROP2 VL     | DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIABAWYQQ<br>KPGKAPKLLIYSASYRYTGVP<br>DRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTF<br>GAGTKVEIK             |
| 24 | TROP2 CDR-H1 | TAGMQ   |
| 25 | TROP2 CDR-H2 | WINTHSGVPKYAEDFKG   |
| 26 | TROP2 CDR-H3 | SGFGSSYWYFDV  |
| 27 | TROP2 CDR-L1 | KASQDVSTABA   |
| 28 | TROP2 CDR-L2 | SASYRYT   |
| 29 | TROP2 CDR-L3 | QQHYITPLT   |
| 30 | TROP2 VH     | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTAGMQW<br>VRQAPGQGLEWMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISAD<br>TSTSTAYLQLSLKSSEDVAVYYCARSFGSSYWYFDV<br>WGQGLTVTVSS |
| 31 | TROP2 VL     | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTABAWYQQ<br>KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSL<br>QPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIK                |
| 32 | MICA CDR-H1  | SQNIY   |
| 33 | MICA CDR-H2  | YIEPYNVVPMYNPKFKG   |
| 34 | MICA CDR-H3  | SGSSNFDY  |
| 35 | MICA CDR-L1  | SASSISSHYLH   |
| 36 | MICA CDR-L2  | RTSNLAS   |
| 37 | MICA CDR-L3  | QQGSSLPLT   |
| 38 | MICA VH      | EIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFTSQNIYVW<br>RQAPGQGLEWIGYIEPYNVVPMYNPKFKGRATLTVDK<br>STSTAYLELSSLRSEDVAVYYCARSGSSNFDYWGQGLT<br>VTVSS    |
| 39 | MICA VL      | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSISSHYLHWYQQ<br>KPGKSPKLLIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSL<br>QPEDFATYYCQQGSSLPLTFGQGTKVEIK                 |

|    |             |  |
|----|-------------|--|
| 40 | MICA CDR-H1 | NYAMH  |
| 41 | MICA CDR-H2 | LIWYDGSNKFYGD SVKG   |
| 42 | MICA CDR-H3 | EGSGHY   |
| 43 | MICA CDR-L1 | RASQGISSALA  |
| 44 | MICA CDR-L2 | DASSLES  |
| 45 | MICA CDR-L3 | QQFNSYPIT  |
| 46 | MICA VH     | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMHWV<br>RQAPGEGLEWVALIWYDGSNKFYGD SVKGRFTISRDN<br>SKNTLYLQMNLSAEDTAVYYCAREGSGHYWGQGT<br>LTVSS       |
| 47 | MICA VL     | AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQK<br>PGKVPKSLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ<br>PEDFATYYCQQFNSYPITFGQGTTRLEIK                 |
| 48 | MICA CDR-H1 | NYAMS  |
| 49 | MICA CDR-H2 | YISPGGDYIYYADSVKG  |
| 50 | MICA CDR-H3 | DRRHYSYAMDY  |
| 51 | MICA CDR-L1 | RSSKSLHNSLNTYLY  |
| 52 | MICA CDR-L2 | RMSNLAS  |
| 53 | MICA CDR-L3 | MQHLEYPFT  |
| 54 | MICA VH     | QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWIR<br>QAPGKGLEWVSYISPGGDYIYYADSVKGRFTISRDN<br>AKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCTDRRHYSYAMDYWG<br>QGTLLTVSS  |
| 55 | MICA VL     | DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLHNSLNTYLY<br>WFLQKPGQSPQILYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTAFTL<br>KISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGPGTKLEIK              |
| 56 | MICA CDR-H1 | TYAFH  |
| 57 | MICA CDR-H2 | GIVPIFGTLKYAQKFQD  |
| 58 | MICA CDR-H3 | AIQLEGRPFDH  |
| 59 | MICA CDR-L1 | RASQGITSYLA  |
| 60 | MICA CDR-L2 | AASALQS  |
| 61 | MICA CDR-L3 | QQVNRGAIT  |
| 62 | MICA VH     | QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCRASGGSSTTYAFHWV<br>RQAPGQGLEWMGGIVPIFGTLKYAQKFQDRVTLTADK<br>STGTAYMELNSLRLDDTAVYYCARAIQLEGRPFDH<br>WGQGTQVTVSA |
| 63 | MICA VL     | DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGITSYLA<br>WYQQKPGKAPKLLIYAASALQSGVPSRFSGRGSGTEFTL<br>TISSLQPEDFATYYCQQVNRGAITFGHGTRLDIK                  |
| 64 | CD24 CDR-H1 | TYAFH  |

|    |              |   |
|----|--------------|---|
| 65 | CD24 CDR-H2  | GIVPIFGTLKYAQKFQD   |
| 66 | CD24 CDR-H3  | AIQLEGRPFDH   |
| 67 | CD24 CDR-L1  | RASQGITSYLA   |
| 68 | CD24 CDR-L2  | AASALQS   |
| 69 | CD24 CDR-L3  | QQVNRGAAIT  |
| 70 | CD24 VH      | QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCRASGGSSSTTYAFHWV<br>RQAPGQGLEWMGGIVPIFGTLKYAQKFQDRVTLTADK<br>STGTAYMELNSLRLLDDTAVYYCARAIQLEGRPFHDHWG<br>QGTQVTVSA |
| 71 | CD24 VL      | DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGITSYLAWYQQK<br>PGKAPKLLIYAASALQSGVPS<br>RFSGRGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQVNRGAAITF<br>GHGTRLDIK                |
| 72 | ITGav CDR-H1 | RYTMH   |
| 73 | ITGav CDR-H2 | VISFDGSNKYYVDSVKG   |
| 74 | ITGav CDR-H3 | EARGSYAFDI  |
| 75 | ITGav CDR-L1 | RASQSVSSYLA   |
| 76 | ITGav CDR-L2 | DASNRAT   |
| 77 | ITGav CDR-L3 | QQRSNWPPFT  |
| 78 | ITGav VH     | QVQLVESGGGVVQPGRSRRLSCAASGFTFSRYTMHWV<br>RQAPGKGLEWVAVISFDGSNKYYVDSVKGRFTISRDN<br>ENTLYLQVNILRAEDTAVYYCAREARGSYAFDIWGQG<br>TMVTVSS      |
| 79 | ITGav VL     | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE<br>PEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK                    |
| 80 | ITGav CDR-H1 | SFWMH   |
| 81 | ITGav CDR-H2 | YINPRSGYTEYNEIFRD   |
| 82 | ITGav CDR-H3 | FLGRGAMDY   |
| 83 | ITGav CDR-L1 | RASQDISNYLA   |
| 84 | ITGav CDR-L2 | YTSKIHS   |
| 85 | ITGav CDR-L3 | QQGNTFPYT   |
| 86 | ITGav VH     | QVQLQQSGGELAKPGASVKVSCKASGYTFSSFWMHV<br>VRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNEIFRDKATMTTDT<br>STSTAYMELSSLRSEDVAVYYCASFLGRGAMDYWGQG<br>TTVTVSS      |
| 87 | ITGav VL     | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQ<br>KPGKAPKLLIYYTSKIHSGVPSRFSGSGSGTDYFTISSL<br>QPEDIATYYCQQGNTFPYTFGQGTKVEIK                      |
| 88 | gpA33 CDR-H1 | TSSYYWG   |

|     |               |  |
|-----|---------------|--|
| 89  | gpA33 CDR-H2  | TIYYNGSTYYSPSLKS   |
| 90  | gpA33 CDR-H3  | QGYDIKINIDV  |
| 91  | gpA33 CDR-L1  | RASQSVSSYLA  |
| 92  | gpA33 CDR-L2  | VASNRAT  |
| 93  | gpA33 CDR-L3  | QQRSNWPLT  |
| 94  | gpA33 VH      | QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISTSSYYWGWI<br>RQPPGKGLEWIGTIYYNGSTYYSPSLKSRVVISVDTSKN<br>QFSLKLSSVTAADTSVYYCARQGYDIKINIDVWGQGT<br>TVSS         |
| 95  | gpA33 VL      | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIYVASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE<br>PEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGGTKVEIK                         |
| 96  | IL1Rap CDR-H1 | SSWMN  |
| 97  | IL1Rap CDR-H2 | RIYPGDGNTHYAQKFQG  |
| 98  | IL1Rap CDR-H3 | GYLDPMDY   |
| 99  | IL1Rap CDR-L1 | QASQGINNYLN  |
| 100 | IL1Rap CDR-L2 | YTSGLHA  |
| 101 | IL1Rap CDR-L3 | QQYSILPWT  |
| 102 | IL1Rap VH     | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFTSSWMNW<br>VRQAPGQGLEWMGRIYPGDGNTHYAQKFQGRVTLTA<br>DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGEGYLDPMYWG<br>QGTLVTVSS             |
| 103 | IL1Rap VL     | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQGINNYLNWYQQ<br>KPGKAPKLLIHYTSLGHAGVPSRFSGSGSGTDYTLTISS<br>LEPEDVATYYCQQYSILPWTTFGGGGTKVEIK                        |
| 104 | EpCAM CDR-H1  | SYGMH  |
| 105 | EpCAM CDR-H2  | VISYDGSNKYYADSVKG  |
| 106 | EpCAM CDR-H3  | DMG  |
| 107 | EpCAM CDR-L1  | RTSQSISSYLN  |
| 108 | EpCAM CDR-L2  | WASTRES  |
| 109 | EpCAM CDR-L3  | QQSYDIPYT  |
| 110 | EpCAM VH      | EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV<br>RQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDMGWGSGWRPY<br>YYYGMDVWGQGTITVTVSS |
| 111 | EpCAM VL      | ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSISSYLNWYQQK<br>PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ<br>PEDSATYYCQQSYDIPYTFGQGTKLEIK                          |
| 112 | EpCAM CDR-H1  | NYWMS  |
| 113 | EpCAM CDR-H2  | NIKQDGSEKFYADSVKG  |

|     |              |  |
|-----|--------------|--|
| 114 | EpCAM CDR-H3 | VGPSWEQDY  |
| 115 | EpCAM CDR-L1 | TGSSSNIGSYYGVH   |
| 116 | EpCAM CDR-L2 | SDTNRPS  |
| 117 | EpCAM CDR-L3 | QSYDKGFGHRV  |
| 118 | EpCAM VH     | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWV<br>RQAPGKGLEWVANIKQDGSEKFYADSVKGRFTISRDN<br>AKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVGPSWEQDYWGQ<br>GTLVTVSA |
| 119 | EpCAM VL     | QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGSYYGVHWY<br>QQLPGTAPKLLIYSDTNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIT<br>GLQAEDEADYYCQSYD                             |
| 120 | EpCAM CDR-H1 | SYAIS  |
| 121 | EpCAM CDR-H2 | GIPIFGTANYAQKFQG   |
| 122 | EpCAM CDR-H3 | GLLWNY   |
| 123 | EpCAM CDR-L1 | RASQSVSSNLA  |
| 124 | EpCAM CDR-L2 | GASTTAS  |
| 125 | EpCAM CDR-L3 | QQYNNWPPAYT  |
| 126 | EpCAM VH     | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAIWV<br>RQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADES<br>TSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGLLWNYWGQGLV<br>TVSS       |
| 127 | EpCAM VL     | EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQ<br>KPGQAPRLIYGASTTASGIPARFSASGSGTDFTLTISSLQ<br>SEDFAVYYCQQYNNWPPAYTFGQGTKLEIK               |
| 128 | EpCAM CDR-H1 | NYGMN  |
| 129 | EpCAM CDR-H2 | WINTYTGEPTYGEDFKG  |
| 130 | EpCAM CDR-H3 | FGNYVDY  |
| 131 | EpCAM CDR-L1 | RSSKNLLHSNGITYLY   |
| 132 | EpCAM CDR-L2 | QMSNLAS  |
| 133 | EpCAM CDR-L3 | AQNLEIPRT  |
| 134 | EpCAM VH     | QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNW<br>VRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYGEDFKGRFAFSLD<br>TSASTAYMELSSLRSEDVAVYFCARFGNYVDYWGQGS<br>LVTVSS   |
| 135 | EpCAM VL     | DIVMTQSPLSLPVTPEPASPISCRSSKNLLHSNGITYLY<br>WYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFL<br>LKISRVEAEDVGVYYCAQNLEIPRTFGQGTKVEIK           |
| 136 | EpCAM CDR-H1 | KYGMN  |
| 137 | EpCAM CDR-H2 | WINTYTEPTYGDDFKG   |
| 138 | EpCAM CDR-H3 | FGSAVDY  |

|     |              |   |
|-----|--------------|---|
| 139 | EpCAM CDR-L1 | RSSKSLHLSNGITYLY  |
| 140 | EpCAM CDR-L2 | QMSNRAS   |
| 141 | EpCAM CDR-L3 | AQNLELPRT   |
| 142 | EpCAM VH     | QIQLVQSGPEVKKPGESVKISCKASGYTFTKYGMNWV<br>KQAPGQGLKWMGWINTYTEEPTYGDDFKGRFTFTLDT<br>STSTAYLEISSLRSEDATYFCARFGSAVDYWGQGLV<br>TVSS    |
| 143 | EpCAM VL     | DIVMTQSALSNPVTLGESGSISCRSSKSLHLSNGITYLY<br>WYLQKPGQSPQLLIYQMSNRASGVPDRFSSSGSGTDFT<br>LKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPRTFGQGTKLEMKR         |
| 144 | EpCAM CDR-H1 | DYSMH   |
| 145 | EpCAM CDR-H2 | WINTETGEPTYADDFKG   |
| 146 | EpCAM CDR-H3 | TAVY  |
| 147 | EpCAM CDR-L1 | RASQEISVSL  |
| 148 | EpCAM CDR-L2 | ATSTLDS   |
| 149 | EpCAM CDR-L3 | LQYASYPWT   |
| 150 | EpCAM VH     | QVKLQESGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSMHVW<br>KQAPGKGLKWMGWINTETGEPTYADDFKGRFAFSLET<br>SASTAYLQINLNKNETATYFCARTAVYWGQGTTVTV<br>SS      |
| 151 | EpCAM VL     | DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISVSLSWLQQE<br>PDGTIKRLIYATSTLDSGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLES<br>EDFVDYYCLQYASYPWTFGGGTKLEIKR              |
| 152 | CD352 CDR-H1 | NYGMN   |
| 153 | CD352 CDR-H2 | WINTYSGEPYADDFKG  |
| 154 | CD352 CDR-H3 | DYGRWYFDV   |
| 155 | CD352 CDR-L1 | RASSVSHMH   |
| 156 | CD352 CDR-L2 | ATSNLAS   |
| 157 | CD352 CDR-L3 | QQWSSTPRT   |
| 158 | CD352 VH     | QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWV<br>RQAPGQDLKWMGWINTYSGEPYADDFKGRFVFSLD<br>KSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDYGRWYFDVWG<br>QGTTTVTVSS |
| 159 | CD352 VL     | QIVLSQSPATLSLSPGERATMSCRASSVSHMHYQQK<br>PGQAPRPWIYATSNLASGVPARFSGSGSDYTLTISSL<br>EPEDFAVYYCQQWSSTPRTFGGGTKVEIKR                   |
| 160 | CS1 CDR-H1   | RYWMS   |
| 161 | CS1 CDR-H2   | EINPDSSTINYAPSLKD   |
| 162 | CS1 CDR-H3   | PDGNYWYFDV  |
| 163 | CS1 CDR-L1   | KASQDVGIAVA   |

|     |              |  |
|-----|--------------|--|
| 164 | CS1 CDR-L2   | WASTRHT  |
| 165 | CS1 CDR-L3   | QQYSSYPYT  |
| 166 | CS1 VH       | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRYWMSWV<br>RQAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKFIISRDNAL<br>NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPDGNYWYFDVWGQ<br>GTLVTVSS    |
| 167 | CS1 VL       | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGIAVAWYQQ<br>KPGKVPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFLTISL<br>LQPEDVATYYCQQYSSYPYTFGQGTKVEIKR                    |
| 168 | CD38 CDR-H1  | SFAMS  |
| 169 | CD38 CDR-H2  | AISGSGGGTYADSVKG   |
| 170 | CD38 CDR-H3  | DKILWFGPEVFDY  |
| 171 | CD38 CDR-L1  | RASQSVSSYLA  |
| 172 | CD38 CDR-L2  | DASNRAT  |
| 173 | CD38 CDR-L3  | QQRSNWPPT  |
| 174 | CD38 VH      | EVQLLESAGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDNAL<br>NTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGPEVFDYWG<br>QGTLVTVSS |
| 175 | CD38 VL      | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISL<br>PEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKR                      |
| 176 | CD25 CDR-H1  | SYRMH  |
| 177 | CD25 CDR-H2  | YINPSTGYTEYNQKFKD  |
| 178 | CD25 CDR-H3  | GGGVFDY  |
| 179 | CD25 CDR-L1  | SASSISYMH  |
| 180 | CD25 CDR-L2  | TTSNLAS  |
| 181 | CD25 CDR-L3  | HQRSTYPLT  |
| 182 | CD25 VH      | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYRMHW<br>VRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATITADE<br>STNTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGGGVFDYWGQGT<br>LTVSS        |
| 183 | CD25 VL      | DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSISYMHYQQK<br>GKAPKLLIYTTSNLASGVPARFSGSGSGTEFTLISLQ<br>DDFATYYCHQRSTYPLTFGQGTKVEIKR                          |
| 184 | ADAM9 CDR-H1 | SYWM   |
| 185 | ADAM9 CDR-H2 | EIIPINGHTNYNEKFKS  |
| 186 | ADAM9 CDR-H3 | GGYYYYGSRDYFDY   |

|     |              |  |
|-----|--------------|--|
| 187 | ADAM9 CDR-L1 | KASQSVDYDGDSYMN  |
| 188 | ADAM9 CDR-L2 | AASDLES  |
| 189 | ADAM9 CDR-L3 | QQSHEDPFT  |
| 190 | ADAM9 VH     | QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHW<br>VKQRPGQGLEWIGEIIPINGHTNYNEKFKSKATLTLDKS<br>SSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARGGYYYYGSRDYFDY<br>WGQGTTTLTVSS |
| 191 | ADAM9 VL     | DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMN<br>WYQQIPGQPPKLLIYAASDLESGIPARFSGSGSGTDFTL<br>NIHPVEEEDAATYYCQQSHEDPFTFGGGGTKLEIK                 |
| 192 | ADAM9 CDR-H1 | SYWM   |
| 193 | ADAM9 CDR-H2 | EIIPFGHTNYNEKFKS   |
| 194 | ADAM9 CDR-H3 | GGYYYYPRQGFLDY   |
| 195 | ADAM9 CDR-L1 | KASQSVDYDSGDSYMN   |
| 196 | ADAM9 CDR-L2 | AASDLES  |
| 197 | ADAM9 CDR-L3 | QQSHEDPFT  |
| 198 | ADAM9 VH     | EVQLVESGGGLVKPGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWV<br>RQAPGKGLEWVGEIIPFGHTNYNEKFKSRFTISLDNSK<br>NTLYLQMGLSLRAEDTAVYYCARGGYYYYPRQGFLDY<br>WGQGTTVTVSS   |
| 199 | ADAM9 VL     | DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKASQSVDYSGDSYMN<br>WYQQKPGQPPKLLIYAASDLESGIPARFSGSGSGTDFTL<br>TISSLEPEDFATYYCQQSHEDPFTFGQGTKLEIK                  |
| 200 | CD59 CDR-H1  | YGMN   |
| 201 | CD59 CDR-H2  | YISSSSTIYADSVKG  |
| 202 | CD59 CDR-H3  | GPGMDV   |
| 203 | CD59 CDR-L1  | KSSQSVLYSSNNKNYLA  |
| 204 | CD59 CDR-L2  | WASTRES  |
| 205 | CD59 CDR-L3  | QQYYSTPQLT   |
| 206 | CD59 VH      | QVQLQQSGGGVVQPGRSLGLSCAASFTFSSYGMNWVR<br>QAPGKGLEWVSYISSSSTIYADSVKGRFTISRDNKNT<br>LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPGMDVWGQGTTVTVS                   |
| 207 | CD59 VL      | DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYL<br>AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF<br>TPAISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPQLTFGGGTKVDIK               |
| 208 | CD19 CDR-H1  | TSGMGVG  |
| 209 | CD19 CDR-H2  | HIWWDDDKRYNPALKS   |
| 210 | CD19 CDR-H3  | MELWSYYFDY   |

|     |              |  |
|-----|--------------|--|
| 211 | CD19 CDR-L1  | SASSSVSYM  |
| 212 | CD19 CDR-L2  | DTSKLAS  |
| 213 | CD19 CDR-L3  | FQGSVYPFT  |
| 214 | CD19 VH      | QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISTSGMGVGVW<br>IRQHPGKGLEWIGHIWWDDDKRYNPALKSRVTISVDTS<br>KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMELWSYYFDYWGQ<br>GTLVTVSS |
| 215 | CD19 VL      | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKP<br>GQAPRLLIYDTSKLAGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE<br>DVAVYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIKR                   |
| 216 | CD70 CDR-H1  | NYGMN  |
| 217 | CD70 CDR-H2  | WINTYTGEPTYADAFKG  |
| 218 | CD70 CDR-H3  | DYGDYGM DY   |
| 219 | CD70 CDR-L1  | RASKSVSTSGYSFMH  |
| 220 | CD70 CDR-L2  | LASNLES  |
| 221 | CD70 CDR-L3  | QHSREVPWT  |
| 222 | CD70 VH      | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNW<br>VRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTR<br>DTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARDYGDYGM DYW<br>GQGTTVTVSS    |
| 223 | CD70 VL      | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMH<br>WYQQKPGQPPLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTL<br>TISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK               |
| 224 | B7H4 CDR-H1  | SGYSWH   |
| 225 | B7H4 CDR-H2  | YIHSSGSTNYPNPSLKS  |
| 226 | B7H4 CDR-H3  | YDDYFEY  |
| 227 | B7H4 CDR-L1  | KASQNVGFNVA  |
| 228 | B7H4 CDR-L2  | SASYRYS  |
| 229 | B7H4 CDR-L3  | QQYNWYPFT  |
| 230 | B7H4 VH      | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCVAVTGYSITSGYSWHWI<br>RQFPNGLEWMGYIHSSTNYPNPSLKSRLSRDTSKN<br>QFFLKLSSVTAADTAVYYCAGYDDYFEYWGQGTTVT<br>VSS        |
| 231 | B7H4 VL      | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGFNVAWYQ<br>QKPGKSPKALIYSASYRYSRVPSRFSGSGSGTDFTLTISS<br>LQPEDFAEYFCQQYNWYPFTFGQGTKLEIK                   |
| 232 | CD138 CDR-H1 | NYWIE  |
| 233 | CD138 CDR-H2 | EILPGTGRTIYNEKFKG  |
| 234 | CD138 CDR-H3 | RDYYGNFYAMDY   |
| 235 | CD138 CDR-L1 | SASQGINNYLN  |

|     |              |  |
|-----|--------------|--|
| 236 | CD138 CDR-L2 | YTSTLQS  |
| 237 | CD138 CDR-L3 | QQYSKLPRT  |
| 238 | CD138 VH     | QVQLQQSGSELMMPGASVKISCKATGYTFSNYWIEWV<br>KQRPGHGLEWIGEILPGTGRTIY<br>NEKFKGKATFTADISSNTVQMQLSSLTSEDSAVYYCAR<br>RDYYGNFYAMDYWGQGTSTVTVSS |
| 239 | CD138 VL     | DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCSASQGINNYLNWYQQ<br>KPDGTVELLIYYTSTLQSGVP<br>SRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIGTYQCQQYSKLPRTFG<br>GGTKLEIK                |
| 240 | CD166 CDR-H1 | TYGMGVG  |
| 241 | CD166 CDR-H2 | NIWVSEDKHYSPLKS  |
| 242 | CD166 CDR-H3 | IDYGNDYAFTY  |
| 243 | CD166 CDR-L1 | RSSKSLHLSNGITYLY   |
| 244 | CD166 CDR-L2 | QMSNLAS  |
| 245 | CD166 CDR-L3 | AQNLELPYT  |
| 246 | CD166 VH     | QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVGWI<br>RQPPGKALEWLANIWWSEDKHYSPLKSRLTITKDTSK<br>NQVVLITNVDPVDTATYYCVQIDYGNDYAFTYWGQG<br>TLVTVSS    |
| 247 | CD166 VL     | DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLHLSNGITYLYW<br>YLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTL<br>KISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKLEIK               |
| 248 | CD51 CDR-H1  | RYTMH  |
| 249 | CD51 CDR-H2  | VISFDGSNKYYVDSVKG  |
| 250 | CD51 CDR-H3  | EARGSYAFDI   |
| 251 | CD51 CDR-L1  | RASQSVSSYLA  |
| 252 | CD51 CDR-L2  | DASNRAT  |
| 253 | CD51 CDR-L3  | QQRSNWPPFT   |
| 254 | CD51 VH      | QVQLVESGGGVVQPGRSRRLSCAASGFTFSRYTMHVV<br>RQAPGKGLEWVAVISFDGSNKYYVDSVKGRFTISRDN<br>ENTLYLQVNILRAEDTAVYYCAREARGSYAFDIWGQG<br>TMVTVSS     |
| 255 | CD51 VL      | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSE<br>PEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK                    |
| 256 | CD56 CDR-H1  | SFGMH  |
| 257 | CD56 CDR-H2  | YISSGSFTIYYADSVKG  |
| 258 | CD56 CDR-H3  | MRKGYAMDY  |
| 259 | CD56 CDR-L1  | RSSQIIHSDGNTYLE  |

|     |                   |   |
|-----|-------------------|---|
| 260 | CD56 CDR-L2       | KVSNRFS   |
| 261 | CD56 CDR-L3       | FQGSHVPHT   |
| 262 | CD56 VH           | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSEFGMHWV<br>RQAPGKGLEWVAYISSGSFTIYYADSVKGRFTISRDN<br>NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMRKGYAMDYWGQG<br>TLVTVSS   |
| 263 | CD56 VL           | DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQIIIHSDGNTYLEW<br>FQQRPGQSPRRLIYKVSNNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLK<br>ISRVEAEDVGVYYCFQGSHPHTFGQGTKVEIK             |
| 264 | CD74 CDR-H1       | NYGVN   |
| 265 | CD74 CDR-H2       | WINPNTGEPTFDDDFKG   |
| 266 | CD74 CDR-H3       | SRGKNEAWFAY   |
| 267 | CD74 CDR-L1       | RSSQSLVHRNGNTYLH  |
| 268 | CD74 CDR-L2       | TVSNRFS   |
| 269 | CD74 CDR-L3       | SQSSHVPPT   |
| 270 | CD74 VH           | QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGVNWI<br>KQAPGQGLQWMGWNPNTGEPTFDDDFKGRFAFSLDT<br>SVSTAYLQISSLKADDTAVYFCRSRSGKNEAWFAYWG<br>QGTLVTVSS  |
| 271 | CD74 VL           | DIQLTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLH<br>WFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL<br>KISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK             |
| 272 | CEACAM5<br>CDR-H1 | TYWMS   |
| 273 | CEACAM5<br>CDR-H2 | EIHPDSSSTINYAPSLKD  |
| 274 | CEACAM5<br>CDR-H3 | LYFGFPWFAY  |
| 275 | CEACAM5<br>CDR-L1 | KASQDVGTSVA   |
| 276 | CEACAM5<br>CDR-L2 | WTSTRHT   |
| 277 | CEACAM5<br>CDR-L3 | QQYSLYRS  |
| 278 | CEACAM5 VH        | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFDFTTYWMSWV<br>RQAPGKGLEWIGEIHPDSSSTINYAPSLKDRFTISRDN<br>NTLFLQMDSLRLPEDTGVYFCASLYFGFPWFAYWGQGT<br>PVTVSS |
| 279 | CEACAM5 VL        | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQ<br>KPGKAPKLLIYWTSTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFISSL<br>QPEDIATYYCQQYSLYRSFGQGTKVEIK                   |
| 280 | CanAg CDR-H1      | YYGMN   |

|     |               |  |
|-----|---------------|--|
| 281 | CanAg CDR-H2  | WIDTTTGEPTYAQKFQG  |
| 282 | CanAg CDR-H3  | RGPYNWYFDV   |
| 283 | CanAg CDR-L1  | RSSKSLLSHNGNTYLY   |
| 284 | CanAg CDR-L2  | RMSNLVS  |
| 285 | CanAg CDR-L3  | LQHLEYPFT  |
| 286 | CanAg VH      | QVQLVQSGAEVKKPGETVKISCKASDYTFTYYGMNW<br>VKQAPGQGLKWMGWIDTTTGEPTYAQKFQGRIAFSLE<br>TSASTAYLQIKSLKSEDATYFCARRGPYNWYFDVWG<br>QGTTVTVSS     |
| 287 | CanAg VL      | DIVMTQSPLSVPVTPGEPVSISCRSSKSLLSHNGNTYLY<br>WFLQRPQGQSPQLLIYRMSNLVSGVPDRFSGSGSGTAFT<br>LRISRVEAEDVGVVYCLQHLEYPFTFGPGTKLELK              |
| 288 | DLL-3 CDR-H1  | NYGMN  |
| 289 | DLL-3 CDR-H2  | WINTYTGEPTYADDFKG  |
| 290 | DLL-3 CDR-H3  | IGDSSPSDY  |
| 291 | DLL-3 CDR-L1  | KASQSVSNDVV  |
| 292 | DLL-3 CDR-L2  | YASNRYT  |
| 293 | DLL-3 CDR-L3  | QQDYTSPWT  |
| 294 | DLL-3 VH      | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNW<br>VRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTY<br>ADDFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCA<br>RIGDSSPSDYWGQGLTVTVSS      |
| 295 | DLL-3 VL      | EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVSNDVVWYQQ<br>KPGQAPRLLIYYASNRYTGIPA<br>RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQDYTSPWTFG<br>QGTKLEIK                |
| 296 | DPEP-3 CDR-H1 | SYWIE  |
| 297 | DPEP-3 CDR-H2 | EILPGSGNTYYNERFKD  |
| 298 | DPEP-3 CDR-H3 | RAAAYYSNPEWFAY   |
| 299 | DPEP-3 CDR-L1 | TASSSVNSFYLH   |
| 300 | DPEP-3 CDR-L2 | STSNLAS  |
| 301 | DPEP-3 CDR-L3 | HQYHRSPYT  |
| 302 | DPEP-3 VH     | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYWIEWV<br>RQAPGQGLEWMGEILPGSGNTYYNERFKDRVTITADES<br>TSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRAAAYYSNPEWFAY<br>WGQGLTVTVSS |
| 303 | DPEP-3 VL     | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVNSFYLHWYQQ<br>KPGGLAPRLLIYSTSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE<br>PEDFAVYYCHQYHRSPYTFGQGTKLEIK                  |
| 304 | EGFR CDR-H1   | SYWMQ  |

|     |             |  |
|-----|-------------|--|
| 305 | EGFR CDR-H2 | TIYPGDGDTTYTQKFQG  |
| 306 | EGFR CDR-H3 | YDAPGYAMDY   |
| 307 | EGFR CDR-L1 | RASQDINNYLA  |
| 308 | EGFR CDR-L2 | YTSTLHP  |
| 309 | EGFR CDR-L3 | LQYDNLLYT  |
| 310 | EGFR VH     | QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQW<br>VKQRPGQGLECIGTIYPGDGDTTYTQKFQ GKATLTADK<br>SSSTAYMQLSSLRSEDSAVYYCARYDAPGYAMDYWG<br>QGTLVTVSS |
| 311 | EGFR VL     | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLA<br>WYQH KPGKGP KLLIHYTSTLHPGIPSRFSGSGS<br>GRDYSFSSISLE PEDIATYYCLQYDNLLYTFGQ<br>GTKLEIK           |
| 312 | EGFR CDR-H1 | RDFAWN   |
| 313 | EGFR CDR-H2 | YISYNGNTRYQPSLKS   |
| 314 | EGFR CDR-H3 | ASRGFPY  |
| 315 | EGFR CDR-L1 | HSSQDINSNIG  |
| 316 | EGFR CDR-L2 | HGTNLDD  |
| 317 | EGFR CDR-L3 | VQYAQFPWT  |
| 318 | EGFR VH     | EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISRDFAWN<br>WI RQPPGKGLEWMGYISYNGNTRYQPSLKS<br>SRITISRDTSK NQFFLKLNSVTAADTATYYC<br>VTASRGFPYWGQGTLVTVSS   |
| 319 | EGFR VL     | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIG<br>WLQQK PGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGS<br>GSGTDYTLTISSL QPEDFATYYCVQYAQFPW<br>TFGGGTKLEIK            |
| 320 | EGFR CDR-H1 | RDFAWN   |
| 321 | EGFR CDR-H2 | YISYNGNTRYQPSLKS   |
| 322 | EGFR CDR-H3 | ASRGFPY  |
| 323 | EGFR CDR-L1 | HSSQDINSNIG  |
| 324 | EGFR CDR-L2 | HGTNLDD  |
| 325 | EGFR CDR-L3 | VQYAQFPWT  |
| 326 | EGFR VH     | EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISRDFAWN<br>WI RQPPGKGLEWMGYISYNGNTRYQPSLKS<br>SRITISRDTSK NQFFLKLNSVTAADTATYYC<br>VTASRGFPYWGQGTLVTVSS   |
| 327 | EGFR VL     | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIG<br>WLQQK PGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGS<br>GSGTDYTLTISSL QPEDFATYYCVQYAQFPW<br>TFGGGTKLEIK            |
| 328 | EGFR CDR-H1 | NYGVH  |
| 329 | EGFR CDR-H2 | VIWSSGNTDYNTPFST   |

|     |              |   |
|-----|--------------|---|
| 330 | EGFR CDR-H3  | ALTYDYEFAY  |
| 331 | EGFR CDR-L1  | RASQSIGTNIH   |
| 332 | EGFR CDR-L2  | YASESIS   |
| 333 | EGFR CDR-L3  | QQNNNWPTT   |
| 334 | EGFR VH      | QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVR<br>QSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTSRLSINKDNSKS<br>QVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGT<br>LVTVSA     |
| 335 | EGFR VL      | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRT<br>NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSDFTLSINSVESE<br>DIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELK                   |
| 336 | FRa CDR-H1   | GYFMN   |
| 337 | FRa CDR-H2   | RIHPYDGDTFYNQKFQG   |
| 338 | FRa CDR-H3   | YDGSRAMDY   |
| 339 | FRa CDR-L1   | KASQSVSFAGTSLMH   |
| 340 | FRa CDR-L2   | RASNLEA   |
| 341 | FRa CDR-L3   | QQSREYPYT   |
| 342 | FRa VH       | QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWV<br>KQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFY<br>NQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSDFAVYYCT<br>RYDGSRAMDYWGQGTITVTVSS  |
| 343 | FRa VL       | DIVLTQSPSLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHW<br>YHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTL<br>TISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIK             |
| 344 | FRa CDR-H1   | GYGLS   |
| 345 | FRa CDR-H2   | MISSGGSYTYADSVKG  |
| 346 | FRa CDR-H3   | HGDDPAWFAY  |
| 347 | FRa CDR-L1   | SVSSSISNNLH   |
| 348 | FRa CDR-L2   | GTSNLAS   |
| 349 | FRa CDR-L3   | QQWSSYPMYT  |
| 350 | FRa VH       | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFTFSGYGLSWVR<br>QAPGKGLEWVAMISSGGSYTY<br>ADSVKGRFAISRDNKNTLFLQMDSLRLPEDTGVYFCAR<br>HGDDPAWFAYWGQGTPTVTVSS |
| 351 | FRa VL       | DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSVSSSISNNLHWYQQ<br>KPGKAPKRWIYGTSNLASGVPSRFSGSGSDYFTFTISS<br>LQPEDIATYYCQQWSSYPMYTFGQGTKVEIK                  |
| 352 | MUC-1 CDR-H1 | NYWMN   |
| 353 | MUC-1 CDR-H2 | EIRLKSNNYTTHYAESVKG   |
| 354 | MUC-1 CDR-H3 | HYYFDY  |

|     |                   |  |
|-----|-------------------|--|
| 355 | MUC-1 CDR-L1      | RSSKSLHLSNGITYFF   |
| 356 | MUC-1 CDR-L2      | QMSNLAS  |
| 357 | MUC-1 CDR-L3      | AQNLELPPT  |
| 358 | MUC-1 VH          | EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCVASGFPSNYWMNW<br>VRQAPGKGLEWVGEIRLKSNNYTTHYAESVKGRFTISR<br>DDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHYFDYWGQG<br>TLVTVSS      |
| 359 | MUC-1 VL          | DIVMTQSPLSNPVTGPASISCRSSKSLHLSNGITYFFW<br>YLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTL<br>RISRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTFGQGTKVEIK               |
| 360 | Mesothelin CDR-H1 | SYWIG  |
| 361 | Mesothelin CDR-H2 | IIDPGDSRTRYSPSFQG  |
| 362 | Mesothelin CDR-H3 | GQLYGGTYMDG  |
| 363 | Mesothelin CDR-L1 | TGTSSDIGGYNVS  |
| 364 | Mesothelin CDR-L2 | GVNNRPS  |
| 365 | Mesothelin CDR-L3 | SSYDIESATPV  |
| 366 | Mesothelin VH     | QVELVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVR<br>QAPGKGLEWMGIIDPGDSRTRYSPSFQGQVTISADKISS<br>TAYLQWSSLKASDTAMYICARGQLYGGTYMDGWGQ<br>GTLVTVSS |
| 367 | Mesothelin VL     | DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNVSWYQQ<br>HPGKAPKLMYGVNNRPSGV<br>SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYDIESAT<br>PVFGGGTKLTVL            |
| 368 | ROR-1 CDR-H1      | AYNIH  |
| 369 | ROR-1 CDR-H2      | SFDPYDGGSSYNQKFKD  |
| 370 | ROR-1 CDR-H3      | GWYYFDY  |
| 371 | ROR-1 CDR-L1      | RASKSISKYLA  |
| 372 | ROR-1 CDR-L2      | SGSTLQS  |
| 373 | ROR-1 CDR-L3      | QQHDESPYT  |
| 374 | ROR-1 VH          | QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYAFTAYNIHWVR<br>QAPGQGLEWMGSFDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTS<br>KNQVVLMTNMDPVDTATYYCARGWYYFDYWGHGT<br>LTVTVSS      |
| 375 | ROR-1 VL          | DIVMTQTPLSLPVTGPASISCRASKSISKYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIYSGSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIES<br>EDAAYYFCQQHDESPYTFGEGTKVEIK                    |

|     |              |   |
|-----|--------------|---|
| 376 | B7H4 CDR-H1  | GSIKSGSYYWG   |
| 377 | B7H4 CDR-H2  | NIYYSGSTYYNPSLRS  |
| 378 | B7H4 CDR-H3  | AREGSYPNQFDP  |
| 379 | B7H4 CDR-L1  | RASQSVSSNLA   |
| 380 | B7H4 CDR-L2  | GASTRAT   |
| 381 | B7H4 CDR-L3  | QQYHSFPFT   |
| 382 | B7H4 VH      | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIKSGSYYWGW<br>IRQPPGKGLEWIGNIYYSGSTY<br>YNPSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA<br>REGSYPNQFDPWGQGTTLTVSS  |
| 383 | B7H4 VL      | EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQ<br>KPGQAPRLLIYGASTRATGIPA<br>RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYHSFPFTFG<br>GGTKVEIK               |
| 384 | B7-H3 CDR-H1 | SFGMH   |
| 385 | B7-H3 CDR-H2 | YISSDSSAIYY   |
| 386 | B7-H3 CDR-H3 | GRENIYYGSRLD  |
| 387 | B7-H3 CDR-L1 | KASQNVD   |
| 388 | B7-H3 CDR-L2 | SASYRYSGVPD   |
| 389 | B7-H3 CDR-L3 | QQYNNYPFTFGS  |
| 390 | B7-H3 VH     | DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHWV<br>RQAPEKGLEWVAYISSDSSAIYY<br>ADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCGR<br>GRENIYYGSRLDYWGQGTTLTVSS |
| 391 | B7-H3 VL     | DIAMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVDTNVAWY<br>QQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPD<br>RFTGSGSGTDFTLTINNVQSEDLAEYFCQQYNNYPFTF<br>GSGTKLEIK               |
| 392 | B7-H3 CDR-H1 | SYWMQWVRQA  |
| 393 | B7-H3 CDR-H2 | TIYPGDGDTRY   |
| 394 | B7-H3 CDR-H3 | RGIPRLWYFDVM  |
| 395 | B7-H3 CDR-L1 | ITCRASQDIS  |
| 396 | B7-H3 CDR-L2 | YTSRLHSGVPS   |
| 397 | B7-H3 CDR-L3 | QQGNTLPPFTGG  |
| 398 | B7-H3 VH     | DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHWV<br>RQAPEKGLEWVAYISSDSSAIYY<br>ADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCGR<br>GRENIYYGSRLDYWGQGTTLTVSS |
| 399 | B7-H3 VL     | DIAMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVDTNVAWY<br>QQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPD  |

|     |              |  |
|-----|--------------|--|
|     |              | RFTGSGSGTDFTLTINNVQSEDLAEYFCQQYNNYPFTF<br>GSGTKLEIK  |
| 400 | B7-H3 CDR-H1 | SYGMSWVRQA   |
| 401 | B7-H3 CDR-H2 | INSGGSNTYY   |
| 402 | B7-H3 CDR-H3 | HDGGAMDYW  |
| 403 | B7-H3 CDR-L1 | ITCRASESIYSYLA   |
| 404 | B7-H3 CDR-L2 | NTKTLPE  |
| 405 | B7-H3 CDR-L3 | HHYGTPPWTFG  |
| 406 | B7-H3 VH     | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWV<br>RQAPGKGLEWVATINSGGSNTYY<br>PDSLKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA<br>RHDGGAMDYWGQGTTVTVSS     |
| 407 | B7-H3 VL     | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESIYSYLAWYQQK<br>PGKAPKLLVYNTKTLPEGVPSRFSGSGSGTDFLTISL<br>QPEDFATYYCQHHYGTPPWTFGQGTRLEIK                    |
| 408 | B7-H3 CDR-H1 | SFGMHWVRQA   |
| 409 | B7-H3 CDR-H2 | ISSGSGTIYYADTVKGRFTI   |
| 410 | B7-H3 CDR-H3 | HGYRYEGFDYWG   |
| 411 | B7-H3 CDR-L1 | ITCKASQNVDTNVA   |
| 412 | B7-H3 CDR-L2 | SASYRYSGVPS  |
| 413 | B7-H3 CDR-L3 | QQYNNYPFTFGQ   |
| 414 | B7-H3 VH     | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWV<br>RQAPGKGLEWVAYISSGSGTIY<br>YADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC<br>ARHGYYRYEGFDYWGQGTTVTVSS  |
| 415 | B7-H3 VL     | DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCKASQNVDTNVAWYQ<br>QKPGKAPKALIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFLTISS<br>LQPEDFAEYFCQQYNNYPFTFGQGTKLEIK                    |
| 416 | B7-H3 CDR-H1 | NYVMH  |
| 417 | B7-H3 CDR-H2 | YINPYNDDVKYNEKFKG  |
| 418 | B7-H3 CDR-H3 | WGYYGSPLYFDY   |
| 419 | B7-H3 CDR-L1 | RASSRLIYMH   |
| 420 | B7-H3 CDR-L2 | ATSNLAS  |
| 421 | B7-H3 CDR-L3 | QQWNSNPPT  |
| 422 | B7-H3 VH     | EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCASGYFTFTNYVMHW<br>VKQKPGQGLEWIGYINPYNDDVKYNEKFKGKATQTS<br>KSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARWGYYGSPLYFD<br>YWGQGTTLTVSS |
| 423 | B7-H3 VL     | QIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRASSRLIYMHYQQKP<br>GSSPKPWIYATSNLASGVPAR  |

|     |              |   |
|-----|--------------|---|
|     |              | FSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWNSNPPTFG<br>TGTKLELK  |
| 424 | B7-H3 CDR-H1 | NYVMH   |
| 425 | B7-H3 CDR-H2 | YINPYNDDVKYNEKFKG   |
| 426 | B7-H3 CDR-H3 | WGYYGSPLYFYFDY  |
| 427 | B7-H3 CDR-L1 | RASSRLIYMH  |
| 428 | B7-H3 CDR-L2 | ATSNLAS   |
| 429 | B7-H3 CDR-L3 | QQWNSNPPT   |
| 430 | B7-H3 VH     | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYVMHW<br>VRQAPGQGLEWMGYINPYNDDVKYNE<br>KFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARWG<br>YYGSPLYFYFDYWGQGTLVTVSS |
| 431 | B7-H3 VL     | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHYQQKP<br>GQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPE<br>DFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIK                        |
| 432 | B7-H3 CDR-H1 | GYSFTSYTIH  |
| 433 | B7-H3 CDR-H2 | YINPNRNTDYAQKFQG  |
| 434 | B7-H3 CDR-H3 | YSGSTPYWYFDV  |
| 435 | B7-H3 CDR-L1 | RASSSVSYMN  |
| 436 | B7-H3 CDR-L2 | ATSNLAS   |
| 437 | B7-H3 CDR-L3 | QQWSSNPLT   |
| 438 | B7-H3 VH     | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSTSYTIHWVR<br>QAPGQGLEWMGYINPNRNTDYAQKFQGRVTLTADKS<br>TSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARYSGSTPYWYFDVWG<br>QGTTVTVSS     |
| 439 | B7-H3 VL     | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGFNVAWYQ<br>QKPGKSPKALIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS<br>LQPEDFAEYFCQQYNWYPFTFGQGTKLEIK                       |
| 440 | B7-H3 CDR-H1 | GYTFSSYWMH  |
| 441 | B7-H3 CDR-H2 | LIHPDSGSTNYNEMFKN   |
| 442 | B7-H3 CDR-H3 | GGRLYFD   |
| 443 | B7-H3 CDR-L1 | RSSQSLVHSNGDTYLR  |
| 444 | B7-H3 CDR-L2 | KVSNRFS   |
| 445 | B7-H3 CDR-L3 | SQSTHVPYT   |
| 446 | B7-H3 VH     | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYWMHW<br>VRQAPGQGLEWIGLIHPDSGSTNYNEMFKNRATLTVD<br>RSTSTAYVELSSLRSEDNAVYFCAGGGRLYFDYWGQG<br>TTVTVSS       |
| 447 | B7-H3 VL     | DVVMTQSPSLPVTPEPASPISCRSSQSLVHSNGDTYLR<br>WYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSQVPSRFSGSGSGTDFT<br>LKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIK                 |

|     |              |  |
|-----|--------------|--|
| 448 | B7-H3 CDR-H1 | GYTFSSYWMH   |
| 449 | B7-H3 CDR-H2 | LIHPESGSTNYNEMFKN  |
| 450 | B7-H3 CDR-H3 | GGRLYFDY   |
| 451 | B7-H3 CDR-L1 | RSSQSLVHSNQDTYLR   |
| 452 | B7-H3 CDR-L2 | KVSNRFS  |
| 453 | B7-H3 CDR-L3 | SQSTHVPYT  |
| 454 | B7-H3 VH     | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFSSYWMHW<br>VRQAPGQGLEWIGLIHPESGSTNY<br>NEMFKNRATLTVDRSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCA<br>GGRLYFDYWGQGTITVTVSS   |
| 455 | B7-H3 VL     | DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSNQDTYLR<br>WYLQKPGQSPQLLIYKVSNR<br>SGVPDRFSGSGSTDFTLKIKSRVEAEDVGVYYCSQST<br>HVPYTFGGGTKVEIK        |
| 456 | B7-H3 CDR-H1 | TGYSITSGYSWH   |
| 457 | B7-H3 CDR-H2 | YIHSSGSTNYNPSLKS   |
| 458 | B7-H3 CDR-H3 | YDDYFEY  |
| 459 | B7-H3 CDR-L1 | KASQNVGFVAVW   |
| 460 | B7-H3 CDR-L2 | SASYRYS  |
| 461 | B7-H3 CDR-L3 | QQYNWYPFT  |
| 462 | B7-H3 VH     | EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVTGYSITSGYSWHWI<br>RQFPNGLEWMGYIHPESGSTNY<br>NPSLKSRLSRDTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYCAGY<br>DDYFEYWGQGTITVTVSS   |
| 463 | B7-H3 VL     | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGGFNVAWY<br>QQKPGKSPKALIYSASYRYS<br>PSRFSGSGSTDFTLTISLQPEDFAEYFCQQYNWYPFT<br>FGQGTKLEIK                |
| 464 | B7-H3 CDR-H1 | NYDIN  |
| 465 | B7-H3 CDR-H2 | WIGWIFPGDDSTQYNEKFKG   |
| 466 | B7-H3 CDR-H3 | QTTGTWFAY  |
| 467 | B7-H3 CDR-L1 | RASQISDYL  |
| 468 | B7-H3 CDR-L2 | YASQIS   |
| 469 | B7-H3 CDR-L3 | CQNGHSFPL  |
| 470 | B7-H3 VH     | QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKTSQYFTNYDINWV<br>RQRPGQGLEWIGWIFPGDDSTQY<br>NEKFKGKATLTTDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCAR<br>QTTGTWFAYWGQGTITVTVSS |
| 471 | B7-H3 VL     | EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCRASQISDYLWYQQ<br>KSHESPRLLIKYASQISGIPA  |

|     |              |   |
|-----|--------------|---|
|     |              | RFSGSGSGSEFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFG<br>QGTKLELK   |
| 472 | B7-H3 VH     | QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWV<br>RQAPGQGLEWMGGIIPILGIAN<br>YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCA<br>RGGSGSYHMDVWGKGTITVTVSS  |
| 473 | B7-H3 VL     | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIYDASNRAITGIP<br>ARFSGSGSGTDFTLTISLSEPEDFAVYYCQQRSNWPPRI<br>TFGQGRLEIK             |
| 474 | B7-H3 CDR-H1 | IYNVH   |
| 475 | B7-H3 CDR-H2 | TIFPGNGDTSYNQKFKD   |
| 476 | B7-H3 CDR-H3 | WDDGNVGFSAH   |
| 477 | B7-H3 CDR-L1 | RASENINNYLT   |
| 478 | B7-H3 CDR-L2 | HAKTLAE   |
| 479 | B7-H3 CDR-L3 | QHHYGTPPT   |
| 480 | B7-H3 VH     | QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTIYNVHWI<br>KQTPGQGLEWMGTIFPGNGDTSY<br>NQKFKDKATLTTDKSSKTAYMQLNSLTSEDSAVYYCA<br>RWDDGNVGFSAHWGQGTITVTVSA |
| 481 | B7-H3 VL     | DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENINNYLTWVQPK<br>QGKSPQLLVYHAKTLAEGVPS<br>RFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYCQHHYGTPPTFG<br>GGTKLEIK                |
| 482 | B7-H3 VH     | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTIYNVHWV<br>RQAPGQGLEWMGTIFPGNGDTS<br>YNQKFKDKVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYC<br>ARWDDGNVGFSAHWGQGTITVTVSS |
| 483 | B7-H3 VL     | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENINNYLTWVQPK<br>QGKSPQLLIYHAKTLAEGVP<br>SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHYGTPPTF<br>GGGTKVEIK                 |
| 484 | B7-H3 VH     | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTIYNVHWI<br>RQAPGQGLEWMGTIFPGNGDTSY<br>NQKFKDRATLTTDKSTKTAYMELRSLRSDDTAVYYCA<br>RWDDGNVGFSAHWGQGTITVTVSS |
| 485 | B7-H3 VL     | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENINNYLTWVQPK<br>PGKAPKLLVYHAKTLAEGVPS<br>RFSGSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYCQHHYGTPPTFG<br>QGTKLEIK                 |
| 486 | HER3 H       | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWI<br>RQPPGKGLEWIGEINHSNSTNYN<br>PSLKSRTVTSVETSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARD<br>KWTWYFDLWGRGTLVTVSSAST    |

|     |        |  |
|-----|--------|--|
|     |        | <p>KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br/> NSGALTSGVHTFPAVLQSSGL<br/> YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV<br/> KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT<br/> EVTCCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE<br/> EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP<br/> APIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL<br/> VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL<br/> YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL<br/> SPGK</p>  |
| 487 | HER3 L | <p>DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYL<br/> AWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF<br/> TLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKRT<br/> VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ<br/> WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLKAD<br/> YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>   |
| 488 | HER3 H | <p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWV<br/> RQAPGKGLEWVSSISSGGWTLY<br/> ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCT<br/> RGLKMATIFDYWGQGLTVTVSSA<br/> STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS<br/> WNSGALTSGVHTFPAVLQSSG<br/> LYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVE<br/> RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL<br/> FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVD<br/> GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV<br/> VSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK<br/> GQPREPVYTLPPSREEMTKNQ<br/> VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS<br/> DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br/> FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> |
| 489 | HER3 L | <p>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVVS<br/> WYQ<br/> QHPGKAPKLIIEVVSQRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISG<br/> LQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGGTKVTVLGQPKAA<br/> PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGA VTVAWKA<br/> DGSPVKVGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS<br/> HRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAEC</p>   |
| 490 | HER3 H | <p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVR<br/> QAPGKGLEWVSAIN SQGKSTYYADSVKGRFTISRDN<br/> SK<br/> NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQGL<br/> TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br/> PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP<br/> SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCP<br/> PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV<br/> SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV</p>   |

|     |             |  |
|-----|-------------|--|
|     |             | VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA<br>VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR<br>WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK   |
| 491 | HER3 L      | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQ<br>KPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL<br>QPEDFATYYCQQYSSFPSTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI<br>FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL<br>QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY<br>ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  |
| 492 | HER3 H      | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFRSSYISWV<br>RQAPGQGLEWMGWYAGTGSPSYNQKLQGRVTMTTD<br>TSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARHRDYYSNSLTYW<br>GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV<br>KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS<br>TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI<br>SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV<br>DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPG |
| 493 | HER3 L      | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLNSGNQKNY<br>LTWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD<br>FTLTISSLQAEDVAVYYCQSDYSYPYTFGQGTKLEIKRT<br>VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD<br>YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC   |
| 494 | PTK7 CDR-H1 | TSNMGVG  |
| 495 | PTK7 CDR-H2 | HIWWDDDKYYSPSLKS   |
| 496 | PTK7 CDR-H3 | SNYGYAWFAY   |
| 497 | PTK7 CDR-L1 | KASQDIYPYLN  |
| 498 | PTK7 CDR-L2 | RTNRLLD  |
| 499 | PTK7 CDR-L3 | LQYDEFPLT  |
| 500 | PTK7 VH     | QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSNMGVGWI<br>RQPPGKALEWLAHIWWDDDKYYSPSLKSRLTITKDTS<br>KNQVVLMTNMDPVDATYYCVRSNYGYAWFAYWG<br>QGTLTVSS   |
| 501 | PTK7 VL     | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYPYLNWFQQ<br>KPGKAPKTLIYRTNRLLDGVPS<br>RFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCLQYDEFPLTFGA<br>GTKLEIK   |
| 502 | PTK7 CDR-H1 | DYAVH  |

|     |             |  |
|-----|-------------|--|
| 503 | PTK7 CDR-H2 | VISTYNDYTYNNQDFKG  |
| 504 | PTK7 CDR-H3 | GNSYFYALDY   |
| 505 | PTK7 CDR-L1 | RASESVDSYGKSFMH  |
| 506 | PTK7 CDR-L2 | RASNLES  |
| 507 | PTK7 CDR-L3 | QQSNEDPWT  |
| 508 | PTK7 VH     | QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAVHW<br>VRQAPGKRLEWIGVISTYNDYTY<br>NNQDFKGRVTMTRDTSASTAYMELSRRLRSEDTAVYYC<br>ARGNSYFYALDYWGQGTSVTVSS |
| 509 | PTK7 VL     | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDSYGKSFMHW<br>YQQKPGQAPRLLIYRASNLES<br>GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSNEDP<br>WTFGGGTKLEIK          |
| 510 | PTK7 CDR-H1 | RYWMS  |
| 511 | PTK7 CDR-H2 | DLNPDSSAINYVDSVKG  |
| 512 | PTK7 CDR-H3 | ITTLVPYTMDF  |
| 513 | PTK7 CDR-L1 | ITNTDIDDDMN  |
| 514 | PTK7 CDR-L2 | EGNGLRP  |
| 515 | PTK7 CDR-L3 | LQSDNLPLT  |
| 516 | PTK7 VH     | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRYWMSWV<br>RQAPGKGLEWIGDLNPDSSAINY<br>VDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCT<br>LITTLVPYTMDFWGQGTSVTVSS  |
| 517 | PTK7 VL     | ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCITNTDIDDDMNWYQQ<br>KPGEAAILLISEGNGLRPGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIE<br>SEDAAYYFCLQSDNLPLTFGSGTKLEIK                  |
| 518 | LIV1 CDR-H1 | DYYMH  |
| 519 | LIV1 CDR-H2 | WIDPENGDEYGPKEFQ   |
| 520 | LIV1 CDR-H3 | HNAHYGTWFAY  |
| 521 | LIV1 CDR-L1 | RSSQSLHSSGNTYLE  |
| 522 | LIV1 CDR-L2 | KISTRFS  |
| 523 | LIV1 CDR-L3 | FQGSHPYPT  |
| 524 | LIV1 VH     | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGLTIEDYYMHW<br>VRQAPGQGLEWMGWIDPENGDEY<br>GPKFQGRVTMTRDTSINTAYMELSRRLRSDDTAVYYCA<br>VHNAHYGTWFAYWGQGLVTVSS  |
| 525 | LIV1 VL     | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLE<br>WYQQRPGQSPRPLIYKISTRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL<br>KISRVEAEDVGVYYCFQGSHPYPTFGGGTKVEIK              |
| 526 | avb6 CDR-H1 | DYNVN  |

|     |              |   |
|-----|--------------|---|
| 527 | avb6 CDR-H2  | VINPKYGTTTRYNQKFKG  |
| 528 | avb6 CDR-H3  | GLNAWDY   |
| 529 | avb6 CDR-L1  | GASENIYGALN   |
| 530 | avb6 CDR-L2  | GATNLED   |
| 531 | avb6 CDR-L3  | QNVLTTPYT   |
| 532 | avb6 VH      | QFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYNVNW<br>VRQAPGQGLEWIGVINPKYGTTTRY<br>NQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCT<br>RGLNAWDYWGQGLVTVSS |
| 533 | avb6 VL      | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQ<br>KPGKAPKLLIYGATNLEDGVP<br>RFSGSGSGRDYFTFTISSLPEDIATYYCQNVLTTPYTFG<br>QGTKLEIK         |
| 534 | avb6 CDR-H1  | GYFMN   |
| 535 | avb6 CDR-H2  | LINPYNGDSFYNQKFKG   |
| 536 | avb6 CDR-H3  | GLRRDFDY  |
| 537 | avb6 CDR-L1  | KSSQSLLDSDGKTYLN  |
| 538 | avb6 CDR-L2  | LVSELD  |
| 539 | avb6 CDR-L3  | WQGTHFPRT   |
| 540 | avb6 VH      | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFSGYFMNW<br>VRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY<br>NQKFKGRVTMTRQTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCV<br>RGLRRDFDYWGQGLVTVSS |
| 541 | avb6 VL      | DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLN<br>WLFQRPQGQSPRRLIYLVSELD<br>SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTH<br>FPRTFGGGTKLEIK    |
| 542 | CD48 CDR-H1  | DFGMN   |
| 543 | CD48 CDR-H2  | WINTFTGEPYGNVFKG  |
| 544 | CD48 CDR-H3  | RHGNGNVFDS  |
| 545 | CD48 CDR-L1  | RASQSIGSNIH   |
| 546 | CD48 CDR-L2  | YTSEIS  |
| 547 | CD48 CDR-L3  | QQSNSWPLT   |
| 548 | CD48 VH      | QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDFGMNW<br>VRQAPGQGLEWMGWINTFTGEPYGNVFKGRFVFLD<br>TSVSTAYLQISSLKAEDVAVYYCARRHGNGNVFDSWG<br>QGLVTVSS |
| 549 | CD48 VL      | EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSNIHWYQQK<br>PDQSPKLLIKYTSEISGVPSPRFSGSGSGTDFTLTINSLEA<br>EDAATYYCQQSNSWPLTFGGGTKVEIKR            |
| 550 | PD-L1 CDR-H1 | TAAIS   |

|     |                         |   |
|-----|-------------------------|---|
| 551 | PD-L1 CDR-H2            | GIPIFGKAHYAQKFQG  |
| 552 | PD-L1 CDR-H3            | KFHFVSGSPFGMDV  |
| 553 | PD-L1 CDR-L1            | RASQSVSSYLA   |
| 554 | PD-L1 CDR-L2            | DASNRAT   |
| 555 | PD-L1 CDR-L3            | QQRSNWPT  |
| 556 | PD-L1 VH                | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSKDTFSTAAISWVR<br>QAPGQGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFQGRVTITADEST<br>STAYMELSSLRSEDNAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVW<br>GQGTITVTVSS         |
| 557 | PD-L1 VL                | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIYDASNRATGIPA<br>RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQ<br>GTKVEIK                          |
| 558 | IGF-1R CDR-H1           | SYAIS   |
| 559 | IGF-1R CDR-H2           | GIPIFGTANYAQKFQG  |
| 560 | IGF-1R CDR-H3           | APLRFLEWSTQDHYYYYYMDV   |
| 561 | IGF-1R CDR-L1           | QGDSLRSYYAT   |
| 562 | IGF-1R CDR-L2           | GENKRPS   |
| 563 | IGF-1R CDR-L3           | KSRDGSGQHLV   |
| 564 | IGF-1R VH               | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGGTFSSYAISWVR<br>QAPGQGLEWMGGIPIFGTANY<br>AQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAR<br>APLRFLEWSTQDHYYYYYMDVWVGKGTITVTVSS |
| 565 | IGF-1R VL               | SSELTQDPAVSVLALGQTVRITCQGDSLRSYYATWYQQ<br>KPGQAPILVIYGENKRPSGIPDR<br>FSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDGSGQHLV<br>FGGGTKLTVL                       |
| 566 | CDR-H1<br>клаудина-18.2 | SYWIN   |
| 567 | CDR-H2<br>клаудина-18.2 | NIYPSDSYTNYNQKFKD   |
| 568 | CDR-H3<br>клаудина-18.2 | SWRGNSFDY   |
| 569 | CDR-L1<br>клаудина-18.2 | KSSQSLLNSGNQKNYLT   |
| 570 | CDR-L2<br>клаудина-18.2 | WASTRES   |
| 571 | CDR-L3<br>клаудина-18.2 | QNDYSYPFT   |
| 572 | VH клаудина-<br>18.2    | QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWV<br>KQRPGQGLEWIGNIYPSDSYTN   |

|     |                         |   |
|-----|-------------------------|---|
|     |                         | YNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYC<br>TRSWRGNSTFDYWGQGTTLTVSS  |
| 573 | VL клаудина-18.2        | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNY<br>LTWYQQKPGQPPLLIYWASTR<br>ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDY<br>SYPFTFGSGTKLEIK          |
| 574 | CDR-H1<br>клаудина-18.2 | NYGMN   |
| 575 | CDR-H2<br>клаудина-18.2 | WINTNTGEPTYAEEFKG   |
| 576 | CDR-H3<br>клаудина-18.2 | LGFGNAMDY   |
| 577 | CDR-L1<br>клаудина-18.2 | KSSQSLNLSGNQKNYLT   |
| 578 | CDR-L2<br>клаудина-18.2 | WASTRES   |
| 579 | CDR-L3<br>клаудина-18.2 | QNDYSYPLT   |
| 580 | VH клаудина-18.2        | QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWV<br>KQAPGKGLKWMGWINTNTGEPTY<br>AEEFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLSKLNEDTATYFCARL<br>GFGNAMDYWGQGTSTVTVSS |
| 581 | VL клаудина-18.2        | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNY<br>LTWYQQKPGQPPLLIYWASTR<br>ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDY<br>SYPLTFGAGTKLELK          |
| 582 | CDR-H1<br>нектина-4     | SYNMN   |
| 583 | CDR-H2<br>нектина-4     | YISSSSSTIYYADSVKG   |
| 584 | CDR-H3<br>нектина-4     | AYYYGMDV  |
| 585 | CDR-L1<br>нектина-4     | RASQGISGWL A  |
| 586 | CDR-L2<br>нектина-4     | AASTLQS   |
| 587 | CDR-L3<br>нектина-4     | QQANSFPPT   |
| 588 | VH нектина-4            | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWV<br>RQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYY<br>ADSVKGRFTISRDNANKNSLSLQMNSLRDEDTA VYYCA<br>RAYYYGMDVWGQGTSTVTVSS  |
| 589 | VL нектина-4            | DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISGWLAWYQQ<br>KPGKAPKFLIYAASSTLQSGVPS  |

|     |                      |  |
|-----|----------------------|--|
|     |                      | RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFG<br>GGTKVEIK  |
| 590 | SLTRK6 CDR-<br>H1    | SYGMH  |
| 591 | SLTRK6 CDR-<br>H2    | VIWYDGSNQYYADSVKG  |
| 592 | SLTRK6 CDR-<br>H3    | GLTSGRYGMDV  |
| 593 | SLTRK6 CDR-<br>L1    | RSSQSLLLLSHGFNYLD  |
| 594 | SLTRK6 CDR-<br>L2    | LGSSRAS  |
| 595 | SLTRK6 CDR-<br>L3    | MQPLQIPWT  |
| 596 | SLTRK6 VH            | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV<br>RQAPGKGLEWVAVIWYDGSNQYY<br>ADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMHLRAEDTAVYYCA<br>RGLTSGRYGMDVWGQGTTVTVSS   |
| 597 | SLTRK6 VL            | DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLLLSHGFNYLD<br>WYLQKPGQSPQLLIYLGSSRASGVPDRFSGSGSGTDFTL<br>KISRVEAEDVGLYYCMQPLQIPWTFGQGTKVEIK            |
| 598 | CD228 CDR-H1         | SGYWN  |
| 599 | CD228 CDR-H2         | YISDSGITYYNPSLKS   |
| 600 | CD228 CDR-H3         | RTLATYYAMDY  |
| 601 | CD228 CDR-L1         | RASQSLVHSDGNTYLH   |
| 602 | CD228 CDR-L2         | RVSNRFS  |
| 603 | CD228 CDR-L3         | SQSTHVPPT  |
| 604 | CD228 VH             | QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSITSGYWNWIR<br>QPPGKGLEIYIGYISDSGITYYN<br>PSLKSRTISRDTSKNQYSLKLSVTAADTAVYYCARR<br>TLATYYAMDYWGQGTTLVTVSS |
| 605 | CD228 VL             | DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASQSLVHSDGNTYLH<br>WYQQRPGQSPRLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL<br>LKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIKR           |
| 606 | CD142 (TF)<br>CDR-H1 | NYAMS  |
| 607 | CD142 (TF)<br>CDR-H2 | SISGSGDYTYTDSVKG   |
| 608 | CD142 (TF)<br>CDR-H3 | SPWGYYLDS  |
| 609 | CD142 (TF)<br>CDR-L1 | RASQGISSRLA  |

|     |                        |   |
|-----|------------------------|---|
| 610 | CD142 (TF)<br>CDR-L2   | AASSLQS   |
| 611 | CD142 (TF)<br>CDR-L3   | QQYNSYPYT   |
| 612 | CD142 (TF) VH          | EVQLLESGLGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV<br>RQAPGKGLEWVSSISGSGDYTY<br>YTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<br>ARSPWGYLDSWGQGLVTVSS      |
| 613 | CD142 (TF) VL          | DIQMTQSPPSLSASAGDRVTITCRASQGISSLAWYQQK<br>PEKAPKSLIYAASSLQSGVPS<br>RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFG<br>QGKLEIK                 |
| 614 | ST <sub>n</sub> CDR-H1 | DHAIH   |
| 615 | ST <sub>n</sub> CDR-H2 | YFSPGNDDIKYNEKFRG   |
| 616 | ST <sub>n</sub> CDR-H3 | SLSTPY  |
| 617 | ST <sub>n</sub> CDR-L1 | KSSQSLLNRGNHKNYLT   |
| 618 | ST <sub>n</sub> CDR-L2 | WASTRES   |
| 619 | ST <sub>n</sub> CDR-L3 | QNDYTYPYT   |
| 620 | ST <sub>n</sub> VH     | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDHAIHWV<br>RQAPGQGLEWMGYFSPGNDDIKY<br>NEKFRGRVTMTADKSSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCK<br>RSLSTPYWGQGLVTVSS         |
| 621 | ST <sub>n</sub> VL     | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGNHKNY<br>LTWYQQKPGQPPKLLIYWAST<br>RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQND<br>YTYPYTFGQGTKVEIK         |
| 622 | CD20 CDR-H1            | SYNMH   |
| 623 | CD20 CDR-H2            | AIYPGNGDTSYNQKFKG   |
| 624 | CD20 CDR-H3            | STYYGGDWYFNV  |
| 625 | CD20 CDR-L1            | RASSSVSYIH  |
| 626 | CD20 CDR-L2            | ATSNLAS   |
| 627 | CD20 CDR-L3            | QQWTSNPPT   |
| 628 | CD20 VH                | QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHW<br>VKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSY<br>NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA<br>RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA |
| 629 | CD20 VL                | QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQK<br>GSSPKPWIYATSNLASGVPVR<br>FSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFG<br>GGKLEIK                  |
| 630 | HER2 CDR-H1            | DTYIH   |
| 631 | HER2 CDR-H2            | RIYPTNGYTRYADSVKG   |

|     |               |  |
|-----|---------------|--|
| 632 | HER2 CDR-H3   | WGGDGFYAMDY  |
| 633 | HER2 CDR-L1   | RASQDVNTAVA  |
| 634 | HER2 CDR-L2   | SASFLYS  |
| 635 | HER2 CDR-L3   | QQHYTTPPT  |
| 636 | HER2 VH       | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR<br>QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY<br>ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS<br>RWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS |
| 637 | HER2 VL       | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQ<br>QKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS<br>RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFG<br>QGTVKVEIK              |
| 638 | CD79b CDR-H1  | SYWIE  |
| 639 | CD79b CDR-H2  | EILPGGGDTNYNEIFKG  |
| 640 | CD79b CDR-H3  | RVPIRLDY   |
| 641 | CD79b CDR-L1  | KASQSVDYEGDSFLN  |
| 642 | CD79b CDR-L2  | AASNLES  |
| 643 | CD79b CDR-L3  | QQSNEDPLT  |
| 644 | CD79b VH      | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVR<br>QAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSK<br>NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLV<br>TVSS     |
| 645 | CD79b VL      | DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDYEGDSFLNW<br>YQQKPGKAPKLLIYAASNLES<br>GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDP<br>LTFGQGTKVEIK           |
| 646 | NaPi2B CDR-H1 | DFAMS  |
| 647 | NaPi2B CDR-H2 | TIGRVAFHTYYPDSMKG  |
| 648 | NaPi2B CDR-H3 | HRGFDVGHFDF  |
| 649 | NaPi2B CDR-L1 | RSSETLVHSSGNTYLE   |
| 650 | NaPi2B CDR-L2 | RVSNRFS  |
| 651 | NaPi2B CDR-L3 | FQGSFNPLT  |
| 652 | NaPi2B VH     | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSDFAMSWV<br>RQAPGKGLEWVATIGRVAFHTYY<br>PDSMKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA<br>RHRGFDVGHFDFWGQGLTVTVSS   |
| 653 | NaPi2B VL     | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSETLVHSSGNTYLE<br>WYQQKPGKAPKLLIYVSNRF<br>SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSFNP<br>LTFGQGTKVEIK           |
| 654 | Muc16 CDR-H1  | NDYAWN   |

|     |               |   |
|-----|---------------|---|
| 655 | Muc16 CDR-H2  | YISYSGYTTYNPSLKS  |
| 656 | Muc16 CDR-H3  | WTSGLDY   |
| 657 | Muc16 CDR-L1  | KASDLIHNWLA   |
| 658 | Muc16 CDR-L2  | GATSLET   |
| 659 | Muc16 CDR-L3  | QQYWTTTPFT  |
| 660 | Muc16 VH      | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYISITNDYAWN<br>VRQAPGKGLEWVGYISYSGYTTY<br>NPSLKS RFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<br>WTSGLDYWGQGTLLTVSS       |
| 661 | Muc16 VL      | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASDLIHNWLAWYQQ<br>KPGKAPKLLIYGATSLETGVPSRFSGSGSGTDFLTISL<br>QPEDFATYYCQQYWTTTPFTFGQGKVEIK                       |
| 662 | STEAP1 CDR-H1 | SDYAWN  |
| 663 | STEAP1 CDR-H2 | YISNSGSTSYNPSLKS  |
| 664 | STEAP1 CDR-H3 | ERNYDYDDYYAMDY  |
| 665 | STEAP1 CDR-L1 | KSSQSLLYRSNQKNYLA   |
| 666 | STEAP1 CDR-L2 | WASTRES   |
| 667 | STEAP1 CDR-L3 | QQYYNYPRT   |
| 668 | STEAP1 VH     | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSDYAWN<br>VRQAPGKGLEWVGYISNSGSTSYNPSLKS RFTISRDTSK<br>NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERNYDYDDYYAM<br>DYWGQGTLLTVSS |
| 669 | STEAP1 VL     | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYRSNQKNYL<br>AWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDF<br>TLTISLQPEDFATYYCQQYYNYPRTFGQGKVEIK                 |
| 670 | BCMA CDR-H1   | NYWMH   |
| 671 | BCMA CDR-H2   | ATYRGHSDTYYNQKFKG   |
| 672 | BCMA CDR-H3   | GAIYDGYDVLN   |
| 673 | BCMA CDR-L1   | SASQDISNYLN   |
| 674 | BCMA CDR-L2   | YTSNLHS   |
| 675 | BCMA CDR-L3   | QQYRKLPWT   |
| 676 | BCMA VH       | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYWMHW<br>VRQAPGQGLEWMGATYRGHSDTYYNQKFKGRVTITA<br>DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGAIYDGYDVLN<br>NWGQGTLLTVSS   |
| 677 | BCMA VL       | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQ<br>KPGKAPKLLIYYTSNLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISL<br>QPEDFATYYCQQYRKLPWTFGQGKLEIK                        |

|     |               |   |
|-----|---------------|---|
| 678 | c-Met CDR-H1  | AYTMH   |
| 679 | c-Met CDR-H2  | WIKPNNGLANYAQKFQG   |
| 680 | c-Met CDR-H3  | SEITTEFDY   |
| 681 | c-Met CDR-L1  | KSESVDSYANSFLH  |
| 682 | c-Met CDR-L2  | RASTRES   |
| 683 | c-Met CDR-L3  | QQSKEDPLT   |
| 684 | c-Met VH      | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTAYTMHW<br>VRQAPGQGLEWMGWIKPNNGLAN<br>YAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC<br>ARSEITTEFDYWGQGTLVTVSS |
| 685 | c-Met VL      | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVDYANSFLH<br>WYQQKPGQPPKLLIYRASTRE<br>SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKE<br>DPLTFGGGTKVEIK        |
| 686 | EGFR CDR-H1   | SDFAWN  |
| 687 | EGFR CDR-H2   | YISYSGNTRYQPSLKS  |
| 688 | EGFR CDR-H3   | AGRGPY  |
| 689 | EGFR CDR-L1   | HSSQDINSNIG   |
| 690 | EGFR CDR-L2   | HGTNLDD   |
| 691 | EGFR CDR-L3   | VQYAQFPWT   |
| 692 | EGFR VH       | QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYISSDFAWNWI<br>RQPPGKGLEWMGYISYSGNTRY<br>QPSLKSRTISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTA<br>GRGFPYWGQGTLVTVSS     |
| 693 | EGFR VL       | DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQKK<br>PGKSFKGLIYHGTNLDDGVPS<br>RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTF<br>GGGKLEIK            |
| 694 | SLAMF7 CDR-H1 | DYYMA   |
| 695 | SLAMF7 CDR-H2 | SINYDGSSTYYVDSVKG   |
| 696 | SLAMF7 CDR-H3 | DRGYYFDY  |
| 697 | SLAMF7 CDR-L1 | RSSQSLVHSNGNTYLH  |
| 698 | SLAMF7 CDR-L2 | KVSNRFS   |
| 699 | SLAMF7 CDR-L3 | SQSTHVPPFT  |
| 700 | SLAMF7 VH     | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWV<br>RQAPGKGLEWVASINYDGSSTY   |

|     |                |   |
|-----|----------------|---|
|     |                | YVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC<br>ARDRGYFYFDYWGQGTTVTVSS  |
| 701 | SLAMF7 VL      | DVVMTQTPLSLVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLH<br>WYLQKPGQSPQLLIYKVSNR<br>SGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSTHV<br>PPFTFGGGTKVEIK            |
| 702 | SLITRK6 CDR-H1 | SYGMH   |
| 703 | SLITRK6 CDR-H2 | VIWYDGSNQYYADSVKG   |
| 704 | SLITRK6 CDR-H3 | GLTSGRYGMDV   |
| 705 | SLITRK6 CDR-L1 | RSSQSLLLSHGFNYLD  |
| 706 | SLITRK6 CDR-L2 | LGSSRAS   |
| 707 | SLITRK6 CDR-L3 | MQPLQIPWT   |
| 708 | SLITRK6 VH     | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV<br>RQAPGKGLEWVAVIWIWYDGSNQYY<br>ADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCA<br>RGLTSGRYGMDVWGQGTTVTVSS |
| 709 | SLITRK6 VL     | DIVMTQSPLSLPVTGPASISCRSSQSLLLSHGFNYLD<br>WYLQKPGQSPQLLIYLGSSRA<br>SGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQPLQI<br>PWTFGGGKTKVEIK            |
| 710 | C4.4a CDR-H1   | NAWMS   |
| 711 | C4.4a CDR-H2   | YISSSGSTIYYADSVKG   |
| 712 | C4.4a CDR-H3   | EGLWAFDY  |
| 713 | C4.4a CDR-L1   | TGSSSNIGAGYVVH  |
| 714 | C4.4a CDR-L2   | DNNKRPS   |
| 715 | C4.4a CDR-L3   | AAWDDRLNGPV   |
| 716 | C4.4a VH       | EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWV<br>RQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYY<br>ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA<br>REGLWAFDYWGQGLVTVSS     |
| 717 | C4.4a VL       | ESVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVVHWY<br>QQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGV<br>PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDRLN<br>GPVFGGGTKLTVL           |
| 718 | GCC CDR-H1     | GYYS  |
| 719 | GCC CDR-H2     | EINHRGNTNDNPSLKS  |
| 720 | GCC CDR-H3     | ERGYTYGNFDH   |

|     |              |   |
|-----|--------------|---|
| 721 | GCC CDR-L1   | RASQSVSRNLA   |
| 722 | GCC CDR-L2   | GASTRAT   |
| 723 | GCC CDR-L3   | QQYKTWPRT   |
| 724 | GCC VH       | QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWSWI<br>RQPPGKGLEWIGEINHRGNTNDN<br>PSLKSRTVISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARE<br>RGYTYGNFDHWGQGTLVTVSS   |
| 725 | GCC VL       | EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQ<br>KPGQAPRLLIYGASTRATGIP<br>ARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYYCQQYKTWPRT<br>FGQGTNVEIK               |
| 726 | Axl CDR-H1   | SYAMN   |
| 727 | Axl CDR-H2   | TTSGSGASTYYADSVKG   |
| 728 | Axl CDR-H3   | IWIAFDI   |
| 729 | Axl CDR-L1   | RASQSVSSSYLA  |
| 730 | Axl CDR-L2   | GASSRAT   |
| 731 | Axl CDR-L3   | QQYGSSPYT   |
| 732 | Axl VH       | EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV<br>RQAPGKGLEWVSTTSGSGASTYY<br>ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA<br>KIWIAFDI WGQGTMTVTVSS  |
| 733 | Axl VL       | EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ<br>KPGQAPRLLIYGASSRATGIP<br>DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPYTF<br>GQGTKLEIK                |
| 734 | gpNMB CDR-H1 | SFNYYWS   |
| 735 | gpNMB CDR-H2 | YIYYSGSTYSNPSLKS  |
| 736 | gpNMB CDR-H3 | GYNWNYFDY   |
| 737 | gpNMB CDR-L1 | RASQSV DNNLV  |
| 738 | gpNMB CDR-L2 | GASTRAT   |
| 739 | gpNMB CDR-L3 | QQYNNWPPWT  |
| 740 | gpNMB VH     | QVQLQESG PGLVKPSQTL SLTCTVSGGSISSFNYYWSWI<br>RHHPGKGLEWIGYIYYSGSTY<br>SNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLTLSSVTAADTAVYYCAR<br>GYNWNYFDYWGQGTLVTVSS |
| 741 | gpNMB VL     | EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSV DNNLVWYQQ<br>KPGQAPRLLIYGASTRATGIPA<br>RFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPPWT<br>FGQGTKVEIK              |

|     |                                   |  |
|-----|-----------------------------------|--|
| 742 | CDR-H1<br>рецептора<br>пролактина | TYWMH  |
| 743 | CDR-H2<br>рецептора<br>пролактина | EIDPSDSYSNYNQKFKD  |
| 744 | CDR-H3<br>рецептора<br>пролактина | NGGLGPAWFSY  |
| 745 | CDR-L1<br>рецептора<br>пролактина | KASQYVGTAVA  |
| 746 | CDR-L2<br>рецептора<br>пролактина | SASNRYT  |
| 747 | CDR-L3<br>рецептора<br>пролактина | QQYSSYPWT  |
| 748 | VH рецептора<br>пролактина        | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYWMHW<br>VRQAPGQGLEWIGEIDPSDSYSNY<br>NQKFKDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCA<br>RNGGLGPAWFSYWGQGLTVTVSS       |
| 749 | VL рецептора<br>пролактина        | DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASQYVGTAVAWYQ<br>QKPGKSPKLLIYSASNRYTGVPS<br>RFSDSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYSSYPWTFG<br>GGTKVEIK                     |
| 750 | FGFR2 CDR-H1                      | SYAMS  |
| 751 | FGFR2 CDR-H2                      | AISGSGTSTYYADSVKG  |
| 752 | FGFR2 CDR-H3                      | VRYNWNHGDWFDP  |
| 753 | FGFR2 CDR-L1                      | SGSSSNIGNNYVS  |
| 754 | FGFR2 CDR-L2                      | ENYNRPA  |
| 755 | FGFR2 CDR-L3                      | SSWDDSLNYWV  |
| 756 | FGFR2 VH                          | EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSAISGSGTSTYYADSVKGRFTISRDN SK<br>NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVRYNWNHGDWFDP<br>WGQGLTVTVSS |
| 757 | FGFR2 VL                          | QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQ<br>LPGTAPKLLIYENYNRPAGVP<br>DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSWDDSLNY<br>WVFGGGTKLTVL                 |
| 758 | CDCP1 CDR-H1                      | SYGMS  |
| 759 | CDCP1 CDR-H2                      | TISSGGSYKYYVDSVKG  |
| 760 | CDCP1 CDR-H3                      | HPDYDGVWFAY  |

|     |              |  |
|-----|--------------|--|
| 761 | CDCP1 CDR-L1 | SVSSSVFYVH   |
| 762 | CDCP1 CDR-L2 | DTSKLAS  |
| 763 | CDCP1 CDR-L3 | QQWNSNPPT  |
| 764 | CDCP1 VH     | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYGMSWV<br>RQAPGKGLEWVATISSGGSYKYY<br>VDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA<br>RHPDYDGVWFAYWGQGLTVTVSS    |
| 765 | CDCP1 VL     | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSVSSSVFYVHWYQQK<br>PGKAPKLLIYDTSKCLASSGVPS<br>RFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQWNSNPPTFG<br>GGTKVEIK                   |
| 766 | CDCP1 CDR-H1 | SYGMS  |
| 767 | CDCP1 CDR-H2 | TISSGGSYTYYPDSVKG  |
| 768 | CDCP1 CDR-H3 | HPDYDGVWFAY  |
| 769 | CDCP1 CDR-L1 | SVSSSVFYVH   |
| 770 | CDCP1 CDR-L2 | DTSKLAS  |
| 771 | CDCP1 CDR-L3 | QQWNSNPPT  |
| 772 | CDCP1 VH     | EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFNSYGMSWV<br>RQTPDKRLEWVATISSGGSYTY<br>PDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCA<br>RHPDYDGVWFAYWGQGLTVTVSA     |
| 773 | CDCP1 VL     | QIVLTQSPAIMASPGEKVTMTCSVSSSVFYVHWYQQKS<br>GTSPKRWIYDTSKLAGVPA<br>SGSGSGTSYSLTISMEAEATAATYYCQQWNSNPPTFGG<br>GTKLEIK                       |
| 774 | CDCP1 CDR-H1 | SYMH   |
| 775 | CDCP1 CDR-H2 | IINPSGGSTSYAQKFQG  |
| 776 | CDCP1 CDR-H3 | DGVLRYFDWLLDY  |
| 777 | CDCP1 CDR-L1 | RASQSVGSYLA  |
| 778 | CDCP1 CDR-L2 | DASNRAT  |
| 779 | CDCP1 CDR-L3 | QQRANVFT   |
| 780 | CDCP1 VH     | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYMH<br>VRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSY<br>AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCA<br>RDGVLRYFDWLLDYMDVWGK<br>TTVTVSS |
| 781 | CDCP1 VL     | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGSYLA<br>RPGQAPRLLIYDASNRATGIPA<br>RFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRANVFTFGQ<br>GTKVEIK                        |
| 782 | CDCP1 CDR-H1 | SYMH   |

|     |              |   |
|-----|--------------|---|
| 783 | CDCP1 CDR-H2 | IINPSGGSTSYAQKFQG   |
| 784 | CDCP1 CDR-H3 | DAELRHFDHLLDYHYMDV  |
| 785 | CDCP1 CDR-L1 | RASQSVGSYLA   |
| 786 | CDCP1 CDR-L2 | DASNRAT   |
| 787 | CDCP1 CDR-L3 | QQRAQEFT  |
| 788 | CDCP1 VH     | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYMHV<br>VRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRD<br>TSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDDELHFDHLLDY<br>HYMDVWGQGTTVTVSS |
| 789 | CDCP1 VL     | EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGSYLA<br>WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQRAQEFTFGQ<br>GTKVEIK                      |
| 790 | ASCT2 VH     | QVQLVQSGSELKKPGAPVKVSCASGYTFSTFGMSWV<br>RQAPGQGLKWMGWIHTYAGVPIYGDDFKGRFVFLDT<br>SVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARRSDNYRYFFDYWG<br>QGTTVTVSS      |
| 791 | ASCT2 VL     | DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQ<br>KPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSL<br>QPEDFATYFCQQGHTLPPTFGQGTKLEIK                     |
| 792 | ASCT2 VH     | QIQLVQSGPELKKPGAPVKISCKASGYTFTTFGMSWVK<br>QAPGQGLKWMGWIHTYAGVPIYGDDFKGRFVFLDTS<br>VSTAYLQISSVKAEDTAVYFCARRSDNYRYFFDYWGQ<br>GTTLTVSS     |
| 793 | ASCT2 VL     | DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQ<br>KPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSL<br>QPEDFATYFCQQGHTLPPTFGQGTKLEIK                     |
| 794 | ASCT2 CDR-H1 | NYYMA   |
| 795 | ASCT2 CDR-H2 | SITKGGGNTYYRDSVKG   |
| 796 | ASCT2 CDR-H3 | QVTIAAVSTSYFDS  |
| 797 | ASCT2 CDR-L1 | KTNQKVDYYGNSYVY   |
| 798 | ASCT2 CDR-L2 | LASNLA  |
| 799 | ASCT2 CDR-L3 | QQSRNLPYT   |
| 800 | ASCT2 VH     | EVQLVESGGGLVQSGRSIRLSCAASGFSFSNYYMAWV<br>RQAPSKGLEWVASITKGGGNTYYRDSVKGRTFTRDN<br>AKSTLYLQMDLRSSEDTAVYYCARQVTIAAVSTSYFDS<br>WGQGMVTVSS   |
| 801 | ASCT2 VL     | DIVLTQSPALAVSLGQRATISCKTNQKVDYYGNSYVY<br>WYQQKPGQPKLLIYLAASNLAAGIPARFSGRSGTDFTL<br>LTIDPVEADDTAVYYCQQSRNLPYTFGAGTKLEIK                  |
| 802 | CD123 CDR-H1 | DYYMK   |

|     |              |   |
|-----|--------------|---|
| 803 | CD123 CDR-H2 | DIIPSNQATFYNQKFKG   |
| 804 | CD123 CDR-H3 | SHLLRASWFAY   |
| 805 | CD123 CDR-L1 | KSSQSLLNSGNQKNYLT   |
| 806 | CD123 CDR-L2 | WASTRES   |
| 807 | CD123 CDR-L3 | QNDYSYPYT   |
| 808 | CD123 VH     | QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTDYMKW<br>VKQAPGQGLEWIGDIIPSNQATFYNQKFKGKATLTVDR<br>SISTAYMHLNRLRSDDTAVYYCTRSHLLRASWFAYWG<br>QGTLVTVSS |
| 809 | CD123 VL     | DFVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNY<br>LTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD<br>FTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK           |
| 810 | GPC3 CDR-H1  | DYEMH   |
| 811 | GPC3 CDR-H2  | WIGGIDPETGGTAYNQKFKG  |
| 812 | GPC3 CDR-H3  | YYSFAY  |
| 813 | GPC3 CDR-L1  | RSSQSIVHSNGNTYLQ  |
| 814 | GPC3 CDR-L2  | KVSNRFS   |
| 815 | GPC3 CDR-L3  | FQVSHVPYT   |
| 816 | GPC3 VH      | EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYEMHWV<br>QQAPGKGLEWMGGIDPETGGTAYNQKFKGRVTLTAD<br>KSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCGRYYSFAYWGQGL<br>VTVSS      |
| 817 | GPC3 VL      | DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNANTYLQ<br>WFQQRPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL<br>KISRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGQGTKLEIK            |
| 818 | B6A CDR-H1   | DYNVN   |
| 819 | B6A CDR-H2   | VINPKYGTTTRYNQKFKG  |
| 820 | B6A CDR-H3   | GLNAWDY   |
| 821 | B6A CDR-L1   | GASENIYGALN   |
| 822 | B6A CDR-L2   | GATNLED   |
| 823 | B6A CDR-L3   | QNVLTTPYT   |
| 824 | B6A VH       | QFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYDYNVNW<br>VRQAPGQGLEWIGVINPKYGTTTRYNQKFKGRATLTVDR<br>KSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRGLNAWDYWGQG<br>TLVTVSS |
| 825 | B6A VL       | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCGASENIYGALNHWYQQ<br>KPGKAPKLLIYGATNLEDGVPDRFSGSGSGRDRYTFDISS<br>LQPEDATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIK                 |
| 826 | B6A CDR-H1   | GYFMN   |
| 827 | B6A CDR-H2   | LINPYNGDSFYNQKFKG   |

|     |              |   |
|-----|--------------|---|
| 828 | B6A CDR-H3   | GLRRDFDY  |
| 829 | B6A CDR-L1   | KSSQSLLDSDGKTYLN  |
| 830 | B6A CDR-L2   | LVSELD  |
| 831 | B6A CDR-L3   | WQGTHFPRT   |
| 832 | B6A VH       | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFSGYFMNW<br>VRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFYNQKFKGRVTMTR<br>QTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCVRGLRRDFDYWGQ<br>GTLVTVSS          |
| 833 | B6A VL       | DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLN<br>WLFQRPQGSPRRLIYLVELDSGVPDRFSGSGSGTDFTL<br>KISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIK                   |
| 834 | PD-L1 CDR-H1 | TAAIS   |
| 835 | PD-L1 CDR-H2 | GIPIFGKAHYAQKFQG  |
| 836 | PD-L1 CDR-H3 | KFHFVSGSPFGMDV  |
| 837 | PD-L1 CDR-L1 | RASQSVSSYLA   |
| 838 | PD-L1 CDR-L2 | DASNRA  |
| 839 | PD-L1 CDR-L3 | QQRSNWPT  |
| 840 | PD-L1 VH     | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSGDTFSTAAISWVR<br>QAPGQGLEWMGGIPIFGKAHYAQKFQGRVTITADEST<br>STAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVSGSPFGMDVW<br>GQGTTVTVSS    |
| 841 | PD-L1 VL     | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTISLE<br>PEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIK                        |
| 842 | TIGIT CDR-H1 | GTFSSY AIS  |
| 843 | TIGIT CDR-H2 | SIPIFGTANYAQKFQG  |
| 844 | TIGIT CDR-H3 | ARGPSEVGAILGYVWFDP  |
| 845 | TIGIT CDR-L1 | RSSQSLLHSNGYNYLD  |
| 846 | TIGIT CDR-L2 | LGSNRA  |
| 847 | TIGIT CDR-L3 | MQARRIPIT   |
| 848 | TIGIT VH     | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSY AISWV<br>RQAPGQGLEWMGSIPIFGTANYAQKFQGRVTITADEST<br>STAYMELSSLRSEDTAVYYCARGPSEVGAILGYVWFDP<br>WGQGTTLVTVSS |
| 849 | TIGIT VL     | DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLD<br>WYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTL<br>LKISRVEAEDVGVYYCMQARRIPITFGGGTKVEIK                |
| 850 | STN CDR-H1   | GYTFTDHAIHWV  |
| 851 | STN CDR-H2   | FSPGNDDIKY  |
| 852 | STN CDR-H3   | KRSLSTPY  |

|     |             |   |
|-----|-------------|---|
| 853 | STN CDR-L1  | QSLNLRGNHKNY  |
| 854 | STN CDR-L2  | WASTRES   |
| 855 | STN CDR-L3  | QNDYTYPYT   |
| 856 | STN VH      | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDHAIHWV<br>RQAPGQGLEWMGYFSPGNDDIKYNEKFRGRVTMTAD<br>KSSSTAYMELRSLRSDDTAVYFCKRSLSTPYWGQGLV<br>TVSS         |
| 857 | STN VL      | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLRGNHKNY<br>LTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD<br>FTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPYTFGQGTKVEIK             |
| 858 | CD33 CDR-H1 | NYDIN   |
| 859 | CD33 CDR-H2 | WIYPGDGSTKYNEKFKA   |
| 860 | CD33 CDR-H3 | GYEDAMDY  |
| 861 | CD33 CDR-L1 | KASQDINSYLS   |
| 862 | CD33 CDR-L2 | RANRLVD   |
| 863 | CD33 CDR-L3 | LQYDEFPLT   |
| 864 | CD33 VH     | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT<br>NYDINWVRQA PGQGLEWIGW IYPGDGSTKY<br>NEKFKAKATL TADTSTAY MELRSLRSDD<br>TAVYYCASGY EDAMDYWGQG TTVTSS |
| 865 | CD33 VL     | DIQMTQSPS SLSASVGDRVT<br>INCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTL<br>IYRANRLVDGVPVPS RFSGSGSGQDYTLT<br>ISSLPEDFATYYCLQYDEFPLTFGGGTKVE              |
| 866 | NTBA CDR-H1 | NYGMN   |
| 867 | NTBA CDR-H2 | WINTYSGEPRYADDFKG   |
| 868 | NTBA CDR-H3 | DYGRWYFDV   |
| 869 | NTBA CDR-L1 | RASSSVSHMH  |
| 870 | NTBA CDR-L2 | ATSNLAS   |
| 871 | NTBA CDR-L3 | QQWSSTPRT   |
| 872 | NTBA VH     | QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWW<br>RQAPGQDLKWMGWINTYSGEPRYADDFKGRVFSLD<br>KSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDYGRWYFDVWG<br>QGTTVTSS       |
| 873 | NTBA VL     | QIVLSQSPATLSLSPGERATMSCRASSSVSHMHWYQQK<br>PGQAPRPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSL<br>EPEDFAVYYCQQWSSTPRTFGGGGTKVEIK                   |
| 874 | BCMA CDR-H1 | DYYIH   |
| 875 | BCMA CDR-H2 | YINPNSGYTNYAQKFQG   |
| 876 | BCMA CDR-H3 | YMWERTGFFDF   |

|     |             |  |
|-----|-------------|--|
| 877 | BCMA CDR-L1 | LASEDISDDLA  |
| 878 | BCMA CDR-L2 | TTSSLQS  |
| 879 | BCMA CDR-L3 | QQTYKFPPT  |
| 880 | BCMA VH     | QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTDYYIHWV<br>RQAPGQGLEWIGYINPNSGYTNYAQKFQGRATMTADK<br>SINTAYVELSRLRSDDTAVYFCTRYMWERTGFFDFW<br>GQGMVTVSS  |
| 881 | BCMA VL     | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCLASEDISDDLAWYQQ<br>KPGKAPKVLVYTTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL<br>QPEDFATYFCQQTYKFPPTFGGGTKVEIK  |
| 882 | TF CDR-H1   | GFTFSNYA   |
| 883 | TF CDR-H2   | ISGSGDYT   |
| 884 | TF CDR-H3   | ARSPWGYLDS   |
| 885 | TF CDR-L1   | QGISSR   |
| 886 | TF CDR-L2   | AAS  |
| 887 | TF CDR-L3   | QQYNSYPYT  |
| 888 | TF VH       | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV<br>RQAPGKGLEWVSSISGSGDYTYTDSVKGRFTISRDN<br>KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPWGYLDSWGQG<br>TLVTVSS  |
| 889 | TF VL       | DIQMTQSPPSLSASAGDRVTITCRASQGISSRLAWYQQK<br>PEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ<br>PEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK  |
| 890 | CD40 IgH    | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYYIHWV<br>RQAPGKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDN<br>SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLV<br>TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS<br>SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP<br>CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS<br>HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG<br>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV<br>EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR<br>WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 891 | CD40 IgL    | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLH<br>WYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDF<br>LTISLQPEDFATYFCSTTHVPWTFGQGTKVEIKRTVA<br>APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK<br>VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYE<br>KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC   |
| 892 | PD-1 IgH    | QVQLVESGGGVVQPGRSRLDCKASGITFSNSGMHWV<br>RQAPGKGLEWVAVIWYDYGSKRYADSVKGRFTISRDN  |

|     |           |  |
|-----|-----------|--|
|     |           | SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLVT<br>VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS<br>SLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP<br>EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP<br>EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV<br>LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP<br>QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN<br>VFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK  |
| 893 | PD-1 IgL  | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK<br>PGQAPRLLIYDASNRAITGIPARFSGSGSGTDFTLTISSE<br>PEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI<br>FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL<br>QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY<br>ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  |
| 894 | PD-1 IgH  | QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYW<br>VRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDD<br>SSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDY<br>WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL<br>VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGP<br>PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV<br>DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR<br>VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA<br>KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS<br>RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK |
| 895 | PD-1 IgL  | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHW<br>YQQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLT<br>ISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAP<br>SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD<br>NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKH<br>KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  |
| 896 | PD-L1 IgH | EVQLVESGGGLVQPGLSLRSLCAASGFTFSRYWMSWV<br>RQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN<br>AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDY<br>WGQGLTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC<br>LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC<br>DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<br>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE<br>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG  |

|     |           |  |
|-----|-----------|--|
|     |           | FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 897 | PD-L1 IgL | EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQ<br>KPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL<br>EPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF<br>IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL<br>QSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVY<br>ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC   |
| 898 | PD-L1 IgH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVR<br>QAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTS<br>KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQ<br>GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD<br>YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV<br>TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH<br>TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAST<br>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TIS<br>KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT<br>KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV<br>LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN<br>HYTQKSLSLSPGK |
| 899 | PD-L1 IgL | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQ<br>KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTISL<br>QPEDFATYYCQQYLHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVF<br>IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL<br>QSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVY<br>ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  |

[412] В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-899. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-899. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-899. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-899. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-899. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, которая имеет не более 3 мутаций относительно любой из SEQ ID NO: 1-899. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, которая имеет не более 2 мутаций относительно любой из SEQ ID NO: 1-899. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, которая имеет не более 1 мутации относительно любой из SEQ ID NO: 1-899.

В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, нацелено на CD40, BCMA, CD40, TIGIT, HER2, PD-1, PD-L1 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления антитело нацелено на CD40, CD20, PD-1, PD-L1 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления антитело нацелено на BCMA, TIGIT, HER2 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе (например, компонент антитела MEF), представляет собой одобренное регулирующим органом терапевтическое антитело, например, одобренное FDA или EMA. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, выбрано из группы, состоящей из авелумаба, дурвалумаба, даратумумаба, элотузумаба, нецитумумаба, атезолизумаба, ниволумаба, динутуксимаба, бевацизумаба, пембролизумаба, рамуцирумаба, алемтузумаба, пертузумаба, обинутузумаба, ипилимумаба, деносумаба, офатумумаба, катумаксамаба, панитумумаба, бевацизумаба, цетуксимаба, тозитумумаба, алемтузумаба, трастузумаба, ритуксимаба, синтилимаба, тислелизумаба, камрелизумаба, huJ591, JS001, hu3S193, TRC093, TRC105, AGEN1181, AGEN2034, MEDI4736, NEO-102, MK-0646, ZKAB001, TB-403, GLS-010, CT-011, INCMGA00012, AGEN1884, MK-3475, GC1118, DS-8201a, CC-95251, Sym004, CS1001 и REGN2810. В некоторых вариантах осуществления антитело, раскрытое в настоящем документе, выбрано из группы, состоящей из ритуксимаба, обинутузумаба, офатумумаба, трастузумаба, алемтузумаба, могамулизумаба, цетуксимаба и динутуксимаба. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой ритуксимаб. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой обинутузумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой офатумумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой трастузумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой алемтузумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой могамулизумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой цетуксимаб. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой динутуксимаб.

#### ***Антитела MEF, нацеленные на CD40***

В некоторых вариантах осуществления антитела MEF по настоящему изобретению нацелены на кластер дифференцировки 40 (CD40). CD40 представляет собой член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF). Это одноцепочечный трансмембранный белок I типа с кажущейся молекулярной массой 50 кДа. Его зрелое полипептидное ядро состоит из 237 аминокислот, из которых 173 аминокислоты составляют внеклеточный домен (ECD), организованный в 4 богатых цистеином повторах, которые характерны для членов семейства рецепторов TNF. Два потенциальных сайта N-связанного гликозилирования присутствуют в проксимальной области мембраны ECD,

тогда как потенциальные сайты O-связанного гликозилирования отсутствуют. Трансмембранный домен из 22 аминокислот соединяет ECD с цитоплазматическим хвостом CD40 из 42 аминокислот. Мотивы последовательности, участвующие в CD40-опосредованной передаче сигнала, были идентифицированы в цитоплазматическом хвосте CD40. Эти мотивы взаимодействуют с цитоплазматическими факторами, называемыми TNF-R-ассоциированными факторами (TRAF), запуская множество последующих событий, включая активацию MAP-киназ и NF $\kappa$ B, которые, в свою очередь, модулируют транскрипционную активность различных генов, связанных с воспалением, выживанием и ростом. См., например, van Kooten and Banchereau, *J. Leukoc. Biol.* 67:2-17 (2000); Elgueta et al., *Immunol. Rev.* 229:152-172 (2009).

В системе кроветворения CD40 можно обнаружить на В-клетках на нескольких стадиях дифференцировки, моноцитах, макрофагах, тромбоцитах, фолликулярных дендритных клетках, дендритных клетках (DC), эозинофилах и активированных Т-клетках. В нормальных некроветворных тканях CD40 обнаруживался на эпителиальных клетках почек, кератиноцитах, фибробластах синовиальной оболочки и дермального происхождения, а также активированном эндотелии. Растворимая версия CD40 высвобождается из клеток, экспрессирующих CD40, возможно, посредством дифференциального сплайсинга первичного транскрипта или ограниченного протеолиза ферментом, конвертирующим металлопротеиназу TNF $\alpha$ . Выделение CD40 потенциально может модифицировать иммунные реакции, вмешиваясь во взаимодействие CD40/CD40L. См., например, van Kooten and Banchereau, *J. Leukoc. Biol.* 67:2-17 (2000); Elgueta et al., *Immunol. Rev.* 229:152-172 (2009).

Эндогенный лиганд CD40 (CD40L) представляет собой мембранный гликопротеин типа II массой 39 кДа, также известный как CD154. CD40L является членом суперсемейства TNF и экспрессируется в виде тримера на поверхности клетки. CD40L временно экспрессируется на активированных CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> и  $\gamma\delta$  Т-клетках. CD40L также обнаруживается на различных уровнях на очищенных моноцитах, активированных В-клетках, эпителиальных и сосудистых эндотелиальных клетках, гладкомышечных клетках и DC, но функциональная значимость экспрессии CD40L на этих типах клеток четко не определена (van Kooten 2000; Elgueta 2009). Однако экспрессия CD40L на активированных тромбоцитах вовлечена в патогенез тромботических заболеваний. См., например, Ferroni et al., *Curr. Med. Chem.* 14:2170-2180 (2007).

Наиболее охарактеризованной функцией взаимодействия CD40/CD40L является его роль в контактно-зависимом реципрокном взаимодействии между антигенпрезентирующими клетками и Т-клетками. См., например, van Kooten and Banchereau, *J. Leukoc. Biol.* 67:2-17 (2000); Elgueta et al., *Immunol. Rev.* 229:152-172 (2009). Связывание CD40L на активированных Т-клетках с CD40 на активированных антигеном В-клетках не только приводит к быстрой экспансии В-клеток, но также обеспечивает важный сигнал для В-клеток для дифференцировки либо в В-клетки памяти, либо в плазматические клетки. Передача сигналов CD40 отвечает за формирование зародышевых центров, в

которых В-клетки подвергаются созреванию аффинности и переключению изотипа, чтобы приобрести способность продуцировать высокоаффинные изотопы антител IgG, IgA и IgE. См., например, Kehry, J. *Immunol.* 156:2345-2348 (1996). Таким образом, люди с мутациями в локусе CD40L, которые препятствуют функциональному взаимодействию CD40/CD40L, страдают от синдрома первичного иммунодефицита X-сцепленного гипер-IgM, который характеризуется избыточным представителем циркулирующих IgM и неспособностью продуцировать IgG, IgA и IgE. У этих пациентов наблюдаются подавление вторичных гуморальных иммунных реакций, повышенная восприимчивость к рецидивирующим пиогенным инфекциям, более высокая частота карцином и лимфом. Эксперименты по нокауту генов на мышах с целью инактивации локуса CD40 или CD40L воспроизводят основные дефекты, наблюдаемые у пациентов с X-сцепленным гипер-IgM. У этих КО-мышей также наблюдается нарушение праймирования антигенспецифических Т-клеток, что позволяет предположить, что взаимодействие CD40L/CD40 также является критическим фактором для возникновения клеточно-опосредованных иммунных ответов. См., например, Elgueta et al., *Immunol. Rev.* 229:152-172 (2009).

Иммуностимулирующие эффекты лигирования CD40 с помощью CD40L или анти-CD40 *in vivo* коррелируют с иммунными ответами против сингенных опухолей. См., например, French et al., *Nat. Med.* 5:548-553 (1999). Недостаточный иммунный ответ против опухолевых клеток может быть результатом сочетания таких факторов, как экспрессия молекул иммунных контрольных точек, таких как PD1 или CTLA-4, снижение экспрессии антигенов МНС, плохая экспрессия опухолеассоциированных антигенов, соответствующая адгезия или костимулирующие молекулы, а также выработка опухолевыми клетками иммуносупрессивных белков, таких как TGF $\beta$ . Лигирование CD40 на антигенпрезентирующих и трансформированных клетках приводит к усилению регуляции белков адгезии (например, CD54), костимулирующих молекул (например, CD86) и антигенов МНС, а также секреции воспалительных цитокинов, тем самым потенциально индуцируя и/или усиливая противоопухолевый иммунный ответ, а также иммуногенность опухолевых клеток. См., например, Gajewski et al., *Nat. Immunol.* 14:1014-1022 (2013).

Основным следствием перекрестного связывания CD40 является активация DC (часто называемая лицензированием) и усиление способности миелоидных и В-клеток процессировать и представлять опухолеассоциированные антигены Т-клеткам. Помимо прямой способности активировать врожденный иммунный ответ, уникальным последствием передачи сигналов CD40 является презентация APC опухолевых антигенов предшественникам цитотоксических Т-клеток (CTL) CD8<sup>+</sup> в процессе, известном как «перекрестное праймирование». Эта CD40-зависимая активация и дифференцировка предшественников CTL зрелыми DC в опухолеспецифические эффекторные CTL могут усиливать клеточно-опосредованные иммунные ответы против опухолевых клеток. См., например, Kurts et al., *Nat. Rev. Immunol.* 10:403-414 (2010).

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к антителу MEF к CD40. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи гуманизированного



CD40 содержит первую последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична последовательности с SEQ ID NO: 890, и вторую последовательность, которая имеет по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 891.

В некоторых случаях антитело к CD40 имеет константу диссоциации ( $K_D$ ) для CD40 человека не более 500 нМ. В некоторых случаях антитело к CD40 имеет константу диссоциации ( $K_D$ ) для CD40 человека не более 100 нМ. В некоторых случаях антитело к CD40 имеет константу диссоциации ( $K_D$ ) для CD40 человека не более 50 нМ. В некоторых случаях антитело к CD40 имеет константу диссоциации ( $K_D$ ) для CD40 человека не более 10 нМ. В некоторых случаях антитело к CD40 имеет константу диссоциации ( $K_D$ ) для CD40 человека не более 5 нМ. В некоторых случаях антитело к CD40 имеет константу диссоциации ( $K_D$ ) для CD40 человека не более 1 нМ. В некоторых случаях антитело к CD40 имеет константу диссоциации ( $K_D$ ) для CD40 человека не более 500 пМ.

Во многих случаях антитело MEF к CD40 содержит одну или несколько функционализаций ВРМ. Например, каждый межцепочечный дисульфид может быть восстановлен и обратимо связан с фрагментами ПЭГ, снижающими эффекторную функцию. Кроме того, во многих случаях антитело к CD40 MEF содержит модификацию, усиливающую эффекторную функцию, такую как афукозилирование. Модулированная эффекторная функция антитела MEF к CD40 может привести к снижению токсичности, уменьшению истощения В-клеток, усилению локализации активности и улучшению периода полужизни по сравнению с антителами, у которых отсутствует модуляция эффекторной функции.

Антитела MEF к CD40 по настоящему изобретению (а также их фрагменты, химерные конструкции, слитые конструкции и мутанты) могут проявлять усиленное связывание с рецепторами FcγIII, а также повышенную способность активировать путь передачи сигнала CD40 в иммунных клетках. Во многих случаях эти антитела действуют как агонисты или частичные агонисты сигнального пути CD40. Во многих случаях эти антитела связываются с белком CD40 человека и могут активировать сигнальный путь CD40.

В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело к CD40, раскрытое в настоящем документе, полезно при лечении различных нарушений, связанных с экспрессией CD40, как описано в настоящем документе. Поскольку эти антитела могут активировать иммунную систему для ответа на антигены, связанные с опухолью, их использование не ограничивается раковыми заболеваниями, экспрессирующими CD40. Таким образом, эти антитела можно использовать для лечения как CD40-положительного, так и CD40-отрицательного рака.

#### ***Антитела, нацеленные на PD-1 и PD-L1***

В определенных вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток представляет собой ингибитор PD-1/PD-L1. Примеры ингибиторов PD-1/PD-L1 включают, но не ограничиваются ими, ингибиторы, описанные в патентах США № 7,488,802; 7,943,743; 8,008,449; 8,168,757; 8,217,149, и публикациях

заявок на патенты PCT № WO2003042402, WO2008156712, WO2010089411, WO2010036959, WO2011066342, WO2011159877, WO2011082400 и WO2011161699, все из которых включены в данный документ во всей их полноте.

В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток представляет собой ингибитор PD-1. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой антитело к PD-1. В одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой BGB-A317, ниволумаб (также известный как ONO-4538, BMS-936558 или MDX1106) или пембролизумаб (также известный как MK-3475, SCH 900475 или ламбролизумаб), или их нефукозилированную версию. В одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб или его нефукозилированную версию. Ниволумаб представляет собой человеческое моноклональное антитело IgG4 к PD-1 и продается под торговым названием Opdivo™. В другом варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой пембролизумаб или его нефукозилированную версию. Пембролизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4 и продается под торговым названием Keytruda™. В еще одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой CT-011, гуманизированное антитело или его нефукозилированную версию. CT-011, введенное отдельно, не показало ответа при лечении острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) при рецидиве. В еще одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой AMP-224, слитый белок или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой BGB-A317 или его нефукозилированную версию. BGB-A317 представляет собой моноклональное антитело, в котором специально сконструирована способность связывать Fc-гамма-рецептор I и которое обладает уникальной сигнатурой связывания с PD-1 с высокой аффинностью и превосходной специфичностью к мишени. В одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой цемиплимаб или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой камрелизумаб или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой синтилимаб или его нефукозилированную версию. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой тислелизумаб или его нефукозилированную версию. В определенных вариантах осуществления антитело к PD-1 представляет собой TSR-042 или его нефукозилированную версию. В еще одном другом варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой PDR001 или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой торипалимаб или его нефукозилированную версию.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к антителу MEF к PD-1. В некоторых случаях аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи гуманизированного антитела к PD-1 представляют собой SEQ ID NO: 892 и 893 соответственно. В некоторых случаях аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи гуманизированного антитела к PD-1 представляют собой SEQ ID NO: 894 и



последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична последовательности с SEQ ID NO: 895.

В определенных вариантах осуществления антитело, которое связывается с активатором иммунных клеток представляет собой ингибитор PD-L1. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1. В одном варианте осуществления антитело к PD-L1 представляет собой MEDI4736 (дурвалумаб) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления антитело к PD-L1 представляет собой BMS-936559 (также известный как MDX-1105-01) или его нефукозилированную версию. В еще одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой атезолизумаб (также известный как MPDL3280A и Tecentriq®) или его нефукозилированную версию. В другом варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой авелумаб или его нефукозилированную версию.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к антителу MEF к PD-L1. В некоторых случаях аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи гуманизованного антитела к PD-L1 представляют собой SEQ ID NO: 896 и 897, соответственно. В некоторых случаях аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи гуманизованного антитела к PD-L1 представляют собой SEQ ID NO: 898 и 899, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности с SEQ ID NO: 896. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности с SEQ ID NO: 896. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности с SEQ ID NO: 896. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична последовательности с SEQ ID NO: 896. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична последовательности с SEQ ID NO: 896. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности с SEQ ID NO: 897. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности с SEQ ID NO: 897. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности с SEQ ID NO: 897. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична последовательности с SEQ ID NO: 897. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична последовательности с SEQ ID NO: 897. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности с

SEQ ID NO: 898. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности с SEQ ID NO: 898. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности с SEQ ID NO: 898. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична последовательности с SEQ ID NO: 898. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична последовательности с SEQ ID NO: 898. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности с SEQ ID NO: 899. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности с SEQ ID NO: 899. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности с SEQ ID NO: 899. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична последовательности с SEQ ID NO: 899. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-L1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична последовательности с SEQ ID NO: 899.

#### ***Активность антител MEF***

В некоторых вариантах осуществления, когда раскрытое в настоящем документе антитело MEF вводят в популяцию клеток, содержащую одну или более клеток-мишеней, связывание антитела MEF с одной или более клетками-мишенями обеспечивает зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов по сравнению с уровнями периферических цитокинов, обеспечиваемыми путем связывания эквимольного количества эквивалентного антитела, не содержащего ВРМ. В некоторых вариантах осуществления уровни периферических цитокинов снижаются на определенный период времени.

Уровни периферических цитокинов у субъекта могут относиться к системным или циркулирующим уровням цитокинов. Например, у субъекта с солидной опухолью уровни центральных или локальных цитокинов наблюдаются в области, по существу, вокруг солидной опухоли, тогда как уровни периферических цитокинов можно измерить, например, в образце крови или плазмы. В некоторых вариантах осуществления периферические цитокины, описанные в настоящем документе, выбраны из группы, состоящей из EGF, эотаксина, G-CSF, GM-CSF, IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1RA, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , VEGF, FGF-2, TGF- $\alpha$ , FIT-3L, фракталкина, GRO, MCP-3, MDC, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, sCD40L, IL-9, и комбинации любого из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления уровни периферических цитокинов

снижаются на от около 1% до около 80%. Например, от около 1% до около 20%, от около 10% до около 30%, от около 20% до около 40%, от около 30% до около 50%, от около 40% до около 60%, от около 50% до около 70%, от около 60% до около 80% или любое значение между ними. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет от около 4 часов до около 24 часов после введения описанного в настоящем документе антитела MEF в популяцию клеток, и уровни периферических цитокинов снижаются на от около 1% до около 20%. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет от около 4 часов до около 48 часов после введения описанного в настоящем документе антитела MEF в популяцию клеток, и уровни периферических цитокинов снижаются на от около 1% до около 20%. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет от около 24 часов до около 48 часов после введения описанного в настоящем документе антитела MEF в популяцию клеток, и уровни периферических цитокинов снижаются на от около 1% до около 20%. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет от около 36 часов до около 72 часов после введения описанного в настоящем документе антитела MEF в популяцию клеток, и уровни периферических цитокинов снижаются на от около 1% до около 20%. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет от около 48 часов до около 96 часов после введения описанного в настоящем документе антитела MEF в популяцию клеток, и уровни периферических цитокинов снижаются на от около 1% до около 20%.

В некоторых вариантах осуществления зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется начальным снижением уровней периферических цитокинов в супернатанте биологического образца по сравнению с эквимоллярным количеством эквивалентного антитела. В некоторых вариантах осуществления зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется начальным снижением по меньшей мере на около 50%. В некоторых вариантах осуществления зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется начальным снижением по меньшей мере на около 80%.

В некоторых вариантах осуществления первоначальное снижение включает период времени с момента введения антитела MEF субъекту (например, «0 часов» после введения) и около 3 часов после введения антитела MEF субъекту. Например, от около 0 часов до около 2 часов после введения, от около 0 часов до около 1,5 часов после введения, от около 0 часов до около 1 часа после введения, от около 0 часов до около 0,5 часов после введения, около 0,5 часов до около 2 часов после введения или от около 0,5 часов до 1,5 часов после введения.

В некоторых вариантах осуществления зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется восстановлением уровней периферических цитокинов до по меньшей мере около 50% по сравнению с эквимоллярным количеством эквивалентного антитела через период от около 48 часов до около 96 часов. В некоторых вариантах осуществления зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется восстановлением уровней периферических цитокинов до около

100% по сравнению с эквимольным количеством эквивалентного антитела через период от около 48 часов до около 96 часов.

В некоторых вариантах осуществления, когда антитело MEF, как описано в настоящем документе, вводят в популяцию клеток, содержащую одну или более клеток-мишеней, связывание антитела MEF с одной или более клетками-мишенями обеспечивает зависящее от времени снижение скорости лизиса одной или более клеток-мишеней по сравнению со скоростью лизиса клеток, обеспечиваемой связыванием эквимольного количества эквивалентного антитела.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток представляет собой биологический образец. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток находится у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток находится у субъекта; и уровни периферических цитокинов представляют собой системные уровни цитокинов в плазме субъекта.

В некоторых вариантах осуществления введение субъекту антитела, как описано в настоящем документе, обеспечивает снижение  $C_{max}$  цитокина на около 20-75% по сравнению с введением эквимольного количества эквивалентного антитела. В некоторых вариантах осуществления снижение  $C_{max}$  цитокина составляет от около 20% до около 40%, от около 30% до около 50%, от около 40% до около 60%, от около 50% до около 75% или любое промежуточное значение.

В некоторых вариантах осуществления введение субъекту антитела, как описано в настоящем документе, обеспечивает по существу такую же общую  $AUC_{0-\infty}$  антитела по сравнению с введением эквимольного количества эквивалентного антитела.

В некоторых вариантах осуществления введение субъекту антитела MEF обеспечивает снижение эффекторной функции по сравнению с введением субъекту эквивалентного антитела. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция, которая снижается по сравнению с эквивалентным антителом при введении субъекту антитела MEF, представляет собой антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция, которая снижается по сравнению с эквивалентным антителом при введении субъекту антитела MEF, представляет собой антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция, которая снижается по сравнению с эквивалентным антителом при введении субъекту антитела MEF, представляет собой антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция, которая снижается по сравнению с эквивалентным антителом при введении субъекту антитела MEF, представляет собой антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP).

#### **Способы получения афукозилированных антител**

Способы получения афукозилированных антител путем инкубации клеток,

продуцирующих антитела, с аналогом фукозы описаны, например, в WO2009/135181. Вкратце, клетки, сконструированные для экспрессии антител по настоящему изобретению, инкубируют в присутствии аналога фукозы или внутриклеточного метаболита или продукта аналога фукозы. Внутриклеточный метаболит может быть, например, аналогом, модифицированным GDP, или аналогом, полностью или частично деэтерифицированным. Продукт может быть, например, полностью или частично деэтерифицированным аналогом. В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы может ингибировать фермент(ы) в пути утилизации фукозы. Например, аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность фукокиназы или GDP-фукозопирофосфорилазы. В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) ингибирует фукозилтрансферазу (предпочтительно 1,6-фукозилтрансферазу, например, белок FUT8). В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность фермента в пути синтеза фукозы *de novo*. Например, аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность GDP-маннозо-4,6-дегидратазы или/или GDP-фукозосинтетазы. В некоторых вариантах осуществления аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать переносчик фукозы (например, переносчик GDP-фукозы).

В одном варианте осуществления аналог фукозы представляет собой 2-фторфукозу. Методы использования аналогов фукозы в питательной среде и других аналогов фукозы раскрыты, например, в WO 2009/135181, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Другие методы конструирования клеточных линий для уменьшения фукозилирования сердцевины включали нокауты генов, нокины генов и РНК-интерференцию (РНКи). При нокауте гена инактивируется ген, кодирующий FUT8 (фермент альфа-1,6-фукозилтрансферазы). FUT8 катализирует перенос фукозильного остатка из GDP-фукозы в положение 6 Asn-связанного (N-связанного) GlcNac N-гликана. Сообщается, что FUT8 является единственным ферментом, ответственным за добавление фукозы к N-связанному биантеннарному углеводу в Asn297. Генные нокины добавляют гены, кодирующие ферменты, такие как GNTIII или альфа-маннозидаза Гольджи II. Повышение уровня таких ферментов в клетках отклоняет моноклональные антитела от пути фукозилирования (что приводит к снижению корового фукозилирования) и увеличивает количество расщепляющих N-ацетилглюкозаминов. РНКи обычно также нацелена на экспрессию гена FUT8, что приводит к снижению уровня транскриптов мРНК или полному отключению экспрессии гена. Любой из этих методов можно использовать для создания клеточной линии, способной продуцировать афукозилированное антитело.

Доступно множество методов для определения степени фукозилирования антитела. Методы включают, например, ЖХ-МС с помощью хроматографии PLRP-S, квадрупольную TOF-МС с ионизацией электрораспылением, капиллярный электрофорез с лазерно-

индуцированной флуоресценцией (CE-LIF) и, хроматографию гидрофильных взаимодействий с флуоресцентным детектированием (HILIC).

### Анализы

В некоторых вариантах осуществления предложены анализы для оценки антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP). В некоторых вариантах осуществления, когда антитело MEF, как описано в настоящем документе, вводят в популяцию клеток, содержащую одну или более клеток-мишеней, уровни периферических цитокинов снижаются на определенный период времени по сравнению с эквимоллярным количеством эквивалентного антитела. Уровни периферических цитокинов относятся к уровням цитокинов в местах, где нет клеток-мишеней. Например, в культуре клеток уровни периферических цитокинов могут относиться к уровням цитокинов в культуральной среде или супернатанте. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток представляет собой биологический образец; и уровни периферических цитокинов в супернатанте снижаются. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток находится у субъекта; и уровни периферических цитокинов представляют собой системные уровни цитокинов в плазме субъекта. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет от около 12 часов до около 36 часов после введения антитела MEF в популяцию клеток, и уровни периферических цитокинов снижаются на от около 1% до около 20%. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет от около 16 часов до около 24 часов после введения антитела MEF в популяцию клеток, и уровни периферических цитокинов снижаются на от около 1% до около 20%.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток представляет собой биологический образец. В некоторых вариантах осуществления одна или более клеток-мишеней включает раковые клетки, содержащие антигены, или иммунные клетки, содержащие антигены. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток дополнительно включает нормальные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления нормальные PBMC включают естественные клетки-киллеры.

В некоторых вариантах осуществления клетки-мишени дополнительно содержат радиоактивную метку (т.е. клетки мечены радиоактивным изотопом). В некоторых вариантах осуществления радиометка высвобождается в среду для культивирования клеток или супернатант при лизисе клеток.

В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор в анализе на антитела присутствует на PBMC. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой F-рецептор-гамма III. В некоторых вариантах осуществления PBMC представляет собой естественную клетку-киллер. В некоторых вариантах осуществления PBMC обогащена плазмой нормального донора. В некоторых вариантах осуществления нормальный донор представляет собой человека, имеющего генотип Fc-гамма-рецептора III 158 V/V. В некоторых вариантах осуществления снижение связывания Fc-рецептора

определяется конкурентным связыванием антитела MEF и меченого Fc-фрагмента IgG, соответствующего изотипу, с ортогонально меченым Fc-рецептором.

В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент IgG представляет собой меченый соответствующий изотипу Fc-домен человеческого антитела IgG<sub>1</sub>. В некоторых вариантах осуществления метка Fc-фрагмента IgG, соответствующего изотипу, включает флуорофор. Типичные флуорофоры включают, помимо прочего, кумарины, Alexa fluor, цианины, родамины и BODIPY. В некоторых вариантах осуществления меченый Fc-фрагмент IgG, соответствующий изотипу, иммобилизован на твердой подложке. В некоторых вариантах осуществления ортогональная метка Fc-рецептора включает биотин. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc гамма IIIa или гамма IIIb. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc гамма IIIa. В некоторых вариантах осуществления Fc-рецептор представляет собой Fc гамма IIIb.

В некоторых вариантах осуществления, когда антитело, как описано в настоящем документе, вводят в популяцию клеток, содержащую одну или более клеток-мишеней, лизис одной или более клеток-мишеней снижается на период времени по сравнению с эквимоллярным количеством эквивалентного антитела. В некоторых вариантах осуществления лизис одной или более клеток-мишеней снижается на от около 1% до около 80%. Например, от около 1% до около 20%, от около 10% до около 30%, от около 20% до около 40%, от около 30% до около 50%, от около 40% до около 60%, от около 50% до около 70%, от около 60% до около 80% или любое значение между ними. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет от около 48 часов до около 96 часов после введения антитела MEF в популяцию клеток, и лизис одной или более клеток-мишеней снижается на от около 1% до около 20%.

#### **Композиции и способы введения**

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим описанные в настоящем документе антитела MEF. В некоторых вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело MEF и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит распределение антител MEF. В некоторых вариантах осуществления единственным активным ингредиентом в композиции является антитело MEF.

Хотя терапевтические антитела часто влияют на высокие уровни системного высвобождения цитокинов при введении, многие из модулированных эффекторных антител, описанных в настоящем документе, проявляют сниженную и/или задержку активности эффекторной функции, тем самым снижая риск синдрома высвобождения цитокинов. В случаях синдрома высвобождения цитокинов, когда цитокином или маркером воспаления является моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1), макрофагальный воспалительный белок-1 (MIP-1 $\beta$ ), фактор некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), гамма-интерферон (IFN- $\gamma$ ), агонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA), интерлейкин 1 бета (IL1B), интерлейкин 6 (IL6), интерлейкин 10 (IL10) или их комбинация часто подвергаются

многократному повышению уровня в сыворотке крови, что может повлиять на системная токсичность, что позволяет этим видам служить полезными маркерами токсичности антител.

В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1), макрофагального воспалительного белка-1 (MIP-1 $\beta$ ), фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ), агониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA), интерлейкина 1 бета (IL1B), интерлейкина 6 (IL6), интерлейкина 10 (IL10) или их комбинации, в более чем 20 раз превышая уровни до введение (например, пиковый уровень, измеренный с помощью анализа ELISA в плазме, собранной у субъекта). В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1), макрофагального воспалительного белка-1 (MIP-1 $\beta$ ), фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ), агониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA), интерлейкина 1 бета (IL1B), интерлейкина 6 (IL6), интерлейкина 10 (IL10) или их комбинации, в более чем 10 раз превышая уровни до введение (например, как измерено с помощью анализа ELISA в плазме, собранной у субъекта). В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1), макрофагального воспалительного белка-1 (MIP-1 $\beta$ ), фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ), агониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA), интерлейкина 1 бета (IL1B), интерлейкина 6 (IL6), интерлейкина 10 (IL10) или их комбинации, в более чем 5 раз превышая уровни до введение (например, как измерено с помощью анализа ELISA в плазме, собранной у субъекта). В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1), макрофагального воспалительного белка-1 (MIP-1 $\beta$ ), фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ), агониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA), интерлейкина 1 бета (IL1B), интерлейкина 6 (IL6), интерлейкина 10 (IL10) или их комбинации, в более чем 3 раз превышая уровни до введение (например, как измерено с помощью анализа ELISA в плазме, собранной у субъекта). В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни MCP-1 более чем на 100 пг/мл, более чем на 400 пг/мл или более чем на 800 пг/мл. В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни TNF- $\alpha$  более чем на 15 пг/мл, более чем на 60 пг/мл или более чем на 120 пг/мл. В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни IFN- $\gamma$  более чем на 25 пг/мл, более чем на 100 пг/мл или более чем на 200 пг/мл. В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни IL1B более чем на 2 пг/мл, более чем на 8 пг/мл или более чем на 20 пг/мл. В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни IL6 более чем на 1 пг/мл, более чем на 4 пг/мл или более чем на 10 пг/мл. В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни IL6 более чем на 10 пг/мл, более чем на 40 пг/мл или более чем на 100 пг/мл.

В некоторых случаях единичная доза композиции не увеличивает системные уровни

моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) более чем в 20 раз по сравнению с уровнями до введения (например, согласно результатам анализа ELISA плазмы, собранной у субъекта). В некоторых случаях единичная доза композиции не увеличивает системные уровни моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) более чем в 10 раз по сравнению с уровнями до введения. В некоторых случаях единичная доза композиции не увеличивает системные уровни моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) более чем в 5 раз по сравнению с уровнями до введения. В некоторых случаях единичная доза композиции не увеличивает системные уровни моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) более чем в 3 раза по сравнению с уровнями до введения. В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни MCP-1 более чем на 100 пг/мл, более чем на 400 пг/мл или более чем на 800 пг/мл.

В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни хемотаксического белка-1 моноцитов (MCP-1), воспалительного белка-1 макрофагов (MIP-1 $\beta$ ), агониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA) или их комбинации, более чем в 20 раз по сравнению с уровнями перед введением. В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни хемотаксического белка-1 моноцитов (MCP-1), воспалительного белка-1 макрофагов (MIP-1 $\beta$ ), агониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA) или их комбинации, более чем в 10 раз по сравнению с уровнями перед введением. В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни хемотаксического белка-1 моноцитов (MCP-1), воспалительного белка-1 макрофагов (MIP-1 $\beta$ ), агониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA) или их комбинации, более чем в 5 раз по сравнению с уровнями перед введением. В некоторых случаях единичная доза композиции не повышает системные уровни хемотаксического белка-1 моноцитов (MCP-1), воспалительного белка-1 макрофагов (MIP-1 $\beta$ ), агониста рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA) или их комбинации, более чем в 3 раза по сравнению с уровнями перед введением.

В некоторых случаях единичная доза композиции не увеличивает системные уровни MIP-1 $\beta$  более чем в 20 раз по сравнению с уровнями до введения. В некоторых случаях единичная доза композиции не увеличивает системные уровни MIP-1 $\beta$  более чем в 10 раз по сравнению с уровнями до введения. В некоторых случаях единичная доза композиции не увеличивает системные уровни MIP-1 $\beta$  более чем в 5 раз по сравнению с уровнями до введения. В некоторых случаях единичная доза композиции не увеличивает системные уровни MIP-1 $\beta$  более чем в 3 раза по сравнению с уровнями до введения.

В некоторых случаях единичная доза композиции не увеличивает системные уровни IL-1RA более чем в 20 раз по сравнению с уровнями до введения. В некоторых случаях единичная доза композиции не увеличивает системные уровни IL-1RA более чем в 10 раз по сравнению с уровнями до введения. В некоторых случаях единичная доза композиции не увеличивает системные уровни IL-1RA более чем в 5 раз по сравнению с уровнями до введения. В некоторых случаях единичная доза композиции не увеличивает системные уровни IL-1RA более чем в 3 раза по сравнению с уровнями до введения.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит первую популяцию,

содержащую распределение антител MEF; вторую популяцию, содержащую распределение антител MEF; и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель; при этом ВРМ, присутствующие в первой популяции антител MEF, отличаются от ВРМ, присутствующих во второй популяции антител MEF. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит первую популяцию, содержащую распределение антител MEF; вторую популяцию, содержащую распределение антител MEF; и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель; при этом расщепляемые фрагменты, присутствующие в первой популяции антител MEF, отличаются от расщепляемых фрагментов, присутствующих во второй популяции антител MEF.

В некоторых вариантах осуществления первая совокупность и вторая совокупность по существу одинаковы, за исключением ВРМ. В некоторых вариантах осуществления первая совокупность и вторая совокупность по существу одинаковы, за исключением расщепляемых фрагментов. Например, первая и вторая популяции могут иметь по существу одинаковое распределение антител MEF (т.е. среднее количество ВРМ на антитело), количество ВРМ и/или расположение ковалентной связи одного или более расщепляемых фрагментов с каждым антителом MEF.

В некоторых вариантах осуществления первая совокупность и вторая совокупность отличаются, помимо того, что имеют разные ВРМ. В некоторых вариантах осуществления первая популяция и вторая популяция отличаются, а также имеют разные расщепляемые фрагменты. Например, первая и вторая популяции могут иметь различное распределение антител MEF, количество ВРМ и расположение ковалентной связи одного или более расщепляемых фрагментов с каждым антителом MEF.

В некоторых вариантах осуществления процент агрегации антител, описанных в настоящем документе, в композиции увеличивается не более чем от около 1-кратного до около 1,1-кратного относительно эквивалентного антитела, не обладающего функционализацией ВРМ. В некоторых вариантах осуществления процент агрегации антител, описанных в настоящем документе, в композиции увеличивается от около 1-кратного до около 1,1-кратного относительно эквивалентного антитела, не обладающего функционализацией ВРМ. Например, процент агрегации может быть увеличен примерно в 1 раз, примерно в 1,01 раза, примерно в 1,02 раза, примерно в 1,03 раза, примерно в 1,04 раза, примерно в 1,05 раза, примерно в 1,06 раза, примерно в 1,07 раза и т. д. примерно в 1,08 раза, примерно в 1,09 раза, примерно в 1,1 раза или в любом промежуточном значении по отношению к эквивалентному антителу, лишенному функционализации ВРМ. В некоторых вариантах осуществления процент агрегации определяют спектрофотометрическими (например, OD) или хроматографическими методами (например, SEC или HIC).

Предпочтительным путем введения описанной в настоящем документе композиции антител MEF является парентеральный. Парентеральное введение включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, внутригрудные инъекции или инфузионные методы. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят парентерально. В

одном из таких вариантов осуществления композиции вводят внутривенно. Введение обычно осуществляется любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции.

Фармацевтические композиции антитела составляют таким образом, чтобы обеспечить их биодоступность при введении композиции субъекту. Композиции будут иметь форму одной или более дозированных единиц для инъекций.

Материалы, используемые при получении фармацевтических композиций могут являться нетоксичными в применяемых количествах. Для специалиста в данной области техники будет очевидно, что оптимальная дозировка активного(ых) ингредиента(ов) в фармацевтической композиции будет зависеть от ряда факторов. Соответствующие факторы включают, помимо прочего, тип животного (например, человек), конкретную форму соединения, способ введения и используемую композицию.

В некоторых вариантах осуществления композиция антитела MEF, описанная в настоящем документе, представляет собой твердое вещество, например, в виде лиофилизированного порошка, пригодного для разведения в жидкости перед введением. В некоторых вариантах осуществления описанная в настоящем документе композиция антитела MEF представляет собой жидкую композицию, такую как раствор или суспензия. Жидкая композиция или суспензия пригодна для доставки путем инъекции, а лиофилизированное твердое вещество пригодно для разведения в виде жидкости или суспензии с использованием разбавителя, подходящего для инъекции. В композицию вводимую путем инъекции как правило включены одни или более из поверхностно-активных веществ, консервантов, смачивающих агентов, диспергирующих агентов, суспендирующих агентов, буферов, стабилизаторов и изотонических агентов.

В некоторых вариантах осуществления жидкие композиции, независимо от того, представляют ли они собой растворы, суспензии или другую подобную форму, также могут включать одно или более из следующих веществ: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить растворителем или суспендирующей средой, полиэтиленгликоли, глицерин, циклодекстрин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как аминокислоты, ацетаты, цитраты или фосфаты; детергенты, такие как неионные поверхностно-активные вещества, полиолы; и агенты для регуляции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральная композиция как правило находится в ампуле, одноразовом шприце или многодозовом флаконе, выполненном из стекла, пластика или другого материала. Физиологический солевой раствор является типовым адьювантом. Инъецируемая композиция предпочтительно представляет собой жидкую композицию, которая является стерильной.

Количество описанного в настоящем документе антитела, которое эффективно при лечении конкретного расстройства или состояния, будет зависеть от природы расстройства или состояния, которое обычно определяется стандартными клиническими методами. Кроме того, иногда можно применять *in vitro* или *in vivo* анализы, чтобы определить оптимальные диапазоны дозировок. Точная применяемая доза в композициях также будет зависеть от пути парентерального введения, тяжести заболевания или расстройства, а решение относительно нее следует принимать в соответствии с мнением практикующего врача и ситуацией каждого субъекта.

В некоторых вариантах осуществления композиции содержат терапевтически эффективное количество антитела, как описано в настоящем документе, так что можно получить подходящую дозировку. Обычно это количество составляет по меньшей мере около 0,01% антитела МЕФ от массы композиции.

В некоторых вариантах осуществления доза антитела, вводимого субъекту, составляет от около 0,01 мг/кг до около 100 мг/кг, от около 1 до около 100 мг на кг или от около 0,1 до около 25 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая субъекту, составляет от около 0,01 мг/кг до около 15 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая субъекту, составляет от около 0,1 мг/кг до около 15 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая субъекту, составляет от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза, составляет от около 0,1 мг/кг до около 5 мг/кг или от около 0,1 мг/кг до около 10 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза составляет от около 1 мг/кг до около 15 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза составляет от около 1 мг/кг до около 10 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза составляет от около 0,1 до около 4 мг/кг, от около 0,1 до около 3,2 мг/кг или от около 0,1 до около 2,7 мг/кг массы тела субъекта в течение цикла лечения.

Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту или эксципиенту, с которыми вводится данное соединение. Такие фармацевтические носители представляют собой жидкости. Вода является типовым носителем, когда соединения вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также полезны в качестве жидких носителей для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические носители также включают глицерин, пропилен, гликоль или этанол. Настоящие композиции, если желательно, в некоторых вариантах осуществления также будут содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов и/или буферных агентов для рН.

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, составляют в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения животным, особенно людям. Как правило, носители или наполнители для внутривенного введения представляют собой стерильные изотонические водные буферные растворы. В некоторых вариантах

осуществления композиция дополнительно содержит местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, и остальная часть состава поставляются либо отдельно, либо смешанными вместе в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше с указанием количества активного вещества. Если антитело необходимо вводить путем инфузии, его иногда вводят, например, из флакона для инфузии, содержащего стерильную воду фармацевтического качества или физиологический раствор. Когда композицию вводят путем инъекции, то обычно может прилагаться ампула стерильной воды для инъекций или солевой раствор, чтобы ингредиенты можно было смешивать перед введением.

Фармацевтические композиции, как правило, составлены как стерильные, по существу изотонические и полностью соответствующие всем нормам Правил производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США.

### **Способы применения**

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела MEF.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела MEF до, во время или после введения субъекту другого противоракового агента.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ задержки и/или предотвращения приобретенной устойчивости к противораковому агенту, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела MEF субъекту, подверженному риску развития или наличия приобретенной устойчивости к противораковому агенту. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят дозу противоракового агента (например, по существу в то же время, когда субъекту вводят дозу антитела MEF).

В некоторых вариантах осуществления предложен способ задержки и/или предотвращения развития рака, устойчивого к противораковому агенту, у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела MEF до, во время или после введения терапевтически эффективного количества противоракового агента.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий: введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), которое содержит модификацию, которая снижает эффекторную функцию антитела MEF, и которое по меньшей мере частично реверсирует

после введения, оказывая влияние на усиление эффекторной функции; и лечение этого состояния при поддержании системного уровня моноцитарного хемотаксического белка-1 (MCP-1) не более чем в 10 раз выше уровня до введения. В некоторых случаях способ дополнительно включает поддержание уровней фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ), интерлейкина 1 бета (IL1B), интерлейкина 6 (IL6), интерлейкина 10 (IL10) или их комбинации до уровня, не более чем в 10 раз превышающего уровни до введения. В некоторых случаях модификация включает расщепляемый биосовместимый полимерный фрагмент (BPM), ковалентно присоединенный к аминокислотному остатку, или посттрансляционную модификацию антитела MEF. В некоторых случаях до расщепления BPM антитело MEF обладает от 2% до 20% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишённого BPM. В некоторых случаях через 192 часа после введения антитело MEF имеет от 30% до 70% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишённого BPM. В некоторых случаях модификация, которая снижает эффекторную функцию антитела MEF, снижает аффинность связывания Fc $\gamma$ RIII антителом MEF.

Описанные в настоящем документе антитела полезны для ингибирования размножения опухолевой клетки или раковой клетки, вызывая апоптоз в опухоли или раковой клетке, и/или для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом. Соответственно, антитела можно использовать в различных условиях лечения рака.

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, связывается с опухолевой клеткой или раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, связывается с опухолевой клеткой или антигеном раковой клетки, который находится на поверхности опухолевой клетки или раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, связывается с опухолевой клеткой или антигеном раковой клетки, который представляет собой белок внеклеточного матрикса, связанный с опухолевой клеткой или раковой клеткой.

Специфичность антитела MEF к конкретной опухолевой клетке или раковой клетке может быть важна для определения тех опухолей или раковых заболеваний, которые наиболее эффективно лечатся. Например, антитела, которые нацелены на антиген раковых клеток, присутствующий на гемопоэтических раковых клетках, в некоторых вариантах осуществления лечат гематологические злокачественные новообразования. В некоторых вариантах осуществления антитела, нацеленные на антиген раковых клеток, присутствуют на аномальных клетках солидных опухолей для лечения таких солидных опухолей. В некоторых вариантах осуществления антитела направлены против аномальных клеток гемопоэтического рака, таких как, например, лимфомы (лимфома Ходжкина и неходжкинские лимфомы), а также лейкозы и солидные опухоли.

Раковые заболевания, включая, помимо прочего, опухоль, метастазы или другое заболевание или расстройство, характеризующееся аномальными клетками, которые характеризуются неконтролируемым ростом клеток, в некоторых вариантах осуществления

лечат или ингибируют введением антитела MEF.

В некоторых вариантах осуществления субъект ранее проходил лечение от рака. В некоторых вариантах осуществления предшествующее лечение представляет собой хирургическое вмешательство, лучевую терапию, введение одного или более противораковых агентов или комбинацию любого из вышеперечисленного.

В любом из способов, описанных в настоящем документе, рак выбирают из группы, состоящей из: аденокарциномы, корковой карциномы надпочечников, нейробластомы надпочечников, плоскоклеточного рак ануса, аденокарциномы аппендикса, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, аденокарциномы желчных протоков, карциномы мочевого пузыря, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, костной хордомы, лейкоза костного мозга, лимфоцитарного хронического лейкоза костного мозга, нелимфоцитарного острого миелоцитарного лимфопролиферативного заболевания костного мозга, множественной миеломы костного мозга, костной саркомы, астроцитомы головного мозга, глиобластомы головного мозга, медуллобластомы головного мозга, менингиомы головного мозга, олигодендроглиомы головного мозга, аденоидно-кистозной карциномы молочной железы, карциномы молочной железы, протоковой карциномы молочной железы *in situ*, инвазивной протоковой карциномы молочной железы, инвазивной дольковой карциномы молочной железы, метастатической карциномы молочной железы, нейроэндокринной карциномы шейки матки, плоскоклеточного рака шейки матки, аденокарциномы толстой кишки, карциноидной опухоли толстой кишки, аденокарциномы двенадцатиперстной кишки, эндометриоидной опухоли, аденокарциномы пищевода, карциномы пищевода и желудка, внутриглазной меланомы, внутриглазной плоскоклеточной карциномы глаза, карциномы слезного протока глаза, серозной карциномы маточной трубы, аденокарциномы желчного пузыря, гломусной опухоли желчного пузыря, аденокарциномы желудочно-пищеводного перехода, аденоидно-кистозной карциномы головы и шеи, карциномы головы и шеи, нейробластомы головы и шеи, плоскоклеточного рака головы и шеи, хромофорной карциномы почки, медуллярной карциномы почки, почечно-клеточной карциномы почки, папиллярного рака почки, саркоматоидного рака почки, уротелиального рака почки, карциномы почки, лимфоцитарного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, холангиокарциномы печени, гепатоцеллюлярной карциномы печени, карциномы печени, аденокарциномы легких, аденосквамозной карциномы легких, атипичного карциноида легкого, карциносаркомы легкого, крупноклеточной нейроэндокринной карциномы легкого, немелкоклеточного рака легкого, саркомы легкого, саркоматоидного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного недифференцированного рака легкого, плоскоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака верхних отделов аэродигестивного тракта, карциномы верхних отделов аэропищеварительного тракта, лимфомы лимфатического узла, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы лимфатического узла, В-клеточной лимфомы средостения, лимфомы лимфатического узла, плазмобластной аденокарциномы легких, фолликулярной лимфомы, неходжкинской лимфомы, недифференцированной карциномы

носоглотки и околоносовых пазух, карциномы яичника, карциносаркомы яичника, светлоклеточного рака яичника, эпителиального рака яичников, гранулезоклеточной опухоли яичника, серозной карциномы яичника, карциномы поджелудочной железы, аденокарциномы протоков поджелудочной железы, нейроэндокринной карциномы поджелудочной железы, мезотелиомы брюшины, серозной карциномы брюшины, хориокарциномы плаценты, мезотелиомы плевры, ацинарной аденокарциномы простаты, карциномы простаты, аденокарциномы прямой кишки, плоскоклеточного рака прямой кишки, рака придатков кожи, базальноклеточного рака кожи, меланомы кожи, рака кожи Меркеля, плоскоклеточного рака кожи, аденокарциномы тонкой кишки, желудочно-кишечных стромальных опухолей тонкой кишки (GIST), рака толстой кишки/толстого кишечника, аденокарциномы толстой кишки, ангиосаркомы мягких тканей, саркомы Юинга мягких тканей, гемангиоэндотелиомы мягких тканей, воспалительной миофибробластной опухоли мягких тканей, лейомиосаркомы мягких тканей, липосаркомы мягких тканей, нейробластомы мягких тканей, параганглиомы мягких тканей, периваскулярной эпителиоидноклеточной опухоли мягких тканей, саркомы мягких тканей, синовиальной саркомы мягких тканей, аденокарциномы желудка, аденокарциномы желудка диффузного типа, аденокарциномы желудка кишечного типа, аденокарциномы желудка кишечного типа, лейомиосаркомы желудка, карциномы тимуса, лимфоцитарной тимомы тимуса, папиллярного рака щитовидной железы, неизвестной первичной аденокарциномы, неизвестной первичной карциномы, неизвестного первичного злокачественного новообразования, лимфоидного новообразования, неизвестной первичной меланомы, неизвестной первичной саркоматоидной карциномы, неизвестной первичной плоскоклеточной карциномы, неизвестной недифференцированной нейроэндокринной карциномы, неизвестной первичной недифференцированной мелкоклеточной карциномы, карциносаркомы матки, аденокарциномы эндометрия матки, эндометриоидной аденокарциномы эндометрия матки, папиллярно-серозной аденокарциномы эндометрия матки и лейомиосаркомы матки.

В некоторых вариантах осуществления субъекту одновременно вводят один или более дополнительных противораковых агентов с антителом MEF. В некоторых вариантах осуществления субъект одновременно получает лучевую терапию с использованием антитела к MEF. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят один или более дополнительных противораковых агентов после введения антитела MEF. В некоторых вариантах осуществления субъект получает лучевую терапию после введения антитела MEF.

В некоторых вариантах осуществления субъект прекратил предыдущую терапию, например, из-за неприемлемых или невыносимых побочных эффектов, когда предыдущая терапия была слишком токсичной и/или когда у субъекта развилась устойчивость к предшествующей терапии.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения аутоиммунного расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту

терапевтически эффективного количества антитела MEF.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения аутоиммунного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела MEF субъекту до, во время или после введения субъекту дополнительного терапевтического агента (например, метотрексата).

В некоторых вариантах осуществления предложен способ облегчения одного или более симптомов аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела MEF.

Некоторые варианты осуществления обеспечивают способ облегчения одного или более симптомов аутоиммунного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела MEF до, во время или после введения субъекту дополнительного терапевтического агента.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ уменьшения возникновения обострений аутоиммунного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела MEF.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения частоты обострений аутоиммунного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела MEF до, во время или после введения дополнительного терапевтического агента субъекту (например, метотрексата).

«Вспышка» относится к внезапному появлению симптомов или внезапному усилению тяжести симптомов расстройства. Например, обострение легкой боли в суставах, обычно купируемое нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП), может привести к изнурительной боли в суставах, препятствующей нормальному передвижению даже при использовании НПВП.

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, связывается с аутоиммунным антигеном. В некоторых вариантах осуществления антиген находится на поверхности клетки, вовлеченной в аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, связывается с аутоиммунным антигеном, который находится на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF, описанное в настоящем документе, связывается с активированными лимфоцитами, которые связаны с состоянием аутоиммунного нарушения. В некоторых вариантах осуществления убивает или ингибирует размножение клеток, продуцирующих аутоиммунное антитело, связанное с конкретным аутоиммунным заболеванием.

В некоторых вариантах осуществления субъекту одновременно вводят один или более дополнительных терапевтических агентов с антителом MEF, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных терапевтических агентов представляют собой соединения, которые, как известно, лечат и/или облегчают симптомы аутоиммунного заболевания (например,

соединения, одобренные FDA или EMA для лечения аутоиммунного заболевания).

В некоторых вариантах осуществления аутоиммунные нарушения включают, помимо прочего, расстройства, связанные с Th2-лимфоцитами (например, атопический дерматит, атопическая астма, риноконъюнктивит, аллергический ринит, синдром Оменна, системный склероз и реакция «трансплантат против хозяина»); заболевания, связанные с Th1-лимфоцитами (например, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, псориаз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, первичный билиарный цирроз печени, гранулематоз Вегенера и туберкулез); и расстройства, связанные с активированными В-лимфоцитами (например, системная красная волчанка, синдром Гудпасчера, ревматоидный артрит и диабет I типа).

В некоторых вариантах осуществления один или более симптомов аутоиммунного расстройства включают, помимо прочего, боль в суставах, отек суставов, кожную сыпь, зуд, лихорадку, усталость, анемию, диарею, сухость глаз, сухость во рту, выпадение волос и мышечные боли.

Реакции, связанные с инфузией, связанные с введением антител, классифицируются по степени тяжести от 0 (отсутствие реакции) до 4 (тяжелая реакция). Субъекты с инфузионной реакцией 1 или 2 степени проявляют легкие симптомы, а субъекты с реакцией 3 степени - умеренные симптомы. В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения тяжести реакции, связанной с инфузией, связанной с антителом, включающий внутривенное введение композиции, содержащей описанные в настоящем документе антитела MEF, субъекту, нуждающемуся в этом; при этом тяжесть реакции, связанной с инфузией, снижается с 1 до 4 единиц по сравнению с внутривенным введением эквивалентного количества антитела, причем антитело эквивалентно антителу MEF. В некоторых вариантах осуществления тяжесть снижается на 1 единицу, на 2 единицы, на 3 единицы или на 4 единицы до минимального балла 0, например, максимальное снижение с 4-й степени до 0-й.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения частоты и/или риска развития инфузионной реакции, связанной с антителом, включающий внутривенное введение композиции, содержащей описанные в настоящем документе антитела MEF, субъекту, нуждающемуся в этом; при этом частота реакции, связанной с инфузией, снижается по сравнению с внутривенным введением эквивалентного количества антитела, и при этом антитело эквивалентно антителу MEF. В некоторых вариантах осуществления частота возникновения и/или риск снижается от около 10% до около 99%, например, от около 10% до около 50%, от около 25% до около 75%, от около 50% до около 99% или любое значение между ними.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ уменьшения симптомов инфузионной реакции, связанной с антителом, включающий внутривенное введение композиции, содержащей описанные в настоящем документе антитела к MEF, субъекту, нуждающемуся в этом; при этом симптомы реакции, связанной с инфузией, уменьшаются по сравнению с внутривенным введением эквивалентного количества антитела, и при этом

антитело эквивалентно антителу MEF. В некоторых вариантах осуществления уменьшение симптомов реакции, связанной с инфузией, включает уменьшение количества и/или тяжести одного или более симптомов. В некоторых вариантах осуществления тяжесть одного или более симптомов реакции, связанной с инфузией, снижается от около 10% до около 99%, например, от около 10% до около 50%, от около 25% до около 75%, от около 50% до около 99% или любое значение между ними. В некоторых вариантах осуществления один или несколько симптомов включают тошноту, рвоту, головную боль, тахикардию, гипотонию, сыпь, приливы, лихорадку, одышку, бронхоспазм, крапивницу, отек или комбинацию любого из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения тяжести реакции в месте инъекции, связанной с антителом, включающий внутривенное введение композиции, содержащей описанные в настоящем документе антитела к MEF, субъекту, нуждающемуся в этом; при этом тяжесть реакции в месте инъекции снижается по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества антитела, и при этом антитело эквивалентно антителу MEF. В некоторых вариантах осуществления тяжесть реакции в месте инъекции снижается на от около 10% до около 99%, например, от около 10% до около 50%, от около 25% до около 75%, от около 50% до около 99% или любое значение между ними.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ уменьшения симптомов в месте инъекции, связанной с антителом, включающий введение композиции, содержащей описанные в настоящем документе антитела к MEF, субъекту, нуждающемуся в этом; при этом симптомы реакции в месте инъекции уменьшаются по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества антитела, и при этом антитело эквивалентно антителу MEF. В некоторых вариантах осуществления тяжесть одного или более симптомов реакции в месте инъекции снижается от около 10% до около 99%, например, от около 10% до около 50%, от около 25% до около 75%, от около 50% до около 99% или любое значение между ними. В некоторых вариантах осуществления один или более симптомов включают один или более из следующих симптомов в месте инъекции: боль, зуд, покраснение, жжение, болезненность, повышение температуры, образование волдырей или сочетание любого из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения частоты и/или риска развития реакции в месте инъекции, связанной с антителом, включающий композицию, содержащую описанные в настоящем документе антитела, для субъекта, нуждающегося в этом; при этом частота возникновения реакции в месте инъекции снижается по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества антитела, и при этом антитело эквивалентно антителу MEF. В некоторых вариантах осуществления частота возникновения и/или риск снижается от около 10% до около 99%, например, от около 10% до около 50%, от около 25% до около 75%, от около 50% до около 99% или любое значение между ними.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения  $C_{max}$  активного

антитела, включающий внутривенное введение композиции, содержащей распределение антител МЕФ; причем активное антитело эквивалентно антителу МЕФ; и при этом  $C_{\max}$  активного антитела после внутривенного введения композиции антител МЕФ снижается по сравнению с  $C_{\max}$  после внутривенного введения эквимольного количества активного антитела.

В настоящем документе антитело, которое является «активным антителом», представляет собой антитело, которое имеет по существу такую же активность, что и эквивалентное антитело. Активные антитела включают антитела, в которых отсутствуют какие-либо остатки расщепляемых фрагментов и/или ВРМ, а также антитела с одним или более аддуктами расщепляемых фрагментов и/или ВРМ, все еще ковалентно присоединенными. Несмотря на ковалентное присоединение к антителу МЕФ, эти аддукты не оказывают существенного влияния на эффективность антитела МЕФ. Эти аддукты могут возникать, например, в результате расщепления конкретного расщепляемого фрагмента, который обязательно образует такой аддукт, в результате неполного расщепления одного или более расщепляемых фрагментов или в результате вторичного или альтернативного механизма расщепления. В некоторых вариантах осуществления активное антитело не содержит остатков расщепляемых фрагментов и остатков ВРМ. В некоторых вариантах осуществления активное антитело содержит один или более аддуктов расщепляемых фрагментов и/или ВРМ. В некоторых вариантах осуществления один или более аддуктов содержат 1-8 аддуктов из расщепляемых фрагментов. В некоторых вариантах осуществления один или более аддуктов содержат 2-4, 4-6, или 6-8 аддуктов из расщепляемых фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ задержки максимального связывания антитела с Fc-гамма-рецептором IIIa, включающий внутривенное введение композиции, содержащей антитела МЕФ, описанные в настоящем документе; причем антитело эквивалентно антителу МЕФ; и при этом антитело МЕФ задерживает связывание с Fc-гамма-рецептором IIIa по сравнению с антителом. В некоторых вариантах осуществления задержка связывания Fc-гамма-рецептора IIIa составляет от около 3 часов до около 96 часов, например, от около 3 часов до около 12 часов, от около 6 часов до около 18 часов, от около 12 часов до около 24 часов, от около 18 часов до около 36 часов, от около 24 часов до около 48 часов, от около 36 часов до около 72 часов, от около 48 часов до около 96 часов или любое промежуточное значение. В некоторых вариантах осуществления задержка связывания Fc-гамма-рецептора IIIa по сравнению с эквивалентным антителом составляет от около 1,5-кратной до около 50-кратной, например, от около 1,5-кратной до около 5-кратной, от около 3-кратной до около 10-кратной, от около 6-кратной до около 15-кратной, от около 10-кратной до около 20-кратной, от около 15-кратной до около 25-кратной, от около 20-кратной до около 30-кратной, от около 25-кратной до около 35-кратной, от около 30-кратной до около 40-кратной, от около 35-кратной до около 45-кратной, от около 40-кратной до около 50-кратной или любое промежуточное значения.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ селективного увеличения

связывания антитела с Fc-гамма-рецептором IIIa в клетке-мишени у субъекта, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей антитела MEF, раскрытые в настоящем документе; причем антитело эквивалентно антителу MEF; и при этом соотношение антитела MEF (i), связанного с Fc-гамма-рецептором IIIa в клетке-мишени, и (ii) системно связанного с Fc-гамма-рецептором IIIa, увеличивается по сравнению с соотношением антитела (i), связанного с Fc-гамма-рецептором IIIa в клетке-мишени и (ii) системно связанного с гамма-рецептором Fc IIIa. В некоторых вариантах осуществления селективное увеличение связывания Fc-гамма-рецептора IIIa в клетке-мишени по сравнению с системным связыванием Fc-гамма-рецептора IIIa составляет от около 1,5-кратного до около 50-кратного, например, от около 1,5-кратного до около 5-кратного, около от 3-кратного до около 10-кратного, от около 6-кратного до около 15-кратного, от около 10-кратного до около 20-кратного, от около 15-кратного до около 25-кратного, от около 20-кратного до около 30-кратного, около от 25-кратного до около 35-кратного, от около 30-кратного до около 40-кратного, от около 35-кратного до около 45-кратного, от около 40-кратного до около 50-кратного или любое промежуточное значение.

Синдром высвобождения цитокинов представляет собой системную воспалительную реакцию, которая может быть вызвана введением иммунотерапии антителами, что частично происходит из-за нецелевого взаимодействия рецепторов Fc. В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения системной активации Fc у субъекта после введения антитела, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей антитела, описанные в настоящем документе; при этом антитело MEF снижает системную активацию Fc по сравнению с эквивалентным антителом. В некоторых вариантах осуществления системная активация Fc снижается от около 10% до около 100% (устранение системной активации Fc по сравнению с эквивалентным антителом). В некоторых вариантах осуществления системная активация Fc снижается от около 10% до около 50%, от около 30% до около 70%, от около 50% до около 90%, от около 70% до около 100% или на любое среднее значение.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения активации системного Fc-гамма-рецептора IIIa у субъекта после введения антитела, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей антитела MEF, раскрытые в настоящем документе, причем антитело эквивалентно антителу MEF; и при этом введение антитела MEF обеспечивает сниженную системную активацию Fc-гамма-рецептора IIIa по сравнению с внутривенным введением эквимоларного количества антитела. В некоторых вариантах осуществления системная активация Fc-гамма-рецептора IIIa снижается на от около 10% до около 100% (устранение системной активации Fc-гамма-рецептора IIIa по сравнению с эквивалентным антителом). В некоторых вариантах осуществления системная активация Fc-гамма-рецептора IIIa снижается от около 10% до около 50%, от около 30% до около 70%, от около 50% до около 90%, от около 70% до около 100% или на любое среднее значение.

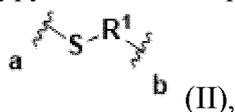
В некоторых вариантах осуществления предложен способ снижения системной



около 12 часов и по меньшей мере около 25% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 48 часов после внутривенного введения.

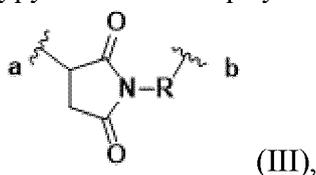
В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 10% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов и по меньшей мере около 30% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 48 часов после внутривенного введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 20% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов и по меньшей мере около 40% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 48 часов после внутривенного введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 30% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов и по меньшей мере около 50% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 48 часов после внутривенного введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 50% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов и около 100% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 48 часов после внутривенного введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 50% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов у субъекта. В некоторых вариантах осуществления расщепление одного или более расщепляемых фрагментов (и, таким образом, удаление ВРМ из антитела) высвобождает активное антитело, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно Формуле (II):



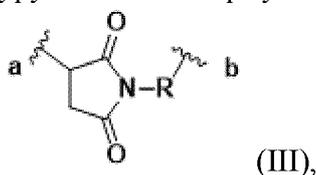
при этом, по меньшей мере около 50% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов и около 100% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 48 часов после внутривенного введения субъекту.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно Формуле (III):



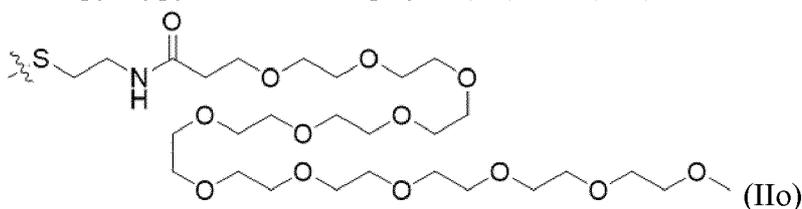
при этом, по меньшей мере около 30% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов и по меньшей мере около 50% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 48 часов после внутривенного введения субъекту.

В некоторых вариантах осуществления каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно Формуле (III):

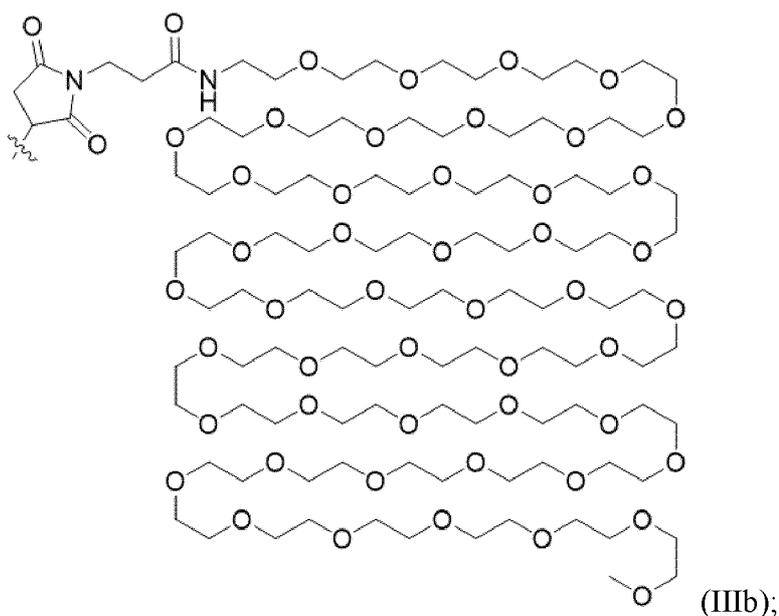


при этом, от около 30% до около 50% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов и от 50% до около 75% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 48 часов после внутривенного введения субъекту.

В некоторых вариантах осуществления антитело МЕФ модифицировано расщепляемым фрагментом, содержащим малеимидную группу с различной длиной углеродной цепи, например, 3-углеродную цепь (малеимидопропионил), 6-углеродную цепь (малеимидокапроил), 7-углеродную цепь (малеимидогептаноил) или 8-углеродную цепь (малеимидооктаноил). В некоторых вариантах осуществления антитело МЕФ модифицировано расщепляемым фрагментом, содержащим малеимидопропионильную группу. В некоторых вариантах осуществления антитело МЕФ модифицировано расщепляемым фрагментом, содержащим малеимидокапроильную группу. В некоторых вариантах осуществления антитело МЕФ модифицировано расщепляемым фрагментом, содержащим малеимидокапроильную группу, ковалентно связанную с группой PEG, содержащей различное количество звеньев этиленгликоля, например, PEG с 2-мя звеньями этиленгликоля (PEG4), с 4-мя звеньями этиленгликоля (PEG8), с 6-ю звеньями этиленгликоля (PEG12), с 18-ми звеньями этиленгликоля (PEG36) или с 24-мя звеньями этиленгликоля (PEG48). В некоторых вариантах осуществления антитело МЕФ модифицировано расщепляемым фрагментом, содержащим малеимидокапроильную группу, ковалентно связанную с группой PEG12. В некоторых вариантах осуществления антитело МЕФ модифицировано расщепляемым фрагментом, содержащим малеимидокапроильную группу, ковалентно связанную с группой PEG48. В некоторых вариантах осуществления антитело МЕФ модифицировано расщепляемым фрагментом, имеющим структуру согласно Формуле (По) или (Пб):



или

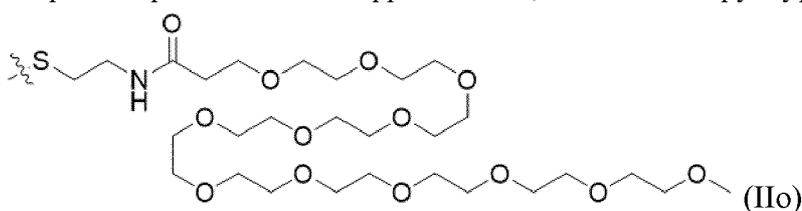


где  $\sim$  представляет собой ковалентное присоединение к атому серы антитела (например, атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF).

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF модифицировано расщепляемым фрагментом, содержащим разветвленную структуру. Как раскрыто в настоящем документе, многие разветвленные полимеры (в частности, разветвленные полимеры PEG) имеют более низкие гидродинамические радиусы и характеристическую вязкость, чем линейные полимеры с эквивалентной молекулярной массой. Эти свойства могут в некоторых случаях использоваться для создания антител MEF с большей стерической защитой в местах, окружающих прикрепление ВРМ (например, Fc-области антитела), и свойствами (например, диффузия, биологическое разделение и т. д.), более точно имитирующими не-ВРМ-модифицированные антитела. Кроме того, в некоторых случаях разветвленная структура ВРМ влияет на доступность расщепляемого фрагмента (например, дисульфидного присоединения), тем самым модифицируя и/или увеличивая контроль над скоростью расщепления ВРМ. В некоторых случаях ВРМ содержит по меньшей мере две ветви, такие как (PEG4)<sub>2</sub> антитела MEF к CD40-AF-17 (описано в примере 5). В некоторых случаях ВРМ содержит по меньшей мере три ветви, такие как PEG4-(PEG8)<sub>3</sub> антитела MEF к CD40-AF-19 (описано в примере 5).

В некоторых вариантах осуществления антитело MEF модифицировано расщепляемым фрагментом, содержащим дисульфидную группу, ковалентно связанную с разветвленной или линейной углеродной цепью различной длины, например, с линейной 2-углеродной цепью, разветвленной 2-углеродной цепью, линейной 3-углеродной цепью, линейной 4-углеродной цепью или линейной 5-углеродной цепью. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF модифицировано расщепляемым фрагментом, содержащим дисульфидную группу, ковалентно связанную с разветвленной или линейной двухуглеродной цепью. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF

модифицировано расщепляемым фрагментом, содержащим дисульфидную группу, ковалентно связанную с разветвленной или линейной двухуглеродной цепью, которая дополнительно ковалентно связана с группой PEG, состоящей из различного количества единиц этиленгликоля, например, PEG с 2-мя звеньями этиленгликоля (PEG4), с 4-мя звеньями этиленгликоля (PEG8), с 6-ю звеньями этиленгликоля (PEG12), с 18-ми звеньями этиленгликоля (PEG36) или с 24-мя звеньями этиленгликоля (PEG48). В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент содержит дисульфидную группу, ковалентно связанную с линейной двухуглеродной цепью, которая дополнительно ковалентно связана с группой PEG12. В некоторых вариантах осуществления антитело MEF модифицировано расщепляемым фрагментом, имеющим структуру согласно формуле (По):



где ~~~ представляет собой ковалентное присоединение к атому серы антитела (например, атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF).

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент содержит дисульфидную связь, и от около 10% до около 50% ВРМ высвобождается в течение 12 часов, например, от около 10% до около 30%, от около 20% до около 40% или от около 30% до около 50%. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент содержит дисульфидную связь, и от около 25% до около 100% ВРМ высвобождается в течение 24 часов, например, от около 25% до около 50%, от около 40% до около 60%, около 50% от около 70%, от около 60% до около 80%, от около 70% до около 90% или от около 80% до около 100%. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент содержит дисульфидную связь, и от около 25% до около 100% ВРМ высвобождается в течение 48 часов, например, от около 25% до около 50%, от около 40% до около 60%, около 50% от около 70%, от около 60% до около 80%, от около 70% до около 90% или от около 80% до около 100%.

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент содержит сукцинимидный фрагмент, и от около 25 до около 75% высвобождается в течение 24 часов, например, от около 25% до около 45%, от около 35% до около 55%, от около 45% до около 65% или от около 55% до около 75%. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент содержит сукцинимидный фрагмент, и от около 25 до около 75% высвобождается в течение 48 часов, например, от около 25% до около 45%, от около 35% до около 55%, от около 45% до около 65% или от около 55% до около 75%. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент содержит сукцинимидный фрагмент, и от около 50 до около 100% высвобождается в течение 96 часов, например, от около 50% до около 70%, от около 60% до около 80%, от около 70% до около 90% или от около 80% до около

100%.

## ПРИМЕРЫ

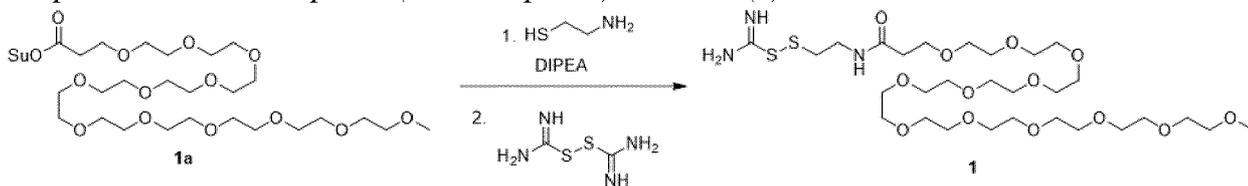
### Общие методы:

Все коммерчески доступные безводные растворители и реагенты использовали без дополнительной очистки. Система UPLC-MS 1 состояла из масс-детектора Waters SQ 2, соединенного с системой LC Acquity Ultra Performance, оснащенной колонкой с обращенной фазой CORTECS UPLC C18 2,1×50 мм, 1,6 мкм (метод 1). Кислая подвижная фаза (0,1% муравьиная кислота) состояла из градиента от 3% ацетонитрила/97% воды до 100% ацетонитрила (скорость потока=0,5 мкл/мин). Система UPLC-MS 2 состояла из масс-спектрометра Waters Xevo G2 ToF, соединенного с Waters Acquity H-Class Ultra Performance LC, оснащенной обращенно-фазовой колонкой CORTECS UPLC C18 2,1×50 мм, 1,6 мкм (метод 2). Мониторинг реакции осуществляли с помощью PLRP-MS (Poly LC обращенно-фазовая HPLC с ионизацией электрораспылением QTOF-масс-спектроскопии). Микроволновые реакции проводили в микроволновом реакторе Biotage Initiator+. Препаративную HPLC проводили на бинарном градиентном модуле Waters 2545 с фотодиодным матричным детектором Waters 2998. Продукты очищали на колонке с обращенной фазой C12 Phenomenex Synergi 250×10,0 мм, 4 мкм, 80 Å (масштаб <10 мг) (метод 3) или C12 Phenomenex Synergi 250×50 мм, 10 мкм, 80 Å колонка с обращенной фазой (масштаб 10-100 мг) (метод 4), элюируя 0,1% (объем/объем) трифторуксусной кислотой (ТФУ) в воде (растворитель А) и 0,1% (об./об.) ТФУ в ацетонитриле (MeCN) (растворитель В). Методы очистки обычно включали линейные градиенты от растворителя А до растворителя В с постепенным увеличением концентрации водного растворителя А от 90% до 5% растворителя А. Скорость потока составляла 4,6 мл/мин при мониторинге при УФ-излучении 220 нм. ЯМР-спектральные данные получали на 400 МГц спектрометре Varian Mercury. Постоянные спин-спиновых взаимодействия (*J*) приведены в герцах.

### ПРИМЕР 1

#### Синтез формамидиндисульфидов

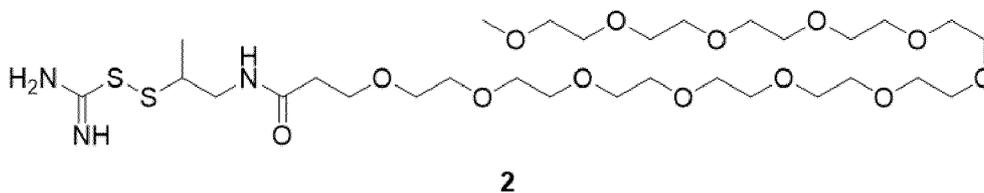
*Синтез* 38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азагентетраконтан-41-ил карбамо(дитиопероксо)имидата (1)



Во флакон емкостью 4 мл, оснащенный мешалкой, загружали эфир PEG12-OSu (**1a**, 23,4 мг, 0,03 ммоль), цистамин (4 мг, 0,05 ммоль), диизопропилэтиламин (DIPEA, 11,9 мкл, 0,07 ммоль) и N, N-диметилформамид (ДМФА, 300 мкл). Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре (RT). Реакционную смесь затем концентрировали в вакууме и полученный остаток повторно растворяли в воде (500 мкл). К реакционной смеси добавляли дигидрохлорид формамидиндисульфида (22 мг, 0,1 ммоль) и смесь перемешивали в течение 3 часов. Реакционную смесь затем разбавляли ДМСО (2

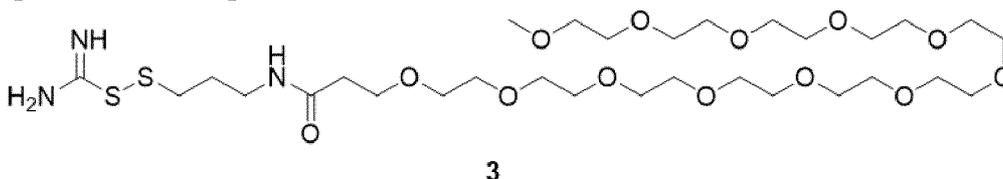
мл) и водой (2 мл) и загружали на препаративную HPLC(метод 3) для выделения соединения **1** (3 мг, выход 14%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): время удерживания=0,97 мин, m/z (ЭИР+) (M+H)<sup>+</sup>, 722,35 (теоретическое); 722,93 (наблюдаемое).

*Синтез 38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азадотетраконтан-41-ил карбамо(дитиопероксо)имидата (2)*



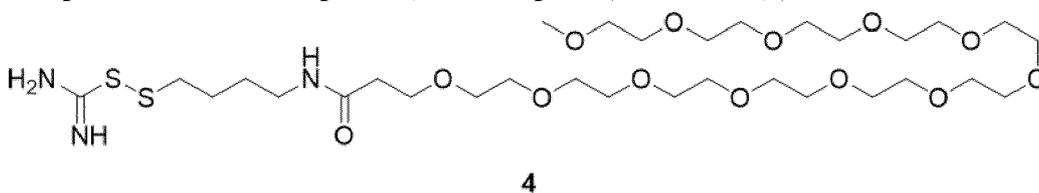
Соединение **2** получали с использованием тех же методик, что и для соединения **1**, с заменой цистамина на 1-аминопропан-2-тиол. Соединение **2** выделяли с помощью препаративной HPLC (метод 3) (3 мг, выход 12%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): время удерживания=1,15 мин, m/z (ЭИР+) (M+H)<sup>+</sup>, 736,37 (теоретическое); 736,75 (наблюдаемое).

*Синтез 38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азадотетраконтан-42-ил карбамо(дитиопероксо)имидата (3)*



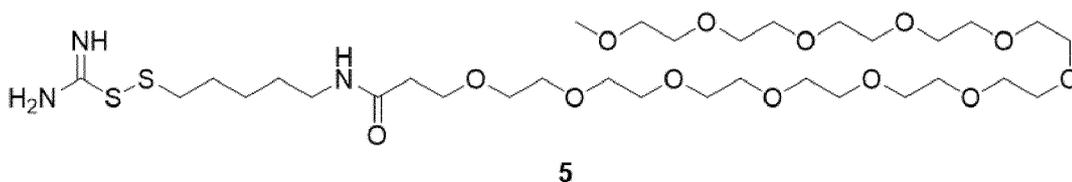
Соединение **3** получали с использованием тех же методик, что и для соединения **1**, с заменой цистамина на 3-аминопропан-1-тиол. Соединение **3** выделяли с помощью препаративной HPLC (метод 3) (4 мг, выход 20%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): Время удерживания=1,04 мин, m/z (ЭИР+) (M+H)<sup>+</sup>: 736,37 (теоретическое); 736,65 (наблюдаемое).

*Синтез 38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азатритетраконтан-43-ил карбамо(дитиопероксо)имидата (4)*



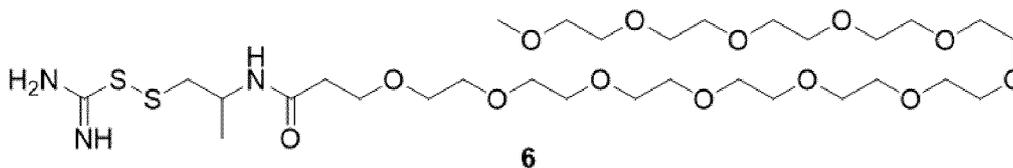
Соединение **4** получали с использованием тех же методик, что и для соединения **1**, с заменой цистамина на 4-аминобутан-1-тиол. Соединение **4** выделяли с помощью препаративной HPLC (метод 3) (4 мг, выход 18%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): Время удерживания=1,05 мин, m/z (ЭИР+) (M+H)<sup>+</sup>: 750,38 (теоретическое); 750,41 (наблюдаемое).

*Синтез 38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азатетраконтан-44-ил карбамо(дитиопероксо)имидата (5)*



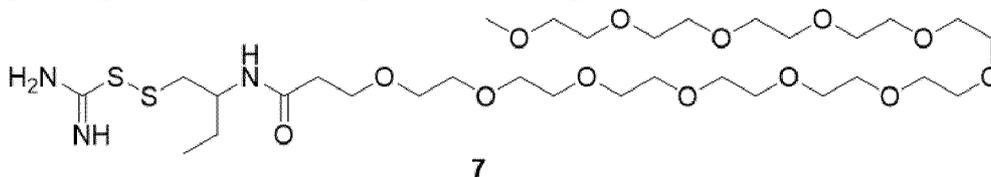
Соединение **5** получали с использованием тех же методик, что и для соединения **1**, с заменой цистамина на 5-аминопентан-1-тиол. Соединение **5** выделяли с помощью препаративной HPLC (метод 3) (2 мг, выход 8%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): Время удерживания=1,06 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(M+H)^+$ : 764,40 (теоретическое); 764,93 (наблюдаемое).

*Синтез* 38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азатетраконтан-44-ил карбамо(дитиопероксо)имидата (6)



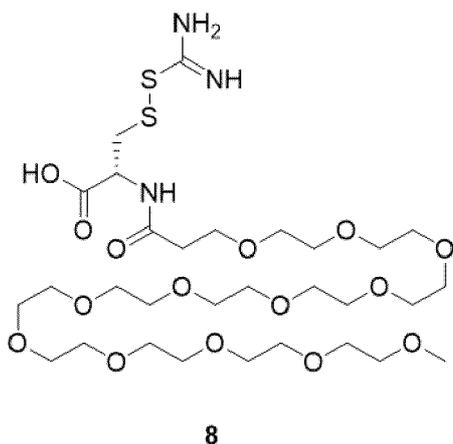
Соединение **6** получали с использованием тех же методик, что и для соединения **1**, с заменой цистамина на 2-аминопропан-1-тиол. Соединение **6** выделяли с помощью препаративной HPLC (метод 3) (4 мг, выход 18%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): Время удерживания=0,97 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(M+H)^+$ : 736,37 (теоретическое); 736,37 (наблюдаемое).

*Синтез* 38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азатетраконтан-44-ил карбамо(дитиопероксо)имидата (7)



Соединение **7** получали с использованием тех же методик, что и для соединения **1**, с заменой цистамина на 2-аминобутан-1-тиол. Соединение **7** выделяли с помощью препаративной HPLC (метод 3) (7 мг, выход 31%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): Время удерживания=1,03 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(M+H)^+$ : 750,38 (теоретическое); 750,32 (наблюдаемое).

*Синтез* *S*-(карбамимидоилтио)-*N*-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаоксаоктатриаконтан-38-оил)-*L*-цистеина (8)

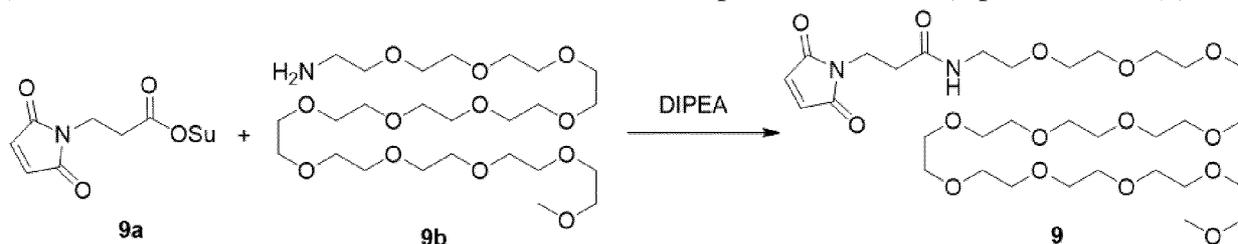


Соединение **8** получали с использованием тех же методик, что и для соединения **1**, с заменой цистамина на *L*-цистеин. Соединение **8** выделяли с помощью препаративной HPLC (метод 3) (2 мг, выход 9%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): Время удерживания=1,02 мин, *m/z* (ЭИР+) (*M+H*)<sup>+</sup>: 766,34 (теоретическое); 766,64 (наблюдаемое).

## ПРИМЕР 2

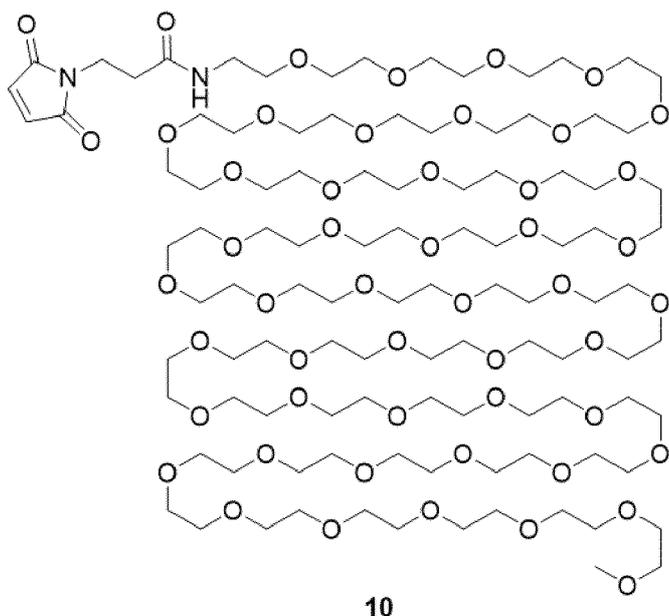
### Синтез расщепляемых фрагментов с малеимидными группами:

*Синтез* 3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)-*N*-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додокаоксагептаатриаконтан-37-ил)пропанамида (**9**)



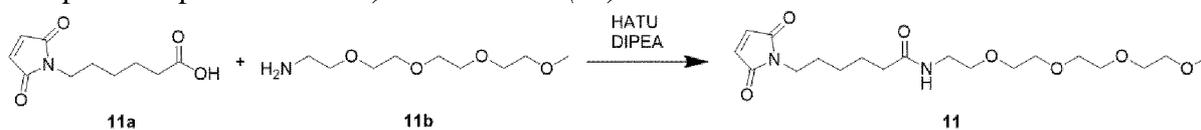
В стеклянный флакон емкостью 4 мл, снабженный мешалкой, загружали малеимидопропионовый эфир OSu (**9a**, 3,0 мг, 0,011 ммоль), амин PEG12 (**9b**, 6,3 мг, 0,011 ммоль), DIPEA (3,9 мкл, 0,023 ммоль) и дихлорметан (DCM, 300 мкл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь затем концентрировали в вакууме и полученный остаток повторно растворяли в ДМСО (500 мкл). Реакционную смесь загружали на препаративную HPLC и соединение **9** выделяли согласно методу 3 (5 мг, выход 62%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): время удерживания=1,20 мин, *m/z* (ЭИР+) (*M+H*)<sup>+</sup>: 711,39 (теоретическое); 711,22 (наблюдаемое).

*Синтез* 3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)-*N*-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86,89,92,95,98,101,104,107,110,113,116,119,122,125,128,131,134,137,140,143-октаатетраоктаоксапентаатетраоктагектан-145-ил)пропанамида (**10**)



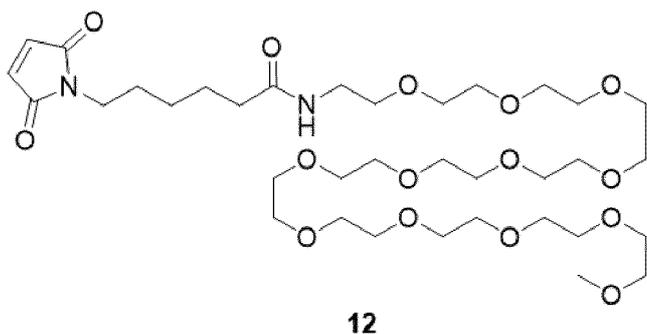
Соединение **10** получали с использованием тех же методик, что и для соединения **9**, с заменой амина PEG12 (**9b**) на амин PEG48. Соединение **10** выделяли с помощью препаративной HPLC (метод 4) (8 мг, выход 31%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): время удерживания=1,46 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(M+2H)^{2+}$ , 1149,17 (теоретическое); 1149,67 (наблюдаемое).

*Синтез* 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N-(2,5,8,11-тетраоксатридекан-13-ил)гексанамид (**11**)



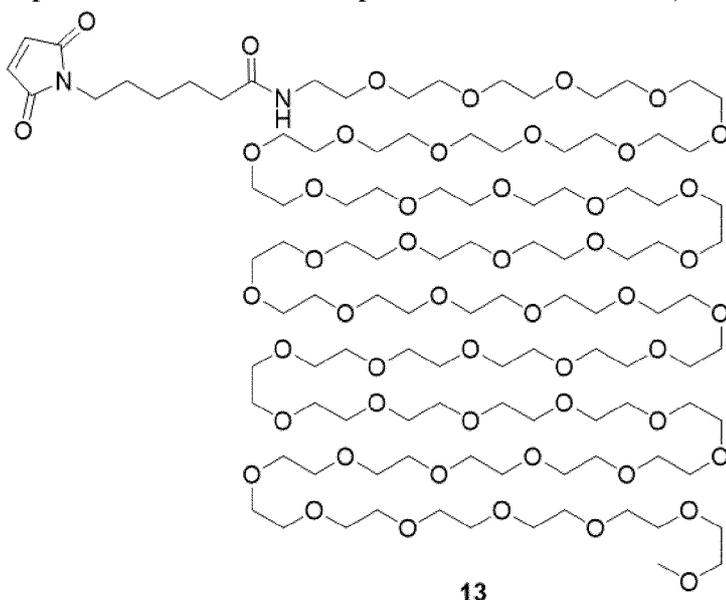
В стеклянный флакон емкостью 4 мл, снабженный мешалкой, загружали 6-малеимидакапроновую кислоту (**11a**, 20,4 мг, 0,096 ммоль), 1-[бис(диметиламино)метилден]-1H-1,2,3-триазол[4,5-b]пиридиний 3-оксид гексафторфосфат (HATU, 34,9 мг, 0,092 ммоль), безводный ДМФА (0,5 мл) и DIPEA (0,050 мл, 0,289 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 минут. Амино-PEG4 (**11b**, 20 мг, 0,096 ммоль) добавляли во флакон и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Растворитель удаляли в вакууме и остаток растворяли в 0,1% (об./об.) водном растворе ТФУ. Реакционную смесь загружали на препаративную HPLC (метод 4), фракции, содержащие соединение **11**, объединяли и лиофилизировали с получением соединения **11** (выход 27%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): Время удерживания=1,64 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(M+H)^+$ : 401,22 (теоретическое); 401,20 (наблюдаемое).

*Синтез* 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додэкаоксагептатриаконтан-37-ил)гексанамид (**12**)



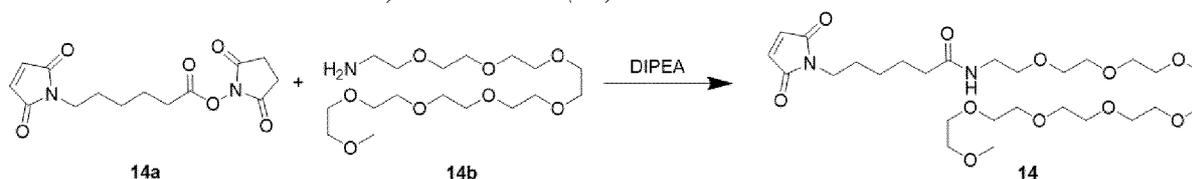
Соединение **12** получали с использованием тех же методик, что и для соединения **11**, с заменой амина PEG4 (**11b**) на амин PEG12 (**9b**). Соединение **12** выделяли с помощью препаративной HPLC (метод 4) (выход 30%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): Время удерживания=1,79 мин, m/z (ЭИР+) (M+H)<sup>+</sup>: 753,43 (теоретическое); 753,42 (наблюдаемое).

*Синтез* 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86,89,92,95,98,101,104,107,110,113,116,119,122,125,128,131,134,137,140,143-октатетраконтаоксапентагексан-145-ил)гексанамида (**13**)



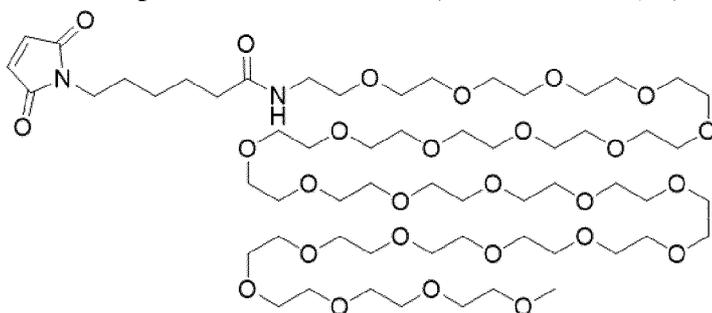
Соединение **13** получали с использованием тех же методик, что и для соединения **11**, с заменой амина PEG4 (**11b**) на амин PEG48. Соединение **13** выделяли с помощью препаративной HPLC (метод 4) (выход 18%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): время удерживания=2,05 мин, m/z (ЭИР+) (M+2H)<sup>2+</sup>, 1170,20 (теоретическое); 1170,18 (наблюдаемое).

*Синтез* 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)гексанамида (**14**)



В стеклянный флакон емкостью 4 мл, снабженный мешалкой, загружали 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)гексаноат (**14a**, 19,29 мг, 0,063 ммоль), amino-PEG8 (**14b**, 20 мг, 0,052 ммоль), безводный ДМФА (0,5 мл) и DIPEA (0,045 мл, 0,261 ммоль). Смесь перемешивали при к. т. в течение 3 ч. Растворитель затем удаляли в вакууме и полученный остаток растворяли в 0,1% (об./об.) водном растворе ТФУ. Реакционную смесь загружали на препаративную HPLC (метод 4), фракции, содержащие соединение **14**, объединяли и лиофилизировали с получением соединения **14** (17,73 мг, выход 58,95%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): время удерживания=1,69 мин, *m/z* (ЭИР+) (M+H)<sup>+</sup>, 577,33 (теоретическое); 577,28 (наблюдаемое).

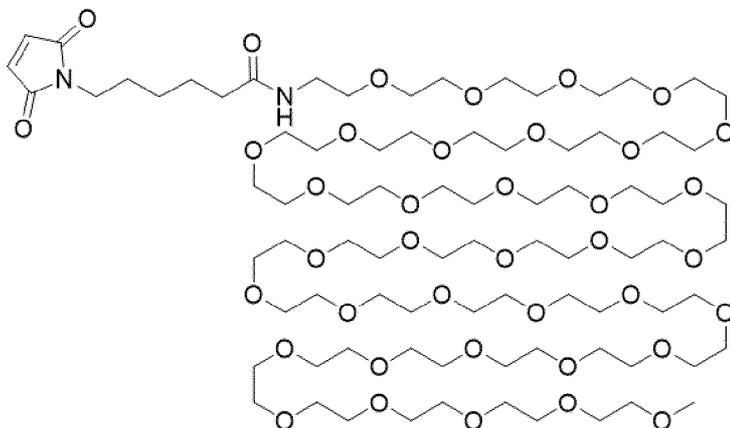
*Синтез* 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)-*N*-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаоксатригептаконтан-73-ил)гексанамида (**15**)



15

Соединение **15** получали с использованием тех же методик, что и для соединения **14**, с заменой амина PEG8 (**14b**) на амин PEG24. Соединение **15** выделяли с помощью препаративной HPLC (метод 4) (19,48 мг, выход 82,72%). Аналитическая UPLC-MS (способ 1): время удерживания=1,87 мин, *m/z* (ЭИР+) (M+H)<sup>+</sup>, 1281,75 (теоретическое); 1281,72 (наблюдаемое).

*Синтез* 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)-*N*-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86,89,92,95,98,101,104,107-гексатриаконтаоксанагектан-109-ил)гексанамида (**16**)

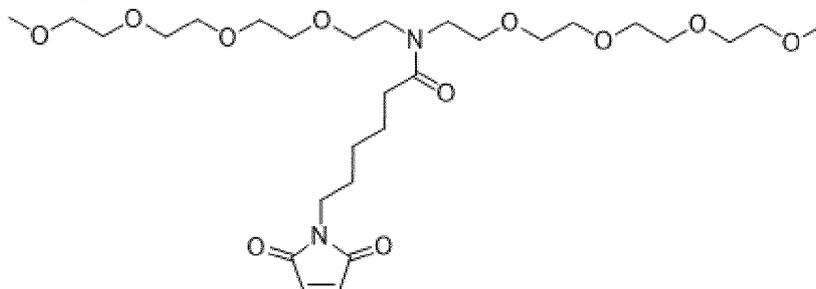


16

Соединение **16** получали с использованием тех же методик, что и для соединения **14**,

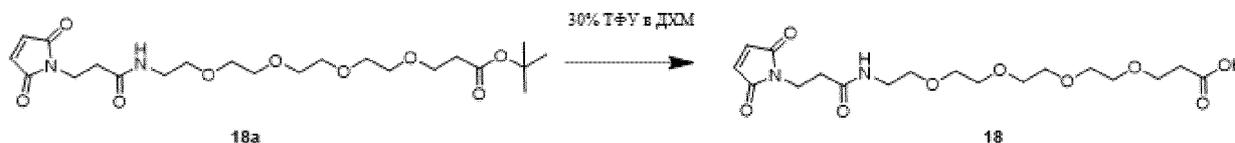
с заменой амина PEG8 (**14b**) на амин PEG36. Соединение **16** выделяли с помощью препаративной HPLC (метод 4) (16,76 мг, выход 74,86%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): Время удерживания=1,93 мин, m/z (ЭИР+) (M+H)<sup>+</sup>: 1810,06 (теоретическое); 1810,02 (наблюдаемое).

*Синтез* 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N,N-ди(2,5,8,11-тетраоксатридекан-13-ил)гексанамида (**17**)



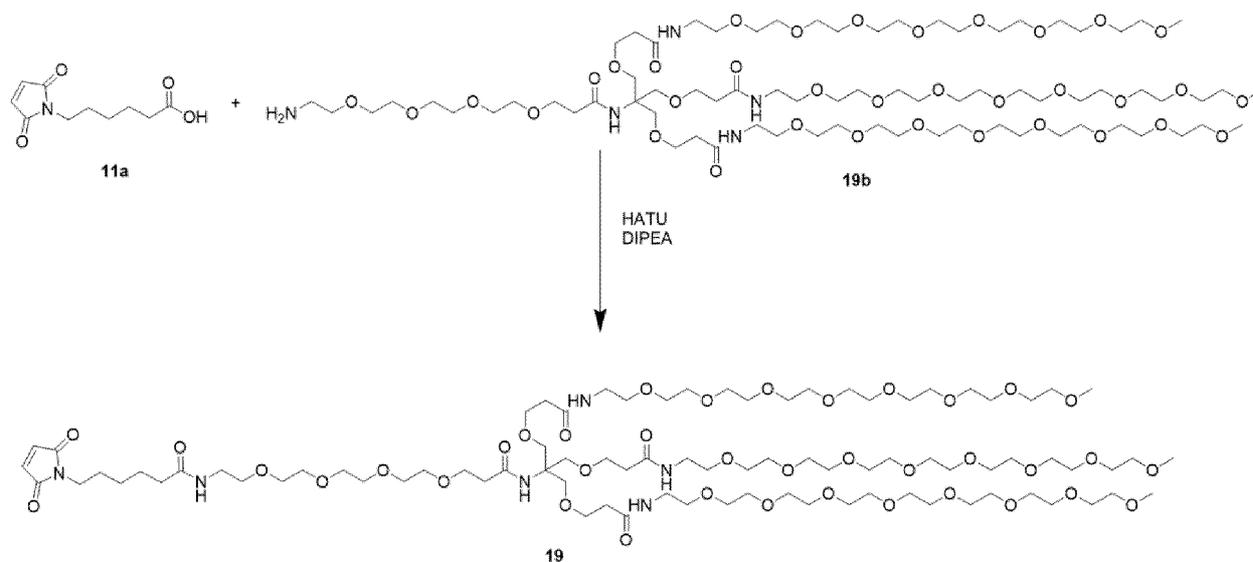
Соединение **17** получали с использованием тех же методик, что и для соединения **14**, с заменой амина PEG8 (**14b**) на ди(2,5,8,11-тетраоксатридекан-13-ил)амин. Соединение **17** выделяли с помощью препаративной HPLC (метод 4) (19,11 мг, выход 64,30%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): Время удерживания=1,84 мин, m/z (ЭИР+) (M+H)<sup>+</sup>: 591,34 (теоретическое); 591,31 (наблюдаемое).

*Синтез* 1-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3-оксо-7,10,13,16-тетраокса-4-азанадекан-19-оиковой кислоты (**18**)



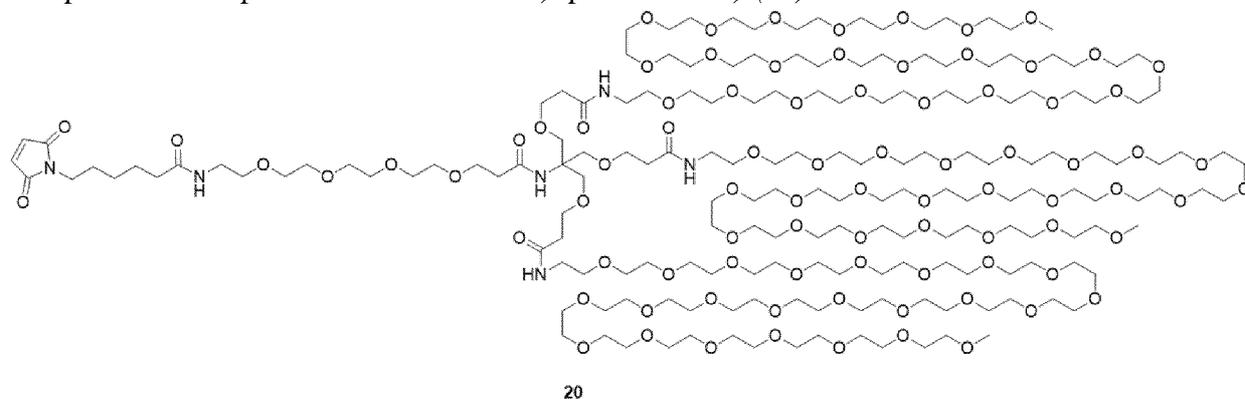
В стеклянный флакон емкостью 4 мл, снабженный мешалкой, загружали tr-PEG4-OtBu (**18a**, 22 мг, 0,047 ммоль) и 30% (об./об.) ТФУ в DCM (1 мл). Смесь перемешивали при к. т. в течение 1 ч. Растворитель затем удаляли в вакууме и полученный остаток растворяли в 0,1% (об./об.) водном растворе ТФУ. Реакционную смесь загружали на препаративную систему HPLC (метод 4), фракции, содержащие соединение **18**, объединяли и лиофилизировали с получением соединения **18** (18,97 мг, выход 98,08%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): время удерживания=1,39 мин, m/z (ЭИР+) 417,18 (M+H)<sup>+</sup>, 417,18 (теоретическое); 417,15 (наблюдаемое).

*Синтез* 3,3'-((2-(22-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-17-оксо-4,7,10,13-тетраокса-16-азадокосанамида)-2-(27-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,30-нонаокса-26-азагентриаконтан-31-ил)пропан-1,3-диил)бис(окси))бис(N-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)пропанамида) (**19**)



В стеклянный флакон емкостью 4 мл, снабженный мешалкой, загружали 6-малеимидакапроновую кислоту (**11a**, 1,67 мг, 0,008 ммоль), HATU (2,86 мг, 0,008 ммоль), безводный ДМФА (0,5 мл) и DIPEA (0,004 мл, 0,024 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 минут. Амино-PEG4-(PEG8)<sub>3</sub> (**19b**, 30 мг, 0,008 ммоль) добавляли во флакон и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Растворитель затем удаляли в вакууме и полученный остаток растворяли в 0,1% (об./об.) водном растворе ТФУ. Реакционную смесь загружали на препаративную систему HPLC (метод 4), фракции, содержащие соединение **19**, объединяли и лиофилизировали с получением соединения **19** (выход 25%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): Время удерживания=1,91 мин, m/z (ЭИР+) (M+H)<sup>+</sup>: 1874,08 (теоретическое); 1874,04 (наблюдаемое).

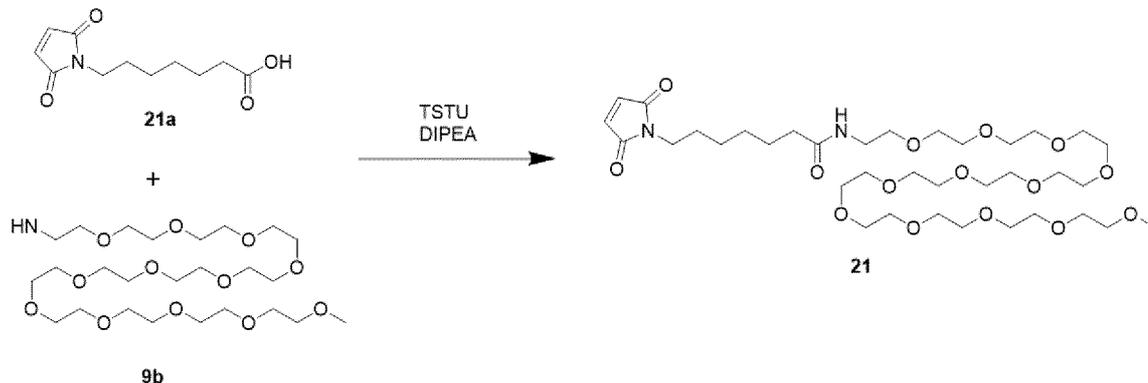
*Синтез* 3,3'-((2-(22-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-17-оксо-4,7,10,13-тетраокса-16-азадокосанамида)-2-(75-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,78-пентакосаокса-74-азанонагептаконтан-79-ил)пропан-1,3-диил)бис(окси))бис(N-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаоксатригептаконтан-73-ил)пропанамида) (**20**)



Соединение **20** получали с использованием тех же методик, что и для соединения **19**, с заменой амино-PEG4-(PEG8)<sub>3</sub> (**19b**) на амино-PEG4-(PEG24)<sub>3</sub>. Соединение **20** выделяли с

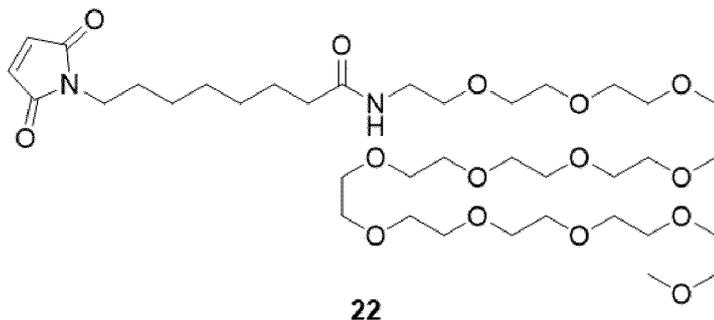
помощью препаративной HPLC (метод 4) (выход 21%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): время удерживания=1,99 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(M+2H)^{2+}$ , 1995,18 (теоретическое); 1995,11 (наблюдаемое).

*Синтез* 7-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаоксагептатриаконтан-37-ил)гептанамида (21)

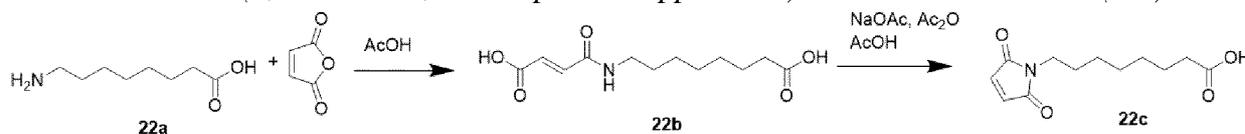


В стеклянный флакон объемом 4 мл, снабженный мешалкой, загружали 7-малеимидогептановую кислоту (**21a**, 20,4 мг, 0,096 ммоль), *O*-(*N*-сукцинимидил)-*N,N,N',N'*-тетраметилурония тетрафторбората (TSTU, 34,9 мг, 0,092 ммоль), безводный ДМФА (0,5 мл) и DIPEA (0,050 мл, 0,289 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 минут. Амино-PEG12 (**9b**, 20 мг, 0,096 ммоль) добавляли во флакон и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Растворитель затем удаляли в вакууме и полученный остаток растворяли в 0,1% (об./об.) водном растворе ТФУ. Реакционную смесь загружали на препаративную систему HPLC (метод 4), фракции, содержащие соединение **21**, объединяли и лиофилизировали с получением соединения **21** (выход 50%). Аналитическая UPLC-MS (метод 2): время удерживания=1,39 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(M+Na)^+$ , 790,44 (теоретическое); 789,93 (наблюдаемое).

*Синтез* 8-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаоксагептатриаконтан-37-ил)октанамида (22)



*Синтез 8-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)октановой кислоты (22c)*



В стеклянный флакон емкостью 20 мл, снабженный мешалкой, загружали 8-аминооктановую кислоту (**22a**, 66,58 мг, 0,418 ммоль), малеиновый ангидрид (40 мг, 0,418

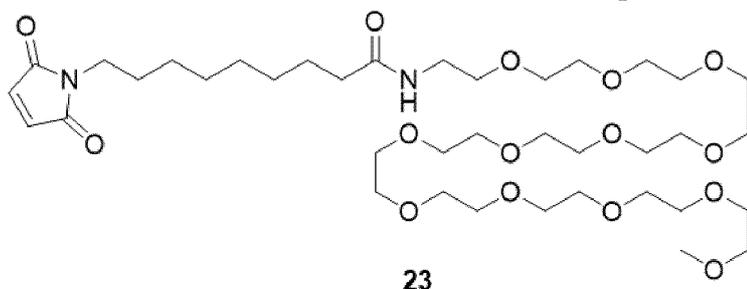
ммоль) и ледяную уксусную кислоту (AcOH, 5 мл). Смесь перемешивали при 40°C в течение 1 ч. Затем растворитель удаляли в вакууме и остаток растворяли в DCM (4 мл). Соединение **22b** получали осаждением холодными гексанами, выделяли фильтрованием (85,1 мг, выход 79,11%) и использовали на последующих стадиях без дополнительной очистки. Аналитическая UPLC-MS (метод 2): время удерживания=1,30 мин, m/z (ES-) (M-H): 256,13 (теоретическое); 256,26 (наблюдаемое).

В стеклянный флакон емкостью 4 мл, оснащенный мешалкой, загружали соединение **22b** (10 мг, 0,039 ммоль), ацетат натрия (NaOAc, 1,59 мг, 0,019 ммоль), ледяную уксусную кислоту (AcOH, 0,002 мл, 0,039 ммоль) и уксусный ангидрид (Ac<sub>2</sub>O, 1 мл). Смесь перемешивали при 60°C в течение 1 ч. Затем растворитель удаляли в вакууме и полученный остаток ресуспендировали и подвергали азеотропной перегонке с толуолом (3×2 мл) с получением соединения **22c** (8,02 мг, выход 86,24%), которое использовали на последующих стадиях без дополнительной очистки. Аналитическая UPLC-MS (метод 2): время удерживания=1,91 мин, m/z (ЭИР+) (M+H)<sup>+</sup>, 240,12 (теоретическое); 240,17 (наблюдаемое).

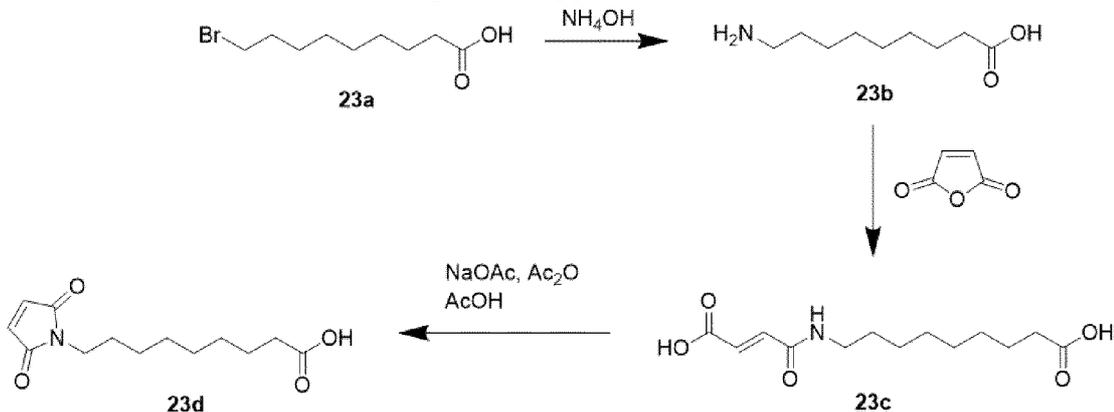
#### Синтез додекаоксагептатриаконтан-37-ил)октанамида (**22**)

Соединение **22** готовили с использованием тех же процедур, что и для соединения **21**, заменяя 7-малеимидогептановую кислоту (**21a**) на 8-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)октановую кислоту (**22c**). Соединение **22** выделяли с помощью препаративной HPLC (способ 4) (4,73 мг, выход 14,55%). Аналитическая UPLC-MS (способ 2): Время удерживания=1,50 мин, m/z (ЭИР+) (M+H)<sup>+</sup>: 781,47 (теоретическое); 781,92 (наблюдаемое).

Синтез 8-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35 -додекаоксагептатриаконтан-37-ил)октанамида (**23**)



#### Синтез 8-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)октановой кислоты (**23d**)



В стеклянный флакон емкостью 20 мл, снабженный мешалкой, загружали бромнановую кислоту (**23a**, 30 мг, 0,127 ммоль), водный гидроксид аммония (1,5 мл) и ДМФА (5 мл). Смесь перемешивали при к. т. в течение ночи. Затем растворитель удаляли в вакууме и полученный остаток суспендировали и подвергали азеотропной перегонке с толуолом (3×3 мл) с получением соединения **23b** которое использовали на последующих стадиях без дополнительной очистки. Аналитическая UPLC-MS (метод 2): время удерживания=0,81 мин, m/z (ЭИР+) (M+H)<sup>+</sup>, 174,14 (теоретическое); 174,13 (наблюдаемое).

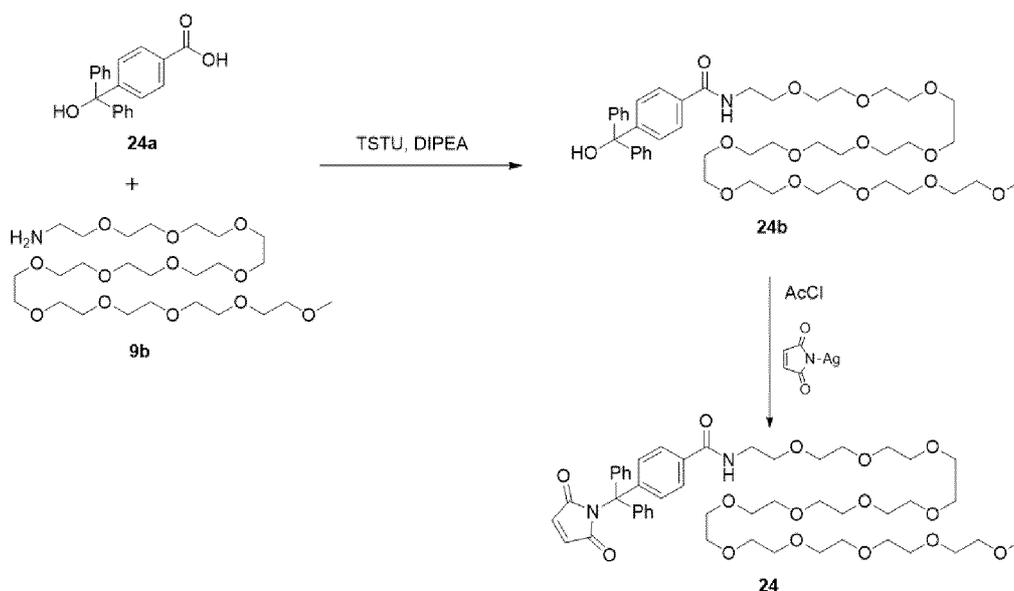
В стеклянный флакон емкостью 20 мл, снабженный мешалкой, загружали сырую 9-аминонановую кислоту (**23b**, 31,1 мг, 0,180 ммоль), малеиновый ангидрид (17,60 мг, 0,180 ммоль) и ледяную уксусную кислоту (5 мл). Смесь перемешивали при 40°C в течение 1 ч. Затем растворитель удаляли в вакууме и полученный остаток растворяли в DCM (4 мл). Соединение **23c** получали осаждением холодными гексанами и выделяли фильтрованием. Выделенный сырой **23c** использовали на последующих стадиях без дополнительной очистки. Аналитическая UPLC-MS (метод 2): время удерживания=1,41 мин, m/z (ЭИР+M+H)<sup>+</sup>, 272,15; 272,20 (наблюдаемое).

В стеклянный флакон емкостью 4 мл, снабженный мешалкой, загружали сырую наноевую кислоту (**23c**, 10 мг, 0,039 ммоль), ацетат натрия (1,51 мг, 0,018 ммоль), ледяную уксусную кислоту (2 мкл, 0,037 ммоль) и уксусный ангидрид (1 мл). Смесь перемешивали при 60°C в течение 1 ч. Затем растворитель удаляли в вакууме и полученный остаток ресуспендировали и подвергали азеотропной перегонке с толуолом (3×2 мл) с получением соединения **23d** которое использовали на последующих стадиях без дополнительной очистки. Аналитическая UPLC-MS (метод 2): время удерживания=1,77 мин, m/z (ЭИР+M+H)<sup>+</sup>, 254,13; 254,00 (наблюдаемое).

*Синтез* *8-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаоксагептакоктан-37-ил)октанамида (23)*

Соединение **23** готовили с использованием тех же процедур, что и для соединения **21**, заменяя 7-малеимидогептановую кислоту (**21a**) на 8-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)октановую кислоту (**23d**). Соединение **23** выделяли с помощью препаративной HPLC (метод 3) (0,80 мг, выход 2,7%). Аналитическая UPLC-MS (способ 2): Время удерживания=1,60 мин, m/z (ЭИР+) (M+H)<sup>+</sup>: 795,48 (теоретическое); 796,04 (наблюдаемое).

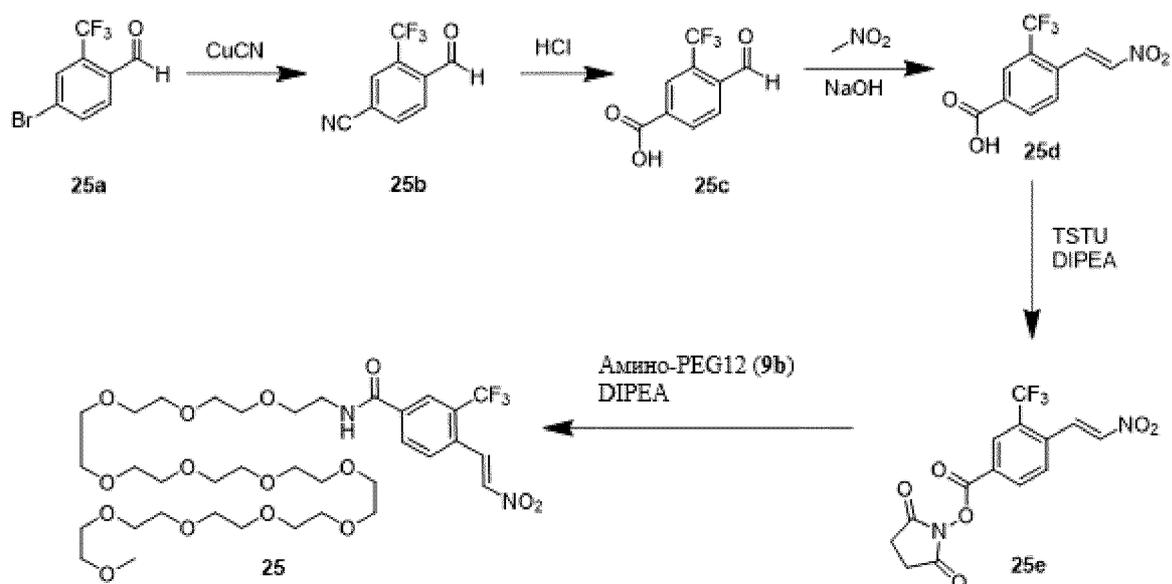
*Синтез* *4-((2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)дифенилметил)-N-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаоксагептакоктан-37-ил)бензамида (24)*



Во флакон емкостью 4 мл, снабженный мешалкой, загружали 4-(гидроксидифенилметил)бензойной кислоты (**24a**, 100 мг, 0,33 ммоль), TSTU (100 мг, 0,33 ммоль), DIPEA (0,17 мкл, 0,99 ммоль) и ДМФА (2 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут при комнатной температуре, затем добавляли amino-PEG12 (**9b**, 183 мг, 0,33 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч, и концентрировали в вакууме. Соединение **24b** (100 мг, выход 36%) выделяли препаративной HPLC (метод 4). Аналитическая UPLC-MS (способ 1): Время удерживания=1,81 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(M+H)^+$ : 846,46 (теоретическое); 846,33 (наблюдаемое).

В стеклянный флакон емкостью 4 мл, снабженный мешалкой, загружали соединение **24b** (100 мг, 0,12 ммоль) и DCM (1 мл). К реакционной смеси при комнатной температуре добавляли ацетилхлорид (AcCl, 16,5 мкл, 0,23 ммоль) и смесь перемешивали в течение 2 часов. Добавляли малеимид серебра (52 мг, 0,25 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов, после чего реакционную смесь фильтровали и концентрировали в вакууме. Соединение **24** (26 мг, выход 24%) выделяли препаративной HPLC (метод 4). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): время удерживания=1,84 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(M+Na)^+$ , 925,47 (теоретическое); 925,99 (наблюдаемое).

*Синтез (E)-N-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додэкаоксагептатриаконтан-37-ил)-4-(2-нитровинил)-3-(трифторметил)бензамида (25)*



#### *Синтез 4-формил-3-(трифторметил)бензонитрила (25b)*

Во флакон емкостью 5 мл, пригодный для использования в микроволновой печи, снабженный мешалкой, загружали 4-бром-2-(трифторметил)бензальдегид (**25a**, 100 мг, 0,395 ммоль), цианид меди (I) (46,02 мг, 0,514 ммоль) и N-метил-2-пирролидон (NMP, 4 мл). Смесь нагревали до 200 °С и перемешивали 15 мин в микроволновом реакторе. Реакционную смесь затем разбавляли DCM (20 мл) и фильтровали через целит. Растворитель удаляли в вакууме и соединение **25b** (62,47 мг, выход 79,38%) выделяли с помощью флэш-хроматографии на колонке с силикагелем и элюирования с использованием градиента 0-20% этилацетата в гексанах.

#### *Синтез 4-формил-3-(трифторметил)бензойной кислоты (25c)*

В стеклянный флакон объемом 20 мл, снабженный мешалкой, загружали соединение **25b** (62,47 мг, 0,314 ммоль) и концентрированную HCl (7 мл). Смесь нагревали до 90 °С и перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь затем разбавляли водой (30 мл) и экстрагировали 3 x 30 мл этилацетата (EtOAc). Органические слои объединяли и промывали 3 x 30 мл рассола, сушили над сульфатом магния (MgSO<sub>4</sub>) и растворитель удаляли в вакууме с получением соединения **25c** (52,80 мг, выход 77,16%), которое использовали на последующих стадиях без дополнительной очистки. Аналитическая UPLC-MS (способ 2): Время удерживания=1,63 мин, m/z (ES-) (M-H)<sup>-</sup>: 217,02 (теоретическое); 217,03 (наблюдаемое).

#### *Синтез (E)-4-(2-нитровинил)-(трифторметил)бензойной кислоты (25d)*

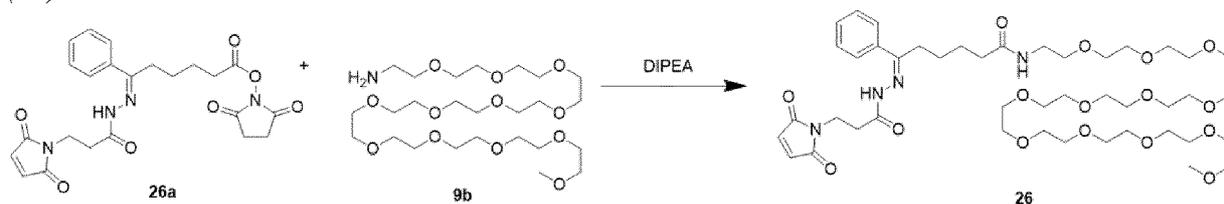
В стеклянный флакон емкостью 20 мл, снабженный мешалкой, загружали соединение **25c**, нитрометан (0,064 мл, 1,174 ммоль), 1M водный раствор гидроксида натрия (0,082 мл, 0,367 ммоль) и метанол (MeOH, 5 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакцию гасили добавлением 6M водного раствора HCl (0,014 мл) и перемешивали при 0 °С в течение 15 минут. Реакционную смесь экстрагировали DCM (3 x 15 мл), органические слои объединяли, промывали рассолом (3 x 15 мл), сушили

над  $\text{MgSO}_4$  и растворитель удаляли в вакууме с получением соединения **25d** (7,28 мг, выход 19%), который выделяли с помощью флэш-хроматографии на колонке с силикагелем и элюирования градиентом 30-100%  $\text{EtOAc}$  в гексанах с последующим элюированием градиентом 0-40%  $\text{MeOH}$  в  $\text{DCM}$ . Аналитическая UPLC-MS (способ 2): Время удерживания=1,78 мин,  $m/z$  (ES-) (M-H) $^-$ : 260,02 (теоретическое); 260,04 (наблюдаемое).

*Синтез (E)-N-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додэкаоксагептатриаконтан-37-ил)-4-(2-нитровинил)-3-(трифторметил)бензамида (25)*

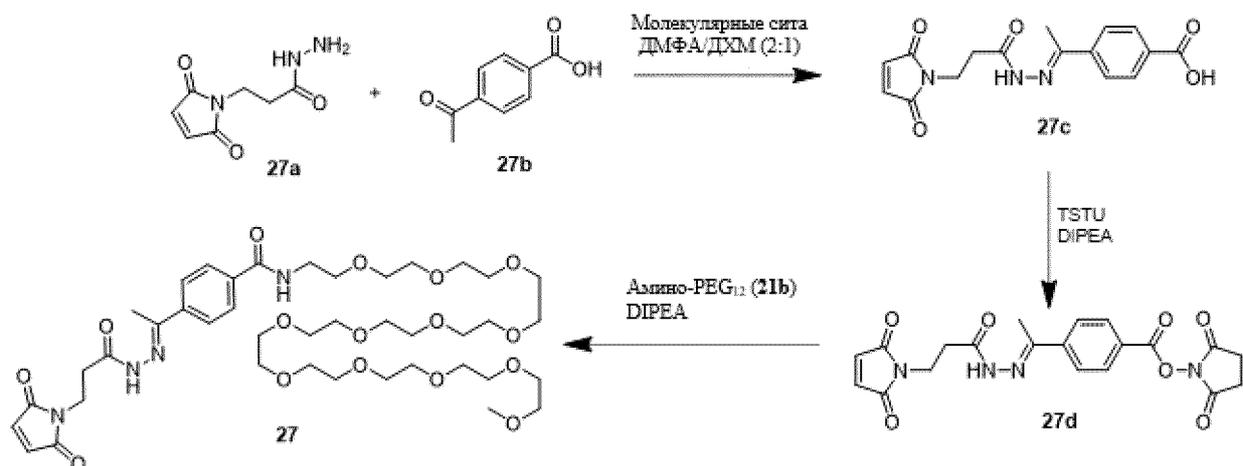
Во флакон емкостью 4 мл, оснащенный мешалкой, загружали соединение **25d** (2,27 мг, 0,009 ммоль), TSTU (2,24 мг, 0,010 ммоль), DIPEA (0,005 мл, 0,026 ммоль) и безводный ДМФА (0,5 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа и растворитель удаляли в вакууме с получением соединения **25e**, которое не было выделено. Амино-PEG12 (**9b**, 5,63 мг, 0,010 ммоль), DIPEA (0,004 мл, 0,025 ммоль) и безводный ДМФА (0,5 мл) добавляли к сырому **25e** и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Растворитель удаляли в вакууме и сырой продукт очищали HPLC (метод 3) с получением соединения **25** (1,69 мг, выход 25,1%). Аналитическая UPLC-MS (метод 2): удерживание=1,75 мин,  $m/z$  (ES-) (M-H) $^-$ : 801,37 (теоретическое); 801,43 (наблюдаемое).

*Синтез (Z)-6-(2-(3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропаноил)гидразон)-N-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додэкаоксагептатриаконтан-37-ил)-6-фенилгексанамида (26)*



В стеклянный флакон емкостью 4 мл, снабженный мешалкой, загружали 2,5-диоксопирролидин-1-ил(Z)-6-(2-(3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропаноил)гидразон)-6 фенилгексаноат (**26a**, 10 мг, 0,021 ммоль), амино-PEG12 (**9b**, 9,96 мг, 0,018 ммоль), безводный ДМФА (1,0 мл) и DIPEA (0,009 мл, 0,053 ммоль). Смесь перемешивали при к. т. в течение 3 ч. Затем растворитель удаляли в вакууме и полученный остаток растворяли в  $\text{MeOH}$  (2 мл). Соединение **26** (9,46 мг, выход 58,24%) выделяли с помощью флэш-хроматографии на колонке с силикагелем и элюирования с использованием градиента 0-25%  $\text{MeOH}$  в  $\text{DCM}$ . Аналитическая UPLC-MS (способ 2): Время удерживания=1,60 мин,  $m/z$  (ЭИР+) (M+H) $^+$ : 913,50 (теоретическое); 913,76 (наблюдаемое).

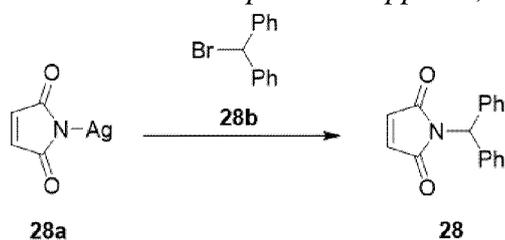
*Синтез (E)-4-(1-(2-(3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропаноил)гидразон)этил)-N-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додэкаоксагептатриаконтан-37-ил)бензамид (27)*



В стеклянный флакон емкостью 4 мл, снабженный мешалкой, загружали гидразид 3-малеимидопропионовой кислоты (**27a**, 10 мг, 0,055 ммоль), 4-ацетилбензойную кислоту (**27b**, 8,96 мг, 0,055 ммоль), молекулярные сита и 2:1 ДМФА/ДСМ (1,0 мл). Смесь перемешивали при к. т. в течение 3 ч. Затем реакционную смесь фильтровали и растворитель удаляли в вакууме с получением сырого соединения **27c**, которое использовали на последующих стадиях без дополнительной очистки. Аналитическая UPLC-MS (способ 2): Время удерживания=1,06 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(M+H)^+$ : 330,10 (теоретическое); 330,33 (наблюдаемое).

Соединение **27c** полученное выше растворяли в безводном ДМФА (1,0 мл) и к нему добавляли TSTU (14,05 мг, 0,066 ммоль) и DIPEA (0,029 мл, 0,164 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа с получением соединения **27d**, которое не было выделено. Добавляли amino-PEG<sub>12</sub> (**9b**, 36,23 мг, 0,065 ммоль) и DIPEA (0,028 мл, 0,162 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение дополнительных 2 часов. Растворитель удаляли в вакууме и полученный остаток растворяли в MeOH (2 мл). Соединение **27** (34,7 мг, выход 73,9%) выделяли с помощью флэш-хроматографии на колонке с силикагелем и элюирования с использованием градиента 0-25% MeOH в DCM. Аналитическая UPLC-MS (метод 2): время удерживания=1,33 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(M+H)^+$ , 871,45 (теоретическое); 871,58 (наблюдаемое).

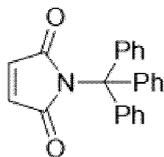
#### Синтез 1-бензгидрил-1H-тиррол-2,5-диона (**28**)



Во флакон емкостью 20 мл, снабженный мешалкой, загружали maleимид серебра (**28a**, 100 мг, 0,49 ммоль) и безводный бензол (5 мл) при комнатной температуре. Бромодифенилметан (**28b**, 121 мг, 0,49 ммоль) добавляли, и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 2 часов. Реакционной смеси давали остыть, фильтровали и растворитель удаляли в вакууме с получением сырого соединения **28**,

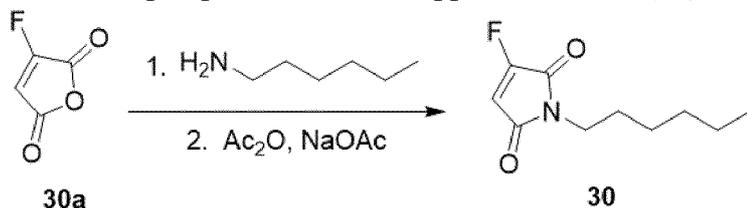
которое выделяли препаративной HPLC (метод 4) (129 мг, выход 46%). Аналитическая UPLC-MS (метод 2): время удерживания=2,05 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(M+Na)^+$ , 286,08 (теоретическое); 286,06 (наблюдаемое).

*Синтез 1-тримил-1H-пиррол-2,5-диона (29)*



Соединение **29** готовили с использованием тех же процедур, что и те, которые использовались для получения соединения **28**. (61 мг, выход 73%) Аналитическая UPLC-MS (метод 2): Время удерживания=1,48 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(M+Na)^+$ : 362,12 (теоретическое); 362,07 (наблюдаемое).

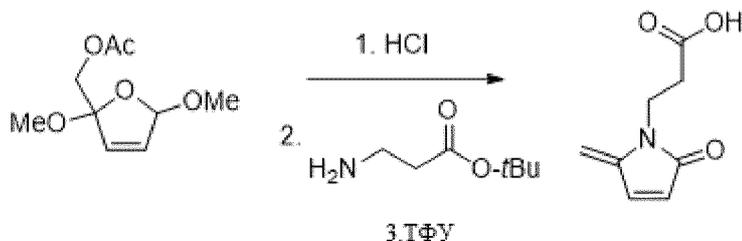
*Синтез 3-фтор-1-гексил-1H-пиррол-2,5-диона (30)*



В стеклянный флакон емкостью 4 мл, снабженный мешалкой, загружали 2-фтормалеиновую кислоту (**30a**, 15 мг, 0,13 ммоль), гексиламин (7,7 мг, 0,13 ммоль) и ледяную уксусную кислоту (1 мл). Смесь перемешивали при к. т. в течение 1 ч. Растворитель удаляли в вакууме и полученный остаток обрабатывали DCM (500 мкл), к которому добавляли холодные гексаны, что приводило к осаждению. Осадок собирали фильтрованием.

В стеклянный флакон емкостью 4 мл, снабженный мешалкой, загружали полученный выше осадок (6 мг, 0,028 ммоль), ацетат натрия (1,13 мг, 0,014 ммоль) и уксусный ангидрид (130 мкл, 1,38 ммоль). Смесь нагревали до 60 °С и перемешивали в течение 1 ч. Растворитель удаляли в вакууме и соединение **30** (5 мг, выход 82%) выделяли препаративной ВЭЖХ (способ 3). Аналитическая UPLC-MS (способ 2): Время удерживания=1,91 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(M+H)^+$ : 200,10 (теоретическое); 200,08 (наблюдаемое).

*Синтез 3-(2-метилен-5-оксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропановой кислоты. (31)*

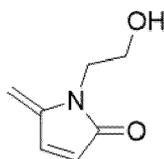


Соединение **31** синтезировали с использованием процедур, описанных в *J. Am. Chem. Soc.* 2017, 139, 6146–6151.

В стеклянный флакон емкостью 4 мл, снабженный мешалкой, загружали (2,5-диметокси-2,5-дигидрофуран-2-ил)метилацетат (100 мг, 0,5 ммоль) и 2 мл 0,1 М HCl.

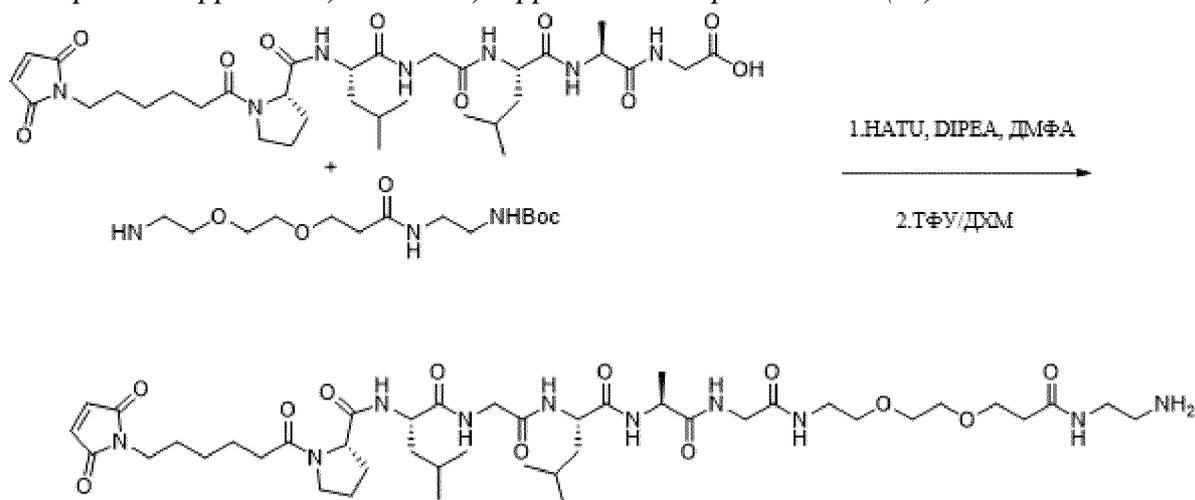
Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов и добавляли твердый  $\text{NaHCO}_3$  (16 мг, 0,2 ммоль) для нейтрализации раствора. Добавляли буфер  $\text{HEPES}$  (0,5 М, pH 7,5, 0,2 мл) и трет-бутил-3-аминопропаноат (60 мг, 0,99 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего реакционную смесь концентрировали в вакууме. Концентрированную реакционную смесь разбавляли  $\text{DCM}$  (10 мл), органический слой отделяли и промывали рассолом (2 x 10 мл). Органический слой концентрировали в вакууме, получая остаток. Этот остаток растворяли в 30% (по объему) водном растворе  $\text{TФУ}$  (1 мл) и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Растворитель удаляли в вакууме и соединение **31** (15 мг, выход 18 процентов) выделяли препаративной ВЭЖХ (способ 4). Аналитическая UPLC-MS (способ 2): время удерживания=1,25 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(\text{M}+\text{H})^+$ , 168,07 (теоретическое); 168,07 (наблюдаемое).

Синтез 1-(2-гидроксиэтил)-5-метилен-1,5-дигидро-2H-пиррол-2-она (**32**)



Соединение **32** синтезировали с использованием методик, аналогичных тем, которые использовались для получения соединения **31**, с 2-аминоэтаноном вместо трет-бутил-3-аминопропаноата (12 мг, выход 17%). Аналитическая UPLC-MS (способ 2): время удерживания=0,99 мин,  $m/z$  (ЭИР+)  $(\text{M}+\text{H})^+$ , 162,05 (теоретическое); 162,06 (наблюдаемое).

Синтез (S)-N-((18S,21S,27S)-1-амино-21-изобутил-18,29-диметил-4,14,17,20,23,26-гексаоксо-7,10-диокса-3,13,16,19,22,25-гексаазатриаконтан-27-ил)-1-(6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноил)пирролидин-2-карбоксамид (**33**)



В стеклянный флакон объемом 4 мл, снабженный мешалкой, загружали пептид, содержащий последовательность расщепления матричной металлопротеиназой (6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноил)-L-пролил-L-лейцилглицил-L-лейцил-L-аланилглицин (20 мг, 0,027 ммоль), а также HATU (10 мг, 0,027 ммоль), DIPEA (20 мкл, 0,108 ммоль) и  $\text{DMF}$  (300 мкл). Добавляли трет-бутил (2-(3-(2-(2-(12-

азанеил)этоксид)этоксид)пропанамидо)этил)карбамат (9 мг, 0,27 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Реакционную смесь затем концентрировали в вакууме и затем растворяли в 10% ТФУ в ДХМ (3 мл). Эту реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч, и концентрировали в вакууме. Полученный остаток повторно растворяли в ДМСО (2 мл) и загружали на препаративную ВЭЖХ. Продукт выделяли согласно способу 3 (11 мг, выход 44%). Аналитическая UPLC-MS (метод 1): время удерживания=1,35 мин, m/z (ЭИР+) (M+N)<sup>+</sup>, 921,54 (теоретическое); 921,97 (наблюдаемое).

### **ПРИМЕР 3**

#### **Общие процедуры прикрепления расщепляемых малеимид-содержащих фрагментов к антителам**

Полное восстановление всех межцепочечных дисульфидных связей антитела с последующим ковалентным присоединением расщепляемого фрагмента малеимидом к полученным восстановленным тиоловым группам дисульфидной связи между цепями проводили следующим образом: 12 молярных эквивалентов по отношению к антителу (или 1,5 молярных эквивалента по отношению к межцепочечным дисульфидным связям антитела) ТСЕР (трис-2-карбоксиилфосфин) или DTT (дитиотреитол) добавляли к антителу, приготовленному в 1x PBS, pH 7,4, с 5 mM ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота). Раствор инкубировали при 37 °C в течение одного часа. Полное восстановление межцепочечных дисульфидных связей было подтверждено методом PLRP-MS. Избыток восстановителя удаляли путем разбавления реакционной смеси 1x PBS с 5 mM ETDA с последующей диафильтрацией с использованием низкомолекулярного (30 кДа) отсекающего фильтра. Конъюгацию с различными промежуточными малеимидными соединениями осуществляли путем добавления десяти молярных эквивалентов промежуточного малеимидного соединения по отношению к антителу к антителам с восстановленным дисульфидом, а затем инкубировали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 30 минут. Степень промежуточной загрузки малеимида определяли с помощью PLRP-MS. Избыток промежуточного соединения малеимида удаляли диафильтрацией в 1x PBS с использованием фильтра с отсечкой низкой молекулярной массы (30 кДа). pH полученной модифицированной смеси антител доводили до pH 8,0 и инкубировали при комнатной температуре в течение ночи для принудительного гидролиза сукцинимидных групп.

### **ПРИМЕР 4**

#### **Анализ стабильности сукцинимидов**

Для оценки гидролиза сукцинимидов и стабильности модифицированного антитела в плазме антитела MEF, полученные, как описано выше, инкубировали в плазме крыс в течение от 0 до 7 дней. Антитела были очищены из плазмы крыс с использованием смолы для захвата антител против человеческого антитела, восстановлены с помощью DTT и проанализированы с помощью PLRP-MS. Увеличение m/z легкой цепи антитела (LC) на 18 дальтон с пиком BPM указывает на гидролиз сукцинимидов. Стабильность BPM в

модифицированных антителах оценивали путем сравнения соотношения ВРМ и антител в каждый момент времени, измеренного с помощью PLRP-MS. Потерю ВРМ оценивали по изменению массы, возникающему в результате деконъюгации LC или HC антитела. Потерю ВРМ рассчитывали как процент от общего кол-ва оставшихся ВРМ на основе общего количества малеимида, присутствующего в момент  $t=0$ , как описано в настоящем документе.

### **Анализ стабильности антител-ВРМ с помощью капиллярного гель-электрофореза**

Степень повторного окисления дисульфида антител после высвобождения ВРМ оценивали с использованием прибора Protein Simple WES®. Антитела или модифицированные антитела к CD40, которые инкубировали в плазме крысы *in vivo* или *ex vivo*, очищали с использованием смолы IgSelect Protein A и затем анализировали с использованием системы разделения капиллярного электрофореза WES 12-230 кДа. Антитела разводили до 8 мкг/мл в трис-забуференном буфере «солевой раствор-Твин 20» (TBS-T), разделяли с помощью капиллярного электрофореза и детектировали с использованием биотинилированного фрагмента F(ab')<sub>2</sub> первичного козьего античеловеческого антитела (10 мкг/мл, Jackson ImmunoResearch) и вторичной стрептавидин-поли-HRP40 детекции (10 мкг/мл, Fitzgerald Industries).

Степень повторного окисления антител после высвобождения ВРМ изображена на **фиг. 1А-В**. После инкубации конъюгатов Ab-ВРМ в плазме крыс и деконъюгации ВРМ наблюдалось увеличение плотности полос для HC+LC антитела и полного антитела по сравнению с  $t=0$ . Для анти-CD40-AF-12 (**фиг. 1А**) увеличение количества видов HC+LC наблюдалось через 24 и 48 часов, что указывает только на частичную деконъюгацию ВРМ и восстановление межцепочечных дисульфидов антитела. Для анти-CD40-AF-1 (**фиг. 1В**) более полная деконъюгация ВРМ приводила к образованию интактного антитела в моменты времени 24 и 48 часов.

### **ПРИМЕР 5**

#### ***Анализы in vitro***

*Анализ конкурентного связывания CD16a. Измерение параметров кинетического связывания ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$  и  $K_D$ ) с использованием биослойной интерферометрии.*

Кинетические анализы связывания проводили с использованием прибора ForteBio Octet RED384. Рекомбинантные мономерные белки Fc hCD16 158V получали с использованием временной экспрессии в клетках яичника китайского хомячка (CHO). Белок hCD16 инкубировали с N-гидроксисукцинимидобиотином (NHS-биотин) в соотношении 1:1 (моль/моль) в течение 1 часа при комнатной температуре в 1x PBS, pH 8 для введения биотиновых групп. Биотинилированный белок hCD16 наносили на наконечники SAX (стрептавидин высокой чувствительности) при плотности загрузки 0,8 нМ. Измерения аффинности проводили в кинетическом буфере, содержащем 1x PBS, 0,1% BSA, 0,02% Tween20, с pH 7,4. Измерения ассоциации проводились в течение 300 секунд, а измерения диссоциации - в течение 600 секунд. Из каждой кривой вычитали эталон и

моделировали с использованием глобальной аппроксимации 1:1. Результаты  $K_D$  представлены как  $k_{off}$  деленная на  $k_{on}$ .

Кинетику связывания антител, модифицированных различными ВРМ (например, 2-8), с человеческими Fc-рецепторами (FcγRI, FcγRIIa H131, FcγRIIa R131, FcγRIIa F158 и FcγRIIa V158) оценивали с помощью BLI (биослойной интерферометрии) с использованием инструментов ForteBio Octet RED384 и HTX. Биотинилированные слитые белки человеческий FcγR-мономерным, меченный авидином Fc N297A LALA-PG и мономерный FcRN Fc N297A ИИИ (сконструированные и экспрессированные в Seagen) загружали на высокоточные стрептавидиновые биосенсоры (ForteBio) до тех пор, пока не достигались ответы в диапазоне 0,3-1 нМ, с последующей 100-секундной проверкой датчика в буфере А (0,1% BSA, 0,02% Tween20, 1x PBS, pH 7,4). После еще одного исходного уровня титрованные антитела ассоциировали в течение 600, 10, 100, 50 и 10 секунд и диссоциировали в течение 1000, 50, 100, 500 и 50 секунд в буфере В (1% казеина, 0,2% Tween20, 1x PBS, pH 7,4) для FcγRI, IIa, IIIa, FcRn pH 6 и FcRn соответственно. Перед анализом из каждой кривой образца вычитали соответствующую эталонную кривую. Все сенсорограммы были обработаны с выравниванием по оси Y в конце второй базовой линии и коррекцией межэтапной диссоциации. Для аппроксимации кривых использовалась глобальная модель изотермы Ленгмюра 1:1.

Данные связывания, полученные с помощью BLI, представленные в таблицах 1 и 3, демонстрируют, что введение ВРМ с увеличением длины или объема PEG приводит к все более ослабленному связыванию со всеми Fc-гамма-рецепторами с небольшим влиянием на связывание FcRn. Кроме того, насыщающее связывание с клетками СНО, экспрессирующими человеческий FcγRIIa, демонстрирует, что конъюгация ВРМ ослабляет связывание FcγRIIa. Конъюгация **1** с анти-TIGIT-AF приводит к связыванию, аналогичному связыванию с анти-TIGIT-WT, тогда как конъюгация **12** с анти-TIGIT-AF ослабляет связывание аналогично точечным аминокислотным мутациям Fc, предназначенным для минимизации связывания антитела с FcγR (анти-TIGIT-null Fc) (фиг. 4).

**ТАБЛИЦА 1.** Аффинность связывания антител и антител, модифицированных PEG-ВРМ с 8 нагрузками, с FcγRIIa, измеренная методом биослойной интерферометрии.

| Пример                              | Длина PEG           | $K_D$ (нМ) |
|-------------------------------------|---------------------|------------|
| Анти-CD40-AF<br>(афукозилированное) | --                  | 11         |
| Анти-CD40-AF-NEM                    | --                  | 53         |
| Анти-CD40-AF-17                     | (PEG4) <sub>2</sub> | 75         |
| Анти-CD40-AF-14                     | PEG8                | 169        |
| Анти-CD40-AF-12                     | PEG12               | 197        |
| Анти-CD40-WT                        | --                  | 232        |
| Анти-CD40-AF-15                     | PEG24               | 234        |
| Анти-CD40-AF-16                     | PEG36               | 776        |
| Анти-CD40-AF-10                     | PEG48               | 665        |

|                 |                           |     |
|-----------------|---------------------------|-----|
| Анти-CD40-AF-19 | PEG4-(PEG8) <sub>3</sub>  | 913 |
| Анти-CD40-AF-20 | PEG4-(PEG24) <sub>3</sub> | >>1 |

**ТАБЛИЦА 2.** Значения EC<sub>50</sub> in vitro (мкг/мл) антител и модифицированных антител с 8-загрузкой к FcγRIa, FcγRIIa и FcγRIIIa с помощью анализа активности NFAT.

| Пример          | FcγRIa | FcγRIIa | FcγRIIIa |
|-----------------|--------|---------|----------|
| Анти-CD40-WT    | 0,09   | 0,08    | 0,16     |
| Анти-CD40-AF    | 0,07   | 0,09    | 0,05     |
| Анти-CD40-AF-9  | 0,35   | 14,31   | 0,22     |
| Анти-CD40-AF-10 | 3,73   | 227,47  | 2,09     |

**ТАБЛИЦА 3.** Значения аффинности связывания антител и модифицированных антител с 8 нагрузками к FcγRIIIa, измеренные методом биослойной интерферометрии.

| Пример            | FcγRIa<br>(нМ) | FcγRIIa<br>H131<br>(мкМ) | FcγRIIa<br>R131<br>(мкМ) | FcγRIIb<br>(мкМ) | FcγRIIIa<br>F158<br>(нМ) | FcγRIIIa<br>V158<br>(нМ) | FcRn<br>pH 6<br>(нМ) | FcRn<br>pH7.4<br>(мкМ) |
|-------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|
| Анти-CD40-AF      | 0,57           | 8,8                      | 6,8                      | 24               | 390                      | 75                       | 24                   | 2                      |
| Анти-CD40-AF-1(2) | 0,65           | 8,0                      | 7,0                      | 21               | 370                      | 85                       | 25                   | 25                     |
| Анти-CD40-AF-9(2) | 0,49           | 9,9                      | 9,8                      | 19               | 640                      | 140                      | 27                   | 9,6                    |
| Анти-CD40-AF-1(4) | 0,62           | 8,7                      | 7,7                      | 22               | 540                      | 130                      | 26                   | 10                     |
| Анти-CD40-AF-9(4) | 0,9            | 19                       | 13                       | 64               | 1400                     | 360                      | 26                   | 13                     |
| Анти-CD40-AF-1(6) | 1,4            | 15                       | 15                       | 25               | 970                      | 220                      | 29                   | 10                     |
| Анти-CD40-AF-9(6) | 1,7            | 27                       | 21                       | 97               | 2600                     | 710                      | 28                   | 11                     |
| Анти-CD40-AF      | 3,8            | 25                       | 27                       | >100             | 6500                     | 2500                     | 31                   | 9                      |

|                   |     |    |    |      |      |      |    |    |
|-------------------|-----|----|----|------|------|------|----|----|
| -1(8)             |     |    |    |      |      |      |    |    |
| Анти-CD40-AF-9(8) | 1,5 | 21 | 18 | >100 | 5800 | 2800 | 32 | 11 |
| Анти-CD40-AF-NEM  | 1,2 | 24 | 22 | 56   | 3900 | 1300 | 28 | 15 |

Анти-CD40-AF-1=Анти-CD40-AF, конъюгированное с соединением 1, дисульфид-PEG12

Анти-CD40-AF-9=Анти-CD40-AF, конъюгированное с соединением 9, малеимидопропионил-PEG12.

#### *Стимуляция цитокинов PBMC*

Замороженные человеческие PBMC, полученные от Astarte Biologics, инкубировали с возрастающими концентрациями анти-CD40-WT, анти-CD40-AF или модифицированными антителами анти-CD40-AF в 96-луночном планшете для тканевых культур в течение 6-24 часов при 37 °С в 8% CO<sub>2</sub>. Затем PBMC центрифугировали с помощью адаптера для планшетов при 800 об/мин в течение 5 минут. Супернатант тканевой культуры удаляли и переносили в штатив для пробирок с 96 полосками, а образцы замораживали при -80 °С до дальнейшей обработки.

Продуцирование цитокинов контролировали с использованием набора Luminesx Multiplex Kit от Millipore (HCYTOMAG-60K). Образцы супернатанта тканевой культуры и сыворотки обрабатывали в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, аналитические планшеты промывали 200 мкл промывочного буфера на лунку с последующим добавлением 25 мкл стандарта или буфера, 25 мкл матрицы или образца и 25 мкл мультиплексированных анализируемых шариков в каждую лунку. Образцы инкубировали в течение ночи при энергичном встряхивании с использованием орбитального шейкера при 4 °С. Планшеты для анализа дважды промывали промывочным буфером. В каждую лунку добавляли 25 мкл раствора, содержащего детектирующие антитела, и планшеты для анализа инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После этого добавляли 25 мкл раствора, содержащего стрептавидин-фикоэритрин (SA-PE), и планшеты для анализа инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Планшеты дважды промывали промывочным буфером и гранулы ресуспендировали в 150 мкл проточной жидкости. Образцы анализировали с помощью систем Luminesx MagPlex с использованием программного обеспечения XComponent. Уровни цитокинов измеряли по стандартной кривой, полученной в каждом эксперименте.

**На фиг. 5A-D** обобщены цитокиновые ответы, возникающие в результате инкубации анти-CD40-WT, Ab-AF, Ab-AF-NEM, анти-CD40-AF-12, анти-CD40-AF-19 и IgG1k человека изотипического контроля с PBMC человека в течение 6 часов. Анти-CD40-

AF приводит к увеличению продукции IP10 (**фиг. 5A**), MIP-1 $\beta$  (**фиг. 5B**), TNF $\alpha$  (**фиг. 5C**) и MIP-1 $\alpha$  (**фиг. 5D**) по сравнению с анти-CD40-WT. Конъюгация BPM 12 или 19 с анти-CD40-AF снижает выработку IP10, MIP-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и MIP-1 $\alpha$  до уровней, аналогичных анти-CD40-WT.

#### *Анализ передачи сигналов CD16a NFAT*

Клетки-мишени WIL2-S разводили до плотности  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл в предварительно нагретой культуральной среде RPMI 1640, содержащей 4% FBS с супернизким содержанием IgG, и 25 мкл клеток помещали в каждую лунку 96-луночного планшета. К клеткам WIL2-S добавляли серийные разведения антитела или модифицированного антитела (25 мкл на лунку) и планшеты встряхивали при комнатной температуре со скоростью 300 об/мин в течение приблизительно 5 минут на орбитальном шейкере. В течение этого времени клетки Jurkat NFAT CD16a (Fc $\gamma$ RIIIa) суспендировали в среде с низким содержанием IgG до плотности  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл. Затем в каждую лунку планшета переносили 25 мкл суспензии, содержащей эффекторные клетки Jurkat NFAT, и образцы инкубировали при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 4-24 часов. После этого в каждую лунку добавляли 75 мкл реагента для анализа люциферазы Bio-Glo и измеряли люминесценцию с использованием мультиметочного планшет-ридера Envision.

**На фиг. 2** показано влияние фрагментов BPM с различной длиной или объемом PEG на передачу сигнала антителами к CD40-AF в анализе передачи сигнала Fc $\gamma$ RIIIa NFAT. Конъюгаты сравнивали с анти-CD40-WT, анти-CD40-AF и антителами изотипического контроля hIgG1k. Конъюгаты с нарушенным связыванием Fc $\gamma$ RIIIa продемонстрировали минимальную передачу сигнала, аналогичную анти-CD40-WT, и передача сигнала была дополнительно нарушена, что согласуется с измеренной аффинностью Fc $\gamma$ RIIIa.

**На фиг. 3A-B** показано влияние конъюгации BPM 1 или 12 с анти-CD40-AF в анализе передачи сигналов Fc $\gamma$ RIIIa NFAT до и после инкубации в плазме крыс в течение до 48 часов. Конъюгаты BPM сравнивали с анти-CD40-WT, анти-CD40-AF и антителами изотипического контроля hIgG1k. В момент времени 0 как анти-CD40-AF-1, так и анти-CD40-AF-12 демонстрируют ограниченную передачу сигналов через Fc $\gamma$ RIIIa, аналогично анти-CD40-WT. В течение 48 часов, когда происходит деконъюгация BPM, передача сигналов увеличивается. Передача сигнала анти-CD40-AF-1 через 24-48 часов сравнима с передачей сигнала анти-CD40-AF. Между тем, передача сигнала анти-CD40-AF-12 через 48 часов все еще снижается по сравнению с анти-CD40-AF из-за неполной деконъюгации и восстановления межцепочечных дисульфидных связей антитела. **На фиг. 3C** показано влияние конъюгации BPM 12 с анти-BCMA-AF в анализе передачи сигналов Fc $\gamma$ RIIIa NFAT до и после инкубации в плазме крыс в течение до 5 дней. Анти-BCMA-AF-12 сравнивали с анти-BCMA-WT, анти-BCMA-AF и антителами изотипического контроля hIgG1k. В момент времени 0 анти-BCMA-AF-12 демонстрируют ограниченную передачу сигналов через Fc $\gamma$ RIIIa, аналогично анти-BCMA-WT. В течение инкубации, когда происходит деконъюгация BPM, передача сигналов увеличивается. В более поздние моменты времени (2-5 дней) степень передачи сигналов анти-BCMA-AF-12 аналогична по величине таковой

для анти-BCMA-AF, хотя и с более низкой  $EC_{50}$ , что, вероятно, указывает на то, что некоторые группы ВРМ сохраняются на межпочечных дисульфидных цистеиновых остатках антитела.

**На фиг. 8А** показано влияние частичной конъюгации ВРМ с анти-CD40-AF и ее влияние на передачу сигналов в анализе FcγRIIIa NFAT. Анти-CD40-AF конъюгировали с ВРМ 1 для получения конъюгатов с частичной нагрузкой, несущих 2, 4 или 6 ВРМ на антитело. Эти конъюгаты сравнивали с контрольными антителами к CD40-AF и к CD40-WT в анализе передачи сигналов FcγRIIIa NFAT. Этот эксперимент продемонстрировал, что полная конъюгация ВРМ 1 необходима для устранения связывания и передачи сигнала FcγRIIIa, а также указывает на то, что только минимальная деконъюгация ВРМ 1 потребуется *in vivo* для восстановления связывания антитела с FcγRIIIa. **На фиг. 8В** показано, что анти-CD40-AF конъюгировали с ВРМ 12 для получения конъюгатов с частичной нагрузкой, несущих 2, 4, 5, 6, 7 и 7,5 ВРМ на антитело. Эти конъюгаты сравнивали с контрольными антителами к CD40-AF и к CD40-WT в анализе передачи сигналов FcγRIIIa NFAT. Этот эксперимент продемонстрировал, что конъюгаты с частотой по меньшей мере 6 ударов в минуту на антитело имели минимальное связывание и передачу сигнала, тогда как конъюгаты, несущие менее 5 ударов в минуту на антитело, начинают вызывать передачу сигнала.

**На фиг. 9А** показано влияние ВРМ 12 на передачу сигналов антитела обинитузумаб-AF в анализе передачи сигналов FcγRIIIa NFAT. Конъюгаты сравнивали с обинитузумабом-WT, обинитузумабом-AF и антителами изотипического контроля hIgG1k. Обинитузумаб-AF-12 демонстрировал взаимодействие и передачу сигналов FcγRIIIa, которые были уменьшены по сравнению с обинитузумабом-WT. **На фиг. 9В** показано влияние ВРМ 12 на передачу сигнала антителом ритуксимаб-AF в анализе передачи сигнала FcγRIIIa NFAT. Конъюгаты сравнивали с ритуксимабом-WT, ритуксимабом-AF и антителами изотипического контроля hIgG1k. Ритуксимаб-AF-12 демонстрировал взаимодействие и передачу сигналов FcγRIIIa, которые были уменьшены по сравнению с ритуксимабом-WT.

**На фиг. 6** показан цитокиновый ответ, который возникает в результате введения *in vivo* анти-CD40-AF-9, анти-CD40-AF-10 и анти-CD40-AF-12 мышам с человеческим трансгенным рецептором к анти-CD40. Эти конъюгаты сравнивали с анти-CD40-WT, анти-CD40-AF и необработанным контролем, а образцы плазмы брали через 2, 6, 24, 48 и 72 часа. Конъюгаты демонстрировали аналогичные профили высвобождения цитокинов, что и анти-CD40-WT, и уровни цитокинов снижались в соответствии с измеренной активностью FcγRIIIa. Отсроченного ответа не наблюдалось, несмотря на восстановление связывания FcγR с течением времени.

**На фиг. 7** показан цитокиновый ответ, который возникает в результате введения *in vivo* анти-CD40-AF-1, анти-CD40-AF-2 и анти-CD40-AF-9 мышам с человеческим трансгенным рецептором к анти-CD40. Эти конъюгаты сравнивали с анти-CD40-WT, анти-CD40-AF и необработанным контролем, а образцы плазмы брали через 2, 6, 24 и 48 часа. Конъюгаты демонстрировали аналогичные профили высвобождения цитокинов, что и анти-

CD40-WT, и снижали уровни цитокинов, как и анти-CD40-AF. Отсроченного ответа не наблюдалось, несмотря на восстановление связывания FcγR с течением времени.

**Оценка антител, конъюгированных с ВРМ, на моделях опухолей мышей:**

Мышиные раковые клетки толстой кишки (100 000 клеток СТ26WT) имплантировали подкожно мышам Balb/c. Мышей рандомизировали на группы, каждая из которых имела размер опухоли в среднем примерно 50 мм<sup>3</sup>. Затем мышам вводили внутрибрюшинные инъекции анти-TIGIT-WT, анти-TIGIT-AF, анти-TIGIT-null Fc, анти-TIGIT-AF-1 или анти-TIGIT-AF-12 каждые три дня в общей сложности три дозы. За мышами наблюдали до тех пор, пока объем имплантированных опухолей не достигал 500 мм<sup>3</sup>, после чего их умерщвляли.

Клетки мышинной В-клеточной лимфомы (5000000 клеток A20) имплантировали подкожно мышам Balb/c с человеческим трансгенным рецептором, связывающимся с анти-CD40. Мышей рандомизировали на группы, каждая из которых имела размер опухоли в среднем примерно 50 мм<sup>3</sup>. Затем мышам вводили внутрибрюшинные инъекции анти-CD40-WT, анти-CD40-AF, анти-CD40-AF-1, анти-CD40-AF-9 или анти-CD40-AF-12 каждые три дня в общей сложности три дозы. За мышами наблюдали до тех пор, пока объем имплантированных опухолей не достигал 1000 мм<sup>3</sup>, после чего их умерщвляли.

**На фиг. 10** показан рост опухоли или замедленный рост в результате введения *in vivo* анти-TIGIT-WT, анти-TIGIT-AF, анти-TIGIT-null Fc, анти-TIGIT-AF-1 или анти-TIGIT-AF-12. Мыши, обработанные анти-TIGIT-AF-1 или анти-TIGIT-AF-12, продемонстрировали значительное улучшение выживаемости по сравнению с анти-TIGIT-null Fc и такую же задержку развития опухоли, как и исходное анти-TIGIT-AF. **На фиг. 11S** показан рост опухоли или замедленный рост в результате введения *in vivo* анти-CD40-WT, анти-CD40-AF, анти-CD40-AF-1, анти-CD40-AF-9 или анти-CD40-AF-12. Мыши, получавшие анти-CD40-AF-12, продемонстрировали значительное преимущество в выживаемости по сравнению с анти-CD40-AF, а анти-CD40-AF-1 показало такую же задержку роста опухоли, как и анти-CD40-AF. Анти-CD40-AF-9, стабильный принудительно гидролизированный конъюгат, показал такую же эффективность, как и анти-CD40-WT.

**ПРИМЕР 6**

**Скорость расщепления антитела MEF ВРМ и активность CD16a**

Этот пример охватывает анализ связывания FcγIIIa с антителом, содержащим функционализацию ПЭГилированного олигопептида. Афукозилированные антитела к HER2 получали с использованием ВРМ, содержащего олигопептид-PEG (соединение **33**), расщепленного аналога соединения **33** или без функционализаций, а затем использовали для анализа активности FcγRIIIa, как описано в **ПРИМЕРЕ 5**. Результаты этих анализов приведены в **фиг. 12**. Также были исследованы не-ВРМ-функционализированные фукозилированные и афукозилированные антитела. В то время как афукозилированное антитело, не функционализированное ВРМ, проявляло самую высокую активность при всех дозах, активность антител, функционализированных ВРМ и расщепленных ВРМ-

функционализированных антител, демонстрировала сходные зависимости «доза-ответ».

### **ПРИМЕР 7**

#### **Фармакокинетические профили ПЭГилированного антитела**

В этом примере фармакокинетические профили были проанализированы после введения однократной внутривенной дозы конъюгатов ПЭГИЛИРОВАННЫХ антител крысам Sprague Dawley. Плазму собирали и анализировали на общее количество антител (gTAб) с помощью иммуноанализа и ЖХМС/МС, а также на соотношение ВРМ-антитела.

#### *Общие измерения общего количества антител*

Тотальный человеческий IgG выявляли в плазме с помощью платформы Gyrolab (Gyros AB, Швеция). Стандарты анализа и образцы контроля качества (QC) готовили с использованием дозированного тестируемого образца, разведенного в объединенной плазме самок крыс Sprague Dawley. Стандарты, контроль качества и исследуемые образцы разводили в буфере Rxxip (Gyros AB, Швеция). Вкратце, биотинилированный мышинный античеловеческий IgG был захвачен на шариках, покрытых стрептавидином, внутри Gyrolab Bioaffy CD. После захвата человеческий IgG был обнаружен с помощью Alexa Fluor 647 (Thermo Scientific), меченного козьим античеловеческим IgG. Сигнал флуоресценции (в единицах отклика) считывали при настройке фотоумножителя (PMT) 1%. Неизвестные концентрации проб определяли путем интерполяции по стандартной кривой с помощью 5-параметрической логистической функции, взвешенной  $1/y^2$ , с использованием программного обеспечения Gyrolab Evaluator (версия 3.6.2.30). Динамический диапазон анализа составляет 22,9 нг/мл - 10 000 нг/мл в чистой плазме.

#### *Измерение соотношения лекарственное средство-антитело*

Для непосредственного измерения соотношения лекарственного средства к антителу (DAR) анти-CD40-SEA-МСPEG12, введенного крысам, образцы плазмы *in vivo* подвергали иммуноаффинному обогащению с использованием биотинилированных антиидиотипических антител, конъюгированных с парамагнитными шариками. В этих анализах DAR определяли как отношение расщепляемых фрагментов PEG к антителам. Анализ был оптимизирован для улавливания 70 мкг анти-CD40-SEA-МСPEG12 из плазмы крыс Sprague Dawley, разведенных 1:5 в PBS-T. Разведения плазмы определяли на основе анализа gTAб. Иммунозахваченный ADC элюировали из конъюгированных шариков с использованием буфера на основе глицина с последующим подщелачиванием до pH 8,0 с использованием Трис (трис-гидроксиметиламинометана) перед дегликозилированием PNGазой F. Затем ADC заменяли буфером на 50 мМ ацетат аммония для последующего анализа интактного белка методом nSEC-MS (эксклюзионная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием). Необработанные файлы масс-спектрометрии подвергались деконволюции с использованием специального протокола в автоматизированном программном обеспечении для получения профиля нагрузки PEG в каждый момент времени исследования, который использовался для расчета соотношения лекарственного средства и антитела.

**На фиг. 13** обобщены результаты анализа DAR, а во вставленной таблице

представлены расчетные значения DAR для плазмы, собранной через 0,042, 0,25, 1, 3, 5 и 8 дней после инъекции. Как видно из графика, DAR следовал экспоненциальному затуханию во времени. Через 0,042 дня (приблизительно 1 час) после инъекции DAR близок к 8, что указывает на то, что большинство из 8 доступных тиолов были связаны с линкерами ПЭГ. Через 1 день DAR составил 6,05, что указывает на то, что приблизительно 3 из 4 тиолов оставались связанными со звеньями PEG. DAR 3,88 и 3,17 на 5-й и 8-й дни указывают на то, что антитела сохранили частичное ПЭГилирование и, следовательно, вероятно, также продемонстрировали сниженные эффекторные функции. Эти результаты демонстрируют, что антитела MEF могут быть настроены на отсроченные и зависящие от времени эффекторные функции.

Затем влияние времени инкубации антитела исследовали с помощью анализа передачи сигнала CD16a NFAT с функционализированным PEG12 антителом. Анализы проводили в соответствии с примером 5. Антитела собирали через 1-192 часа после введения крысам и вводили в совместную культуру An1-положительных клеток-мишеней WIL2-S и репортерных клеток Jurkat FcγRIIIa NFAT для проверки воздействия на деконъюгацию PEG и эффекторную функцию.

Результаты анализов представлены на **фиг. 14**, где данные представляют в среднем 3 животных на каждый момент времени, и каждую концентрацию и контроль (анти-CD40-IgG, анти-CD40-SEA, изотип IgG1) анализируют в двух экземплярах. Как можно видеть на **фиг. 14**, активность антитела PEG12 увеличивалась со временем инкубации, проявляя примерно 1/6 от максимальной активности после 1 часа инкубации, чем через 192 часа. Активность увеличивалась между каждым временем сбора (1 час, 6 часов, 24 часа, 72 часа, 120 часов и 192 часа). Более низкая максимальная активность функционализированного PEG12 антитела по сравнению с контрольным антителом анти-CD40-SEA позволяет предположить, что функционализированное PEG12 антитело могло восстановить лишь частичную активность после 192 часов инкубации и что антитело может продолжать увеличивать активность после 192 часов. Полумаксимальная эффективная концентрация оставалась практически постоянной в течение тестируемого диапазона времени инкубации.

### **ПРИМЕР 8**

#### **Влияние мутации антител и ПЭГилирования на связывание FcγR**

Этот пример охватывает влияние мутаций антител и ПЭГилирования на активность эффекторной функции, генерируемую с помощью анализов CD16a NFAT с использованием дикого типа и FcγRIIIa V158. Для этих анализов белки Fc-рецептора были прочно связаны с датчиками SAX, используемыми для интерферометрических измерений. Биотинилированные рекомбинантные белки Fc-рецептора человека, содержащие либо C-концевые Avi-, либо мономерные Fc-метки (производимые Seagen), разводили в буфере для иммобилизации (0,1% BSA+0,02% Tween20, 1x PBS, pH 7,4) и загружали на биосенсоры SAX (стрептавидин) (ForteBio) с оптимизированными условиями (**таблицы 4 и 5**). После быстрого базового уровня в буфере для иммобилизации, чтобы убедиться, что рекомбинантные белки Fc-рецептора прочно связаны с сенсорами SAX, второй базовый

уровень в кинетическом буфере (1% казеин+0,2% Tween20, 1x PBS pH 7,4 для всех взаимодействий huFcγR и 1% BSA+0,2% Tween20, фосфат-цитрат pH 6,0 для взаимодействий huFcRN).

Серийным разведениям нескольких MEF и вариантов антител с комбинациями модификаций S239D, A330L, I332E и PEG BPM позволяли связываться с рекомбинантным белком, иммобилизованным на биосенсорах, до тех пор, пока максимальная концентрация тестируемых образцов не достигла равновесия с рекомбинантным белком. Значения EC<sub>50</sub> CD16a NFAT для различных антител обобщены в таблице 4, а значения K<sub>D</sub> и k<sub>d</sub> CD16a V158 приведены в таблице 5. Наконец, биосенсоры инкубировали в кинетическом буфере, чтобы обеспечить диссоциацию антител. Сенсорограммы, фиксирующие ассоциацию и диссоциацию антитела из рекомбинантного белка, получали при 30°C на системе Octet HTX (ForteBio). Эталонные биосенсоры с иммобилизованным рекомбинантным белком измерялись в отсутствие тестируемого образца. Биосенсоры отрицательного контроля без иммобилизованного рекомбинантного белка оценивали с использованием тестируемых образцов в концентрации 20 мкМ для проверки отсутствия неспецифического связывания тестируемых образцов с самими биосенсорами SAX.

Результаты связывания обобщены на **фиг. 15A-D** и **ТАБЛИЦАХ 4-8**. В этих таблицах и фигурах «SEA» обозначает афукозилирование, а «mcPEG12(8)» и «mcPEG12(10)» обозначают функционализацию BPM. Как показано в **ТАБЛИЦЕ 4**, хотя функционализованные BPM антитела, не имеющие модификаций, усиливающих эффекторную функцию (например, афукозилирование, мутации S239D и т. д.), демонстрировали значения EC<sub>50</sub> FcγRIIIa в диапазоне мкг/мл, антитела с BPM и модификациями, усиливающими эффекторную функцию, сохраняли активность FcγRIIIa, аналогичную той, что у нефункционализованного антитела (анти-HER2). Для вариантов FcγRIIIa, FcγRIIIa V158 и F158 с пониженной аффинностью связывания Fc требовались множественные модификации, усиливающие эффекторную функцию (например, анти-HER2 S239D I332E SEA-mcPEG12(10)) для того, чтобы BPM-функционализованные антитела проявляли наномолярную аффинность связывания. Хотя антитела с модификациями, усиливающими эффекторную функцию, и без них, демонстрировали одинаковое кратное снижение аффинности связывания FcγRI, FcγRIIIa и варианта FcγRIIIa при функционализации BPM, только некоторые антитела сохраняли связывание H131 FcγRIIIa при функционализации BPM.

**ТАБЛИЦА 4. Связывание антитела FcγRIIIa дикого типа**

| Аналит                    | CD16a NFAT<br>EC <sub>50</sub> (нг/мл) |
|---------------------------|--|
| Анти-HER2                 | 44,5                                   |
| Анти-HER2-mcPEG12(8)      | >2000                                  |
| Анти-HER2 SEA             | 11,8                                   |
| Анти-HER2 SEA- mcPEG12(8) | 23,6                                   |

|  |      |
|--|------|
| Анти-HER2 S239D I332E                        | 1,5  |
| Анти-HER2 S239D I332E- mcPEG12(10)           | 71,2 |
| Анти-HER2 S239D I332E SEA                    | 2,3  |
| Анти-HER2 S239D I332E SEA-mcPEG12(10)        | 28,1 |
| Анти-HER2 S239D A330L I332E                  | 0,7  |
| Анти-HER2 S239D A330L I332E -mcPEG12(10)     | 83,5 |
| Анти-HER2 S239D A330L I332E SEA              | 2,0  |
| Анти-HER2 S239D A330L I332E SEA- mcPEG12(10) | 33,0 |

**ТАБЛИЦА 5. Биослойная интерферометрия человеческого V158 FcyRIIIa**

| Аналит  | $K_D$ (М) | $K_D$ (нМ) | Кратность<br>изменения<br>$K_D$ | $k_a$ (1/(мс)) | $k_d$ (1/с) |
|---|-----------|------------|---------------------------------|----------------|-------------|
| Анти-HER2                                       | 5,7E-07   | 570        |                                 | 8,0E+04        | 4,5E-02     |
| Анти-HER2-mcPEG12(8)                            | 1,8E-05   | 18000      | 31,6                            | 1,3E+04        | 2,3E-01     |
| Анти-HER2SEA                                    | 3,7E-08   | 37         |                                 | 5,0E+05        | 1,9E-02     |
| Анти-HER2SEA- mcPEG12(8)                        | 1,2E-06   | 1200       | 32,4                            | 9,0E+04        | 1,1E-01     |
| I332E к HER2S239D                               | 4,3E-08   | 43         |                                 | 7,4E+05        | 3,2E-02     |
| Анти-HER2 S239D I332E-<br>mcPEG12(8)            | 2,8E-06   | 2800       | 65,1                            | 4,2E+04        | 1,2E-01     |
| Анти-HER2 S239D I332E SEA                       | 2,9E-09   | 2,9        |                                 | 8,0E+05        | 2,3E-03     |
| Анти-HER2 S239D I332E<br>SEA-mcPEG12(10)        | 5,3E-08   | 53         | 18,3                            | 2,2E+05        | 1,2E-02     |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E                  | 3,7E-08   | 37         |                                 | 7,5E+05        | 2,8E-02     |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E -mcPEG12(10)     | 2,9E-06   | 2900       | 78,4                            | 2,9E+04        | 8,5E-02     |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E SEA              | 2,9E-09   | 2,9        |                                 | 9,2E+05        | 2,6E-03     |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E SEA- mcPEG12(10) | 6,7E-08   | 67         | 23,1                            | 1,3E+05        | 8,8E-03     |

**ТАБЛИЦА 6. Биослойная интерферометрия человеческого F158 FcyRIIIa**

| Аналит               | $K_D$ (М) | $K_D$ (нМ) | Кратность<br>изменения<br>$K_D$ | $k_a$<br>(1/(мс)) | $k_d$ (1/с) |
|----------------------|-----------|------------|---------------------------------|-------------------|-------------|
| Анти-HER2            | 2,90E-06  | 2900,00    |                                 | 4,20E+04          | 1,20E-01    |
| Анти-HER2-mcPEG12(8) | 4,90E-05  | 49000,00   | 16,9                            | 7,80E+03          | 3,80E-01    |
| Анти-HER2 SEA        | 1,80E-07  | 180,00     |                                 | 2,90E+05          | 5,20E-02    |

|   |          |         |      |          |          |
|---|----------|---------|------|----------|----------|
| Анти-HER2 SEA-<br>mcPEG12(8)                    | 6,60E-06 | 6600,00 | 36,7 | 3,40E+04 | 2,30E-01 |
| Анти-HER2 S239D I332E                           | 1,10E-07 | 110,00  |      | 5,10E+05 | 5,60E-02 |
| Анти-HER2 S239D I332E-<br>mcPEG12(8)            | 7,70E-06 | 7700,00 | 70,0 | 1,40E+04 | 1,10E-01 |
| Анти-HER2 S239D I332E<br>SEA                    | 4,40E-09 | 4,40    |      | 7,50E+05 | 3,30E-03 |
| Анти-HER2 S239D I332E<br>SEA-mcPEG12(10)        | 1,50E-07 | 150,00  | 34,1 | 1,90E+05 | 2,90E-02 |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E                  | 9,50E-08 | 95,00   |      | 5,20E+05 | 4,90E-02 |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E -mcPEG12(10)     | 3,80E-06 | 3800,00 | 40,0 | 2,00E+04 | 7,70E-02 |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E SEA              | 2,60E-09 | 2,60    |      | 9,00E+05 | 2,40E-03 |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E SEA- mcPEG12(10) | 1,40E-07 | 140,00  | 53,8 | 1,10E+05 | 1,50E-02 |

**ТАБЛИЦА 7. Биослойная интерферометрия человеческого FcγRI**

| Аналит  | $K_D$ (М) | $K_D$ (нМ) | Кратность<br>изменения<br>$K_D$ | $k_a$ (1/(мс)) | $k_d$ (1/с)   |
|---|-----------|------------|---------------------------------|----------------|---------------|
| Анти-HER2                                       | 1,2E-09   | 1,20       |                                 | 4,10E+05       | 5,10E-04      |
| Анти-HER2-mcPEG12(8)                            | 9,0E-09   | 9,00       | 7,5                             | 2,90E+05       | 2,60E-03      |
| Анти-HER2 SEA                                   | 8,9E-10   | 0,89       |                                 | 4,30E+05       | 3,90E -<br>04 |
| Анти-HER2 SEA-<br>mcPEG12(8)                    | 7,1E-09   | 7,10       | 8,0                             | 2,70E+05       | 1,90E-03      |
| Анти-HER2 S239D I332E                           | 1,0E-10   | 0,10       |                                 | 6,50E+05       | 6,70E-05      |
| Анти-HER2 S239D I332E-<br>mcPEG12(8)            | 1,0E-09   | 1,00       | 10,0                            | 1,60E+05       | 1,60E-04      |
| Анти-HER2 S239D I332E<br>SEA                    | 1,6E-10   | 0,16       |                                 | 5,50E+05       | 8,90E-05      |
| Анти-HER2 S239D I332E<br>SEA-mcPEG12(10)        | 5,2E-10   | 0,52       | 3,3                             | 2,90E+05       | 1,50E-04      |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E                  | 1,2E-10   | 0,12       |                                 | 5,90E+05       | 6,80E-05      |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E -mcPEG12(10)     | 1,2E-09   | 1,20       | 10,0                            | 9,50E+04       | 1,10E-04      |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E SEA              | 1,1E-10   | 0,11       |                                 | 6,60E+05       | 7,40E-05      |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E SEA- mcPEG12(10) | 6,4E-10   | 0,64       | 5,8                             | 1,60E+05       | 1,00E-04      |

**ТАБЛИЦА 8. Биослойная интерферометрия человеческого FcγRIIa H131**

| Аналит  | $K_D$ (М)      | $K_D$ (нМ) | Кратность<br>изменения<br>$K_D$ | $k_a$ (1/(мс)) | $k_d$ (1/с) |
|---|----------------|------------|---------------------------------|----------------|-------------|
| Анти-HER2                                       | 1,90E-06       | 1900       |                                 | 1,70E+05       | 3,20E-01    |
| Анти-HER2-mcPEG12(8)                            | 1,30E-05       | 13000      | 6,8                             | 3,60E+04       | 4,70E-01    |
| Анти-HER2 SEA                                   | 1,50E-06       | 1500       |                                 | 1,50E+05       | 2,30E-01    |
| Анти-HER2 SEA-<br>mcPEG12(8)                    | 1,80E-05       | 18000      | 12,0                            | 2,70E+04       | 5,00E-01    |
| Анти-HER2 S239D I332E                           | 1,20E-06       | 1200       |                                 | 2,30E+05       | 2,80E-01    |
| Анти-HER2 S239D I332E-<br>mcPEG12(8)            | Без связывания |            |                                 |                |             |
| Анти-HER2 S239D I332E<br>SEA                    | 1,70E-06       | 1700       |                                 | 2,40E+05       | 3,90E-01    |
| Анти-HER2 S239D I332E<br>SEA-mcPEG12(10)        | Без связывания |            |                                 |                |             |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E                  | 2,10E-06       | 2100       |                                 | 1,90E+05       | 3,80E-01    |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E -mcPEG12(10)     | Без связывания |            |                                 |                |             |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E SEA              | 3,40E-06       |            |                                 | 1,40E+05       | 4,50E-01    |
| Анти-HER2 S239D A330L<br>I332E SEA- mcPEG12(10) | Без связывания |            |                                 |                |             |

### ПРИМЕР 9

#### Модели активности ПЭГилированных антител у яванских макаков

В этом примере антитела и конъюгаты антител вводили яванским макакам посредством однократной болюсной внутривенной инъекции в дозе 0,3 мг/кг. Степень истощения целевых В-клеток контролировали с помощью проточной цитометрии CD20+ лимфоцитов в цельной крови в назначенные моменты времени и сравнивали с исходным образцом перед введением дозы. Уровни цитокинов оценивали в плазме КЭДТА в назначенные моменты времени с использованием мультиплексного анализа цитокинов Lumiplex и сравнивали с исходным образцом перед введением дозы. Образцы плазмы анализировали на общее количество антител (TAб) с использованием иммуноанализа на основе ELISA. Результаты этих анализов обобщены на **фиг. 16-18**, причем первый день введения дозы обозначен как День 1.

На **фиг. 16** обобщены уровни MCP-1 в плазме до (ось X «Pre») и после введения неПЭГилированных (анти-CD40-SEA) и ПЭГилированных (анти-CD40-SEA-MC-PEG12) антител. В то время как неПЭГилированное антитело вызывало всплеск уровней MCP-1 (максимум приблизительно через 2 часа после введения антитела), ПЭГилированное антитело вызывало более низкие минимальные повышения MCP-1, при этом уровни MCP-1 достигали максимума приблизительно через 12 часов после введения и достигали уровня

меньшего 4% от максимальных уровней, на которые влияет неПЭГилированное антитело.

Подобные тенденции наблюдались для уровней МIP-1 $\beta$  (фиг. 19) и IL-1RA (фиг. 20) в плазме после введения 0,3 мг/кг антитела. В то время как введение афукозилированных антител, не функционализированных ВРМ, приводит к резкому повышению уровня этих цитокинов примерно через два часа после введения, введение афукозилированных антител, функционализированных ВРМ, задерживает и подавляет ответы МIP-1 $\beta$  и IL-1RA, причем максимумы для каждого цитокина не превышают уровни пг/мл. Пиковые уровни МСР-1, МIP-1 $\beta$  и IL-1RA в плазме после введения ВРМ-функционализированного и ВРМ-нефункционализированного антитела обобщены в ТАБЛИЦЕ 9.

**ТАБЛИЦА 9. Пиковые уровни цитокинов у яванских макаков после введения антител**

| Цитокин       | Анти-CD40-SEA (2 ч) | Анти-CD40-SEA-mcPEG12 (6 ч) |
|---------------|---------------------|-----------------------------|
| IL-1RA        | 19191               | 1441                        |
| МIP-1 $\beta$ | 21950               | 669                         |
| МСР-1         | 6200                | 166                         |

На фиг. 17 обобщены уровни антител после введения. НеПЭГилированное антитело демонстрировало больший клиренс в течение первого дня после введения, чем ПЭГилированное антитело.

На фиг. 18 представлено сравнение истощения В-клеток после введения антитела. Хотя как неПЭГилированные, так и ПЭГилированные антитела повлияли примерно на 80-90% истощение В-клеток в соответствующих минимумах, время истощения было отложено для ПЭГилированного антитела, при этом самый низкий уровень наблюдался приблизительно на 8-й день исследования вместо наблюдаемого почти немедленного истощения для анти-CD40-SEA.

#### **ПРИМЕР 10**

##### *Синтез афукозилированного гуманизированного антитела к CD40*

Гуманизированное антитело к CD40 с тяжелыми и легкими цепями SEQ ID NO: 890 и 891 соответственно экспрессировали в клетках CHO. Ингибитор фукозилирования, 2-фторфукоза, был включен в среду для культивирования клеток во время продукции антител и привел к отсутствию афукозилирования. Базовая среда для роста клеток не содержала фукозы, и к среде добавляли 2-фторфукозу для ингибирования фукозилирования белка. Там же. Включение фукозы в антитела измеряли с помощью LC-MS посредством хроматографии PLRP-S и ионизации электрораспылением с четырехкратным TOF MS. Там же. Данные не представлены.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), причем антитело MEF содержит модификацию, усиливающую эффекторную функцию, и модификацию, уменьшающую эффекторную функцию, причем модификация, уменьшающая эффекторную функцию, включает биосовместимый полимерный фрагмент (BPM) с ковалентным присоединением к аминокислоте или посттрансляционную модификацию антитела MEF.

2. Антитело MEF по п. 1, отличающееся тем, что модификация, снижающая эффекторную функцию, является по меньшей мере частично обратимой.

3. Антитело MEF по п. 1 или 2, отличающееся тем, что ковалентное присоединение является расщепляемым, расщепление которого по меньшей мере частично обращает модификацию, снижающую эффекторную функцию.

4. Антитело MEF по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что BPM содержит расщепляемый фрагмент, отдельно от ковалентного присоединения, расщепление которого по меньшей мере частично обращает модификацию, снижающую эффекторную функцию.

5. Антитело MEF по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что модификация, усиливающая эффекторную функцию, увеличивает аффинность связывания антитела MEF к FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb или их комбинации.

6. Антитело MEF по любому из пп. 1-5, отличающееся тем, что модификация, усиливающая эффекторную функцию, включает афукозилирование, расщепление пополам N-ацетил глюкозамина, мутацию Fc-области S298A, мутацию Fc-области E333A, мутацию Fc-области K334A, мутацию Fc-области S239D, мутацию Fc-области I332E, мутацию Fc-области G236A, мутацию Fc-области S239E, мутацию Fc-области A330L, мутацию Fc-области G236A, мутацию Fc-области L234Y, мутацию Fc-области G236W, мутацию Fc-области S296A, мутацию Fc-области F243, мутацию Fc-области R292P, мутацию Fc-области Y300L, мутацию Fc-области V305L, мутацию Fc-области P396L или их комбинацию.

7. Антитело MEF по любому из пп. 1-6, отличающееся тем, что модификация, усиливающая эффекторную функцию, включает афукозилирование.

8. Антитело MEF по любому из пп. 1-7, отличающееся тем, что аминокислота включает остаток цистеина или остаток метионина.

9. Антитело MEF по п. 8, отличающееся тем, что ковалентное присоединение к остатку цистеина включает дисульфидную связь, тиозфирную связь, тиоаллильную связь, винилтиоловую связь или их комбинацию.

10. Антитело MEF по п. 9, отличающееся тем, что дисульфидная связь, тиоаллильная связь или их комбинация являются расщепляемыми.

11. Антитело MEF по любому из пп. 8-10, отличающееся тем, что остаток метионина связывается с BPM через сульфанимин.

12. Антитело MEF по любому из пп. 1-11, отличающееся тем, что посттрансляционная модификация включает гликозилирование, нитрозилирование, фосфорилирование, цитруллинирование, сульфенилирование или их комбинацию.

13. Антитело MEF по любому из пп. 1-12, отличающееся тем, что ВРМ содержит ферментативно расщепляемый фрагмент.

14. Антитело MEF по п. 13, отличающееся тем, что ферментативно расщепляемый фрагмент включает последовательность расщепления протеазой, гликозидную группу, карбамат, мочевины, четвертичный аммоний или их комбинацию.

15. Антитело MEF по п. 13 или 14, отличающееся тем, что ферментативно расщепляемый фрагмент включает последовательность расщепления протеазой.

16. Антитело MEF по п. 15, отличающееся тем, что последовательность расщепления протеазой представляет собой последовательность расщепления протеазой, ассоциированной с опухолью.

17. Антитело MEF по п. 15 или 16, отличающееся тем, что последовательность расщепления протеазой представляет собой последовательность расщепления тромбина, катепсина, матриксной металлопротеиназы, активирующего пептида PAR-1, калликреина, гранзима, каспазы, ADAM, кальпаина, простатспецифического антигена, белка активации фибробластов, дипептидилпептидазы IV, или их комбинацию.

18. Антитело MEF по любому из пп. 2-17, отличающееся тем, что до по меньшей мере частичного обращения модификации, снижающей эффекторную функцию, антитело MEF имеет от 2% до 20% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишенного ВРМ.

19. Антитело MEF по любому из пп. 1-18, отличающееся тем, что имеет от 30% до 70% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишенного ВРМ, после 192-часовой инкубации в плазме человека при 37 °С.

20. Антитело MEF по любому из пп. 2-19, отличающееся тем, что до по меньшей мере частичного обращения модификации, снижающей эффекторную функцию, антитело MEF имеет от 2% до 20% активности связывания Fc $\gamma$ RIII эквивалентного антитела, лишенного ВРМ.

21. Антитело MEF по любому из пп. 1-20, отличающееся тем, что через 192 часа после введения антитела MEF имеет от 30% до 70% аффинности связывания Fc $\gamma$ RIII по сравнению с эквивалентным антителом, лишенным ВРМ.

22. Антитело MEF по любому из пп. 2-21, отличающееся тем, что скорость клиренса антитела MEF составляет от 25% до 200% скорости по меньшей мере частичного обращения модификации, снижающей эффекторную функцию.

23. Антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), связанное с множеством биосовместимых полимерных фрагментов (ВРМ), и Fc, которая по меньшей мере частично блокирована ВРМ, или их комбинация; при этом ВРМ из множества ВРМ присоединен к атому серы остатка цистеина посредством расщепляемого фрагмента, содержащего дисульфидную связь.

24. Антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), связанное с множеством биосовместимых полимерных фрагментов (ВРМ), и Fc, которая по меньшей мере частично блокирована ВРМ; при этом ВРМ из множества ВРМ присоединен к остатку

метионина посредством расщепляемого фрагмента.

25. Антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), содержащее по меньшей мере одну Fc-область, и связанное с множеством биосовместимых полимерных фрагментов (BPM), содержащих расщепляемые фрагменты и присутствующих в соотношении от 6 до 10 к Fc-областям по меньшей мере одной Fc-области; причем множество биосовместимых полимерных фрагментов имеют молекулярную массу от 500 до 2500 дальтон (Да); и при этом расщепляемые фрагменты имеют скорость расщепления от 0,1 до 0,5 день<sup>-1</sup> в плазме человека при 37 °С.

26. Антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), причем антитело MEF имеет 1, 2, 3 или 4 восстановленные межцепочечные дисульфидные связи и 2, 4, 6 или 8 биосовместимых полимерных фрагментов (BPM) соответственно; при этом каждый BPM ковалентно присоединен к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемый фрагмент; и при этом антитело MEF демонстрирует зависящее от времени снижение связывания FcR и, таким образом, соответствующее зависящее от времени снижение эффекторной функции по сравнению с функцией эквивалентного антитела.

27. Антитело MEF по любому из пп. 23-26, причем антитело MEF имеет от 2% до 20% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишеного BPM.

28. Антитело MEF по любому из пп. 23-27, причем антитело MEF имеет от 2% до 10% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишеного BPM.

29. Антитело MEF по любому из пп. 23-27, причем антитело MEF имеет от 30% до 70% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишеного BPM, после 192-часовой инкубации в плазме человека при 37 °С.

30. Антитело MEF по любому из пп. 23-29, причем антитело MEF имеет менее 50% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишеного BPM, после расщепления половины его BPM.

31. Антитело MEF по любому из пп. 23-30, в котором расщепляемый фрагмент имеет скорость расщепления от 100% до 500% от его физиологической скорости клиренса во время кровообращения *in vivo* у взрослого человека мужского пола.

32. Антитело MEF по любому из пп. 23-31, в котором расщепляемый фрагмент имеет скорость расщепления от 50% до 300% от его физиологической скорости клиренса во время кровообращения *in vivo* у взрослого человека мужского пола.

33. Антитело MEF по любому из пп. 23-32, в котором расщепляемый фрагмент выполнен с возможностью подвергаться вторичной реакции, которая снижает скорость его расщепления.

34. Антитело MEF по п. 33, в котором расщепляемый фрагмент включает сукцинимид, и при этом вторичная реакция включает гидролиз сукцинимида.

35. Антитело MEF по п. 33 или 34, в котором расщепляемый фрагмент выполнен с возможностью подвергаться расщеплению BPM по меньшей мере в два раза быстрее, чем вторичная реакция во время кровообращения *in vivo* у взрослого человека мужского пола.

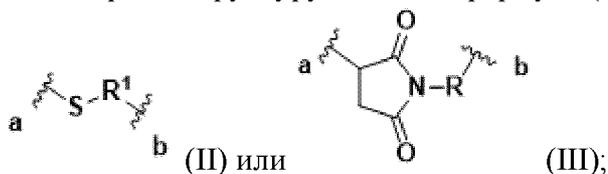
36. Антитело MEF по любому из пп. 23-35, в котором каждый расщепляемый фрагмент ковалентно присоединен к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемую дисульфидную связь или через расщепляемую тиоэфирную связь с негидролизованным сукцинимидным фрагментом.

37. Антитело MEF по п. 36, в котором негидролизованный сукцинимид способен подвергаться тиоэфирному расщеплению быстрее, чем гидролизу в плазме человека при 37 °С.

38. Антитело MEF по любому из пп. 25-36, в котором каждый расщепляемый фрагмент ковалентно присоединен к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через тиоэфирную связь с гидролизованным сукцинимидным фрагментом.

39. Антитело MEF по любому из пп. 23, 25-33 или 35-36, в котором каждый расщепляемый фрагмент ковалентно присоединен к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемую дисульфидную связь.

40. Антитело MEF по любому из пп. 23-39, в котором каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно формуле (II) или (III):



где:

$R^1$  представляет собой  $C_2-C_{12}$  алкилен, необязательно прерванный одним из  $-NH-C(=O)-$ ,  $-C(=O)NH-$ ,  $-NH-$  и  $-O-$ ;

$R$  отсутствует или представляет собой  $C_1-C_{12}$  алкилен, необязательно прерванный одним или двумя фенилами,  $-NH-C(=O)-$ ,  $-C(=O)NH-$ ,  $-NH-$ ,  $-O-$ ,  $-O-C(=O)-$ ,  $-C(=O)O-$ ,  $-S-C(=O)-$ ,  $-C(=O)S-$ ,  $-O-C(=O)O-$ ,  $-C(=NR^{1A})$ , ацеталем,  $-O(SO_2)O-$ ,  $-O-[P(=O)(-OH)]O-$ ,  $-C(=N-OH)-$ ,  $-C(=N-NH_2)-$ , и  $-C(R^{1A})=N-NH-$ ; а  $R$  необязательно замещен 1-3 заместителями, независимо выбранными из фенила, оксо и  $-CO_2R^A$ ;  $C_3-C_6$  циклоалкилена; а фенил, необязательно замещенный 1-3 независимо выбранными  $C_1-C_3$  алкокси;

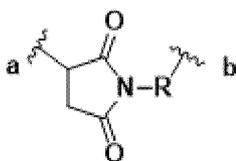
каждый  $R^A$  независимо представляет собой водород или  $C_1-C_6$  алкил;

каждый  $R^{1A}$  независимо представляет собой водород или  $C_1-C_6$  алкил;

где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к остатку цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и

$\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение к ВРМ или остатку расщепляемого фрагмента, который сохраняет ковалентное присоединение к ВРМ.

41. Антитело MEF по п. 40, в котором каждый расщепляемый фрагмент имеет структуру согласно формуле (III):

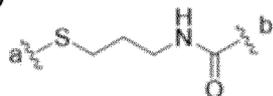


(III); и

где R представляет собой  $C_1$ - $C_{12}$  алкилен, прерванный  $-C(=N-NH_2)-$  или  $-C(R^{1A})=N-NH-$ ; или прерванный фенилом и одним из  $-C(=N-NH_2)-$  и  $-C(R^{1A})=N-NH-$ .

42. Антитело MEF по любому из пп. 23-26, 27, 39 или 40, в котором расщепляемый фрагмент содержит структуру любой из формул (IIa)-(IIi):

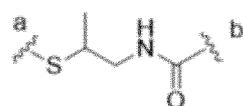
(IIa)



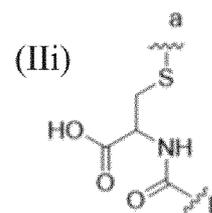
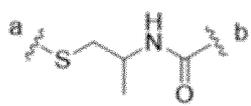
(IIe)



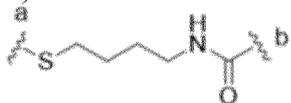
(IIb)



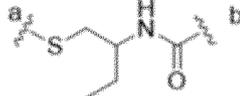
(IIf)



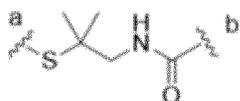
(IIc)



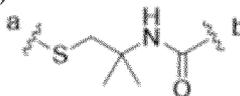
(IIg)



(II d)

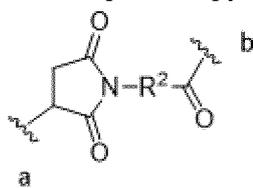


(IIh)



где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и  $\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение расщепляемого фрагмента к ВРМ.

43. Антитело MEF по любому из пп. 25-37, в котором каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно формуле (III):



(III)

где:

$R^2$  представляет собой  $C_1$ - $C_{15}$  алкил, необязательно замещенный одним или более гидроксильной группой, галогеном,  $-CN$ ,  $C_1$ - $C_6$  алкилом,  $C_1$ - $C_6$  алкенилом,  $C_1$ - $C_6$  алкинилом,  $C_1$ - $C_6$  алкоксилем,  $C_1$ - $C_6$  тиоалкокси,  $-C_1$ - $C_6$  циклоалкилом,  $-NR^3R^4$ ,  $-C(=O)-R^3$ ,  $-C(=O)-OR^5$ , PEG2-PEG72 или их комбинацией;

$R^3$  и  $R^4$  каждый независимо выбирают из группы, состоящей из H,

$\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и

$\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение расщепляемого фрагмента к

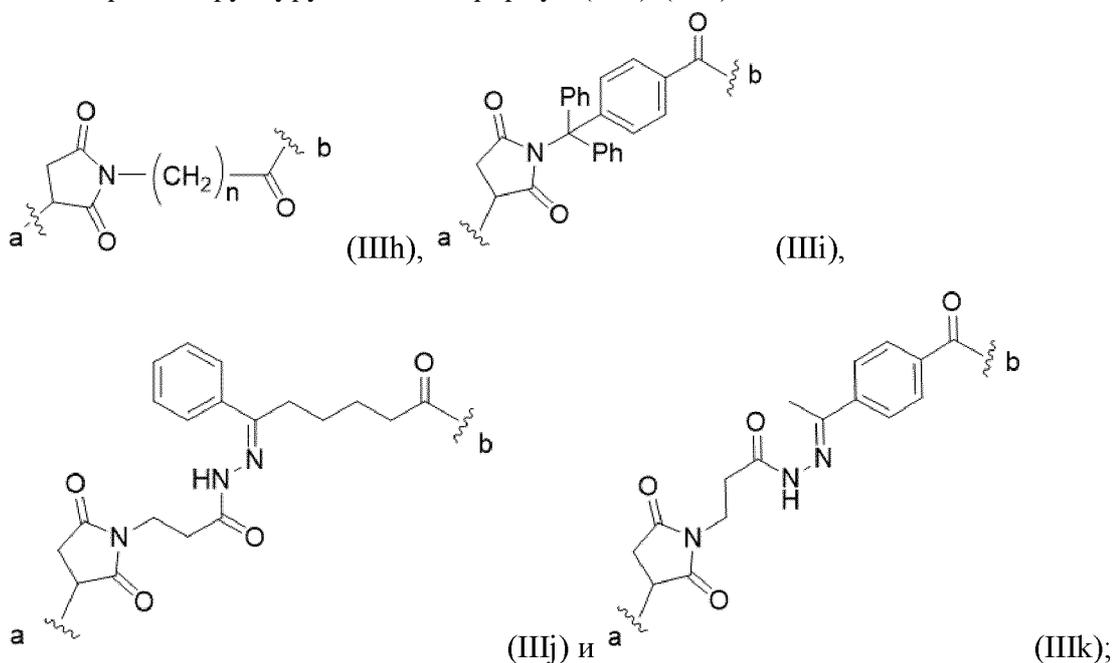
ВРМ.

44. Антитело MEF по п. 43, в котором  $R^2$  представляет собой  $C_1-C_{15}$  алкил, необязательно замещенный одним или более гидроксилем, галогеном,  $-CN$ ,  $C_1-C_6$  алкилом,  $C_1-C_6$  алкоксилем или их комбинацией.

45. Антитело MEF по п. 43 или 44, в котором  $R^2$  представляет собой  $C_1-C_{12}$  алкил, необязательно замещенный одним или более гидроксилем, галогеном,  $-CN$ ,  $C_1-C_3$  алкилом,  $C_1-C_3$  алкоксилем или их комбинацией.

46. Антитело MEF по любому из пп. 43-45, в котором  $R^2$  представляет собой  $C_1-C_{12}$  алкил, необязательно замещенный одним или более гидроксилем, галогеном или  $C_1-C_3$  алкилом.

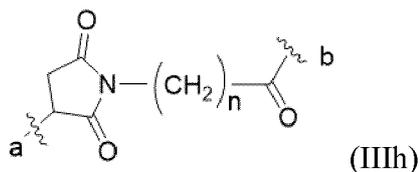
47. Антитело MEF по любому из пп. 25-37, в котором каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру любой из формул (IIIh)-(IIIk):



где индекс  $n$  представляет собой целое число от 2 до 8; и

где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и  $\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение расщепляемого фрагмента к ВРМ.

48. Антитело MEF по п. 48, в котором каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно формуле (IIIh):



где индекс  $n$  представляет собой целое число от 2 до 8; и

где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и  $\sim$  (b)

представляет собой ковалентное присоединение расщепляемого фрагмента к ВРМ.

49. Антитело MEF по любому из пп. 26-49, в котором зависящее от времени снижение связывания FcR антитела MEF характеризуется начальным снижением связывания FcR по меньшей мере от около 50% до около 90% по сравнению с эквивалентным антителом.

50. Антитело MEF по п. 49, в котором первоначальное снижение связывания FcR антитела MEF характеризуется  $K_D$ , которая примерно в 2-1000 раз выше, чем у эквивалентного антитела.

51. Антитело MEF по п. 50, в котором за первоначальным снижением связывания FcR следует восстановление связывания, которое является дополнительной характеристикой зависящего от времени снижения связывания FcR, причем восстановление коррелирует с потерей ВРМ за счет неферментативного расщепления соответствующего расщепляемого фрагмента(фрагментов) в физиологических средах.

52. Антитело MEF по п. 51, в котором физиологическая среда представляет собой плазму позвоночных.

53. Антитело MEF по п. 52, в котором каждый из расщепляемых фрагментов имеет период полужизни в плазме от около 3 часов до около 96 часов.

54. Антитело MEF по п. 51, в котором восстановление существенно восстанавливает связывание FcR с эквивалентным антителом через от около 3 часов до около 96 *in vitro*.

55. Антитело MEF по любому из пп. 1-54, причем антитело MEF является фукозилированным.

56. Антитело MEF по любому из пп. 1-55, причем антитело MEF является афукозилированным.

57. Антитело MEF по любому из пп. 1-56, причем антитело MEF представляет собой терапевтическое антитело.

58. Антитело MEF по любому из пп. 1-57, в котором каждый ВРМ представляет собой фрагмент полиэтиленгликоля, поликетальный фрагмент, полиглицериновый фрагмент, полисахаридный фрагмент, полисаркозиновый фрагмент, полипептидный фрагмент или полицвиттерионный фрагмент.

59. Антитело MEF по любому из пп. 1-58, в котором каждый ВРМ представляет собой монодисперсный фрагмент.

60. Антитело MEF по любому из пп. 1-59, в котором каждый ВРМ включает монодисперсный фрагмент полиэтиленгликоля, полиглицерина, полипептида или полисахарида.

61. Антитело MEF по любому из пп. 1-58, в котором каждый ВРМ представляет собой полидисперсный фрагмент.

62. Антитело MEF по любому из пп. 1-58 или 61, в котором каждый ВРМ включает полидисперсный фрагмент полиэтиленгликоля, полиглицерина, полипептида или полисахарида.

63. Антитело MEF по любому из пп. 1-62, в котором каждый ВРМ независимо имеет

средневесовую молекулярную массу от около 100 дальтон до около 5 000 дальтон.

64. Антитело MEF по любому из пп. 1-63, в котором каждый ВРМ независимо имеет средневесовую молекулярную массу от около 1 000 дальтон до около 3 000 дальтон.

65. Антитело MEF по любому из пп. 1-64, в котором каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 5 нм до около 25 нм.

66. Антитело MEF по любому из пп. 1-64, в котором каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 15 нм до около 25 нм.

67. Антитело MEF по любому из пп. 1-64, в котором каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 10 нм до около 20 нм.

68. Антитело MEF по любому из пп. 1-64, в котором каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 5 нм до около 15 нм.

69. Антитело MEF по любому из пп. 1-64, в котором каждый ВРМ независимо имеет гидродинамический диаметр от около 5 нм до около 10 нм.

70. Антитело MEF по любому из пп. 1-47, в котором каждый ВРМ включает монодисперсный фрагмент PEG2-PEG72.

71. Антитело MEF по п. 70, в котором каждый ВРМ включает монодисперсный фрагмент PEG8-PEG48.

72. Антитело MEF по п. 70 или 71, в котором каждый ВРМ включает монодисперсный фрагмент PEG12-PEG24.

73. Антитело MEF по любому из пп. 1-60 или 63-69, в котором каждый ВРМ включает монодисперсный разветвленный фрагмент PEG20-PEG76; и при этом каждая ветвь содержит по меньшей мере две смежные субъединицы этиленгликоля.

74. Антитело MEF по п. 73, в котором каждый монодисперсный разветвленный фрагмент PEG20-PEG76 имеет от 2 до 8 ветвей.

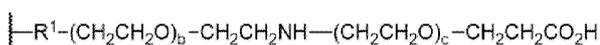
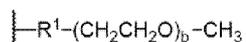
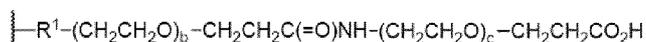
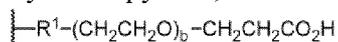
75. Антитело MEF по п. 73 или 74, в котором каждый монодисперсный разветвленный фрагмент PEG20-PEG76 имеет от 2 до 6 ветвей.

76. Антитело MEF по любому из пп. 73- 75, в котором каждый монодисперсный разветвленный фрагмент PEG20-PEG76 имеет от 2 до 4 ветвей.

77. Антитело MEF по любому из пп. 73-76, в котором каждый ВРМ представляет собой фрагмент PEG4(PEG8)<sub>3</sub> или PEG4(PEG24)<sub>3</sub>.

78. Антитело MEF по любому из пп. 36-77, в котором каждый фрагмент полиэтиленгликоля ВРМ имеет кэп, выбранный из группы, состоящей из -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H и -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.

79. Антитело MEF по любому из пп. 1-78, в котором каждый ВРМ имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:



где  $R^1$  представляет собой  $C_2-C_{12}$  алкилен, необязательно прерванный одним из  $-NH-$ ,  $C(=O)-$ ,  $-C(=O)NH-$ ,  $-NH-$  или  $-O-$ , к которому ковалентно присоединена расщепляемый фрагмент, и необязательно замещенный  $-CO_2H$ ;

каждый индекс  $b$  находится в диапазоне от 2 до 72;

каждый индекс  $c$  находится в диапазоне от 1 до 72; и

~~~~ указывает место ковалентного присоединения к расщепляемому фрагменту.

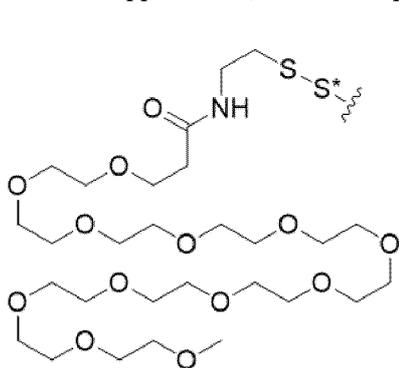
80. Антитело MEF по п. 79, в котором индекс  $b$  находится в диапазоне от 6 до 72, а индекс  $c$  находится в диапазоне от 1 до 12.

81. Антитело MEF по п. 79, в котором индекс  $b$  находится в диапазоне от 8 до 72, а индекс  $c$  находится в диапазоне от 1 до 12.

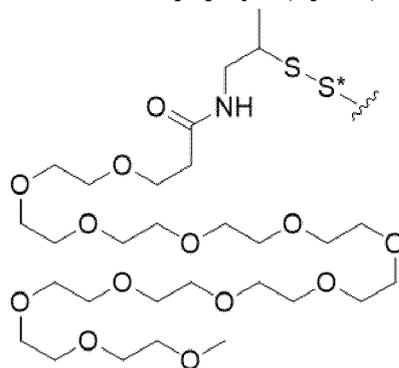
82. Антитело MEF по п. 79, в котором индекс  $b$  находится в диапазоне от 10 до 72, а индекс  $c$  находится в диапазоне от 1 до 12.

83. Антитело MEF по п. 79, в котором индекс  $b$  находится в диапазоне от 12 до 72, а индекс  $c$  находится в диапазоне от 1 до 12.

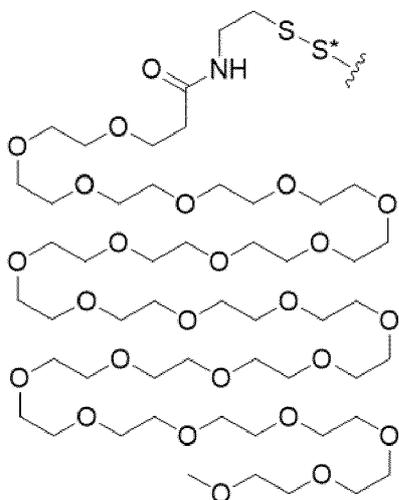
84. Антитело MEF по любому из пп. 23 или 25-42, в котором каждый ВРМ и расщепляемый фрагмент вместе с атомом серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF, к которому ковалентно присоединен расщепляемый фрагмент, имеют структуру согласно любой из формул (IIj-IIn):



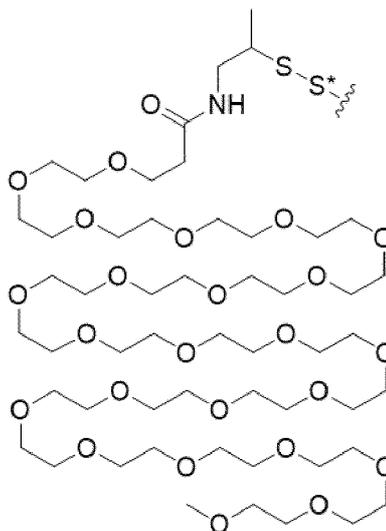
(IIj),



(IIk),

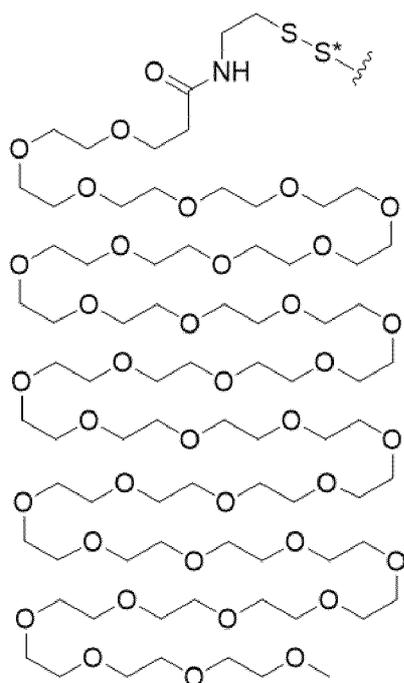


(III),



(IIm)

и

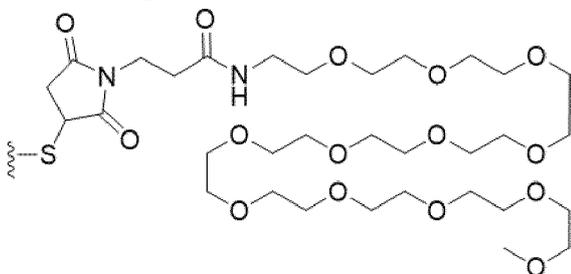


(IIa);

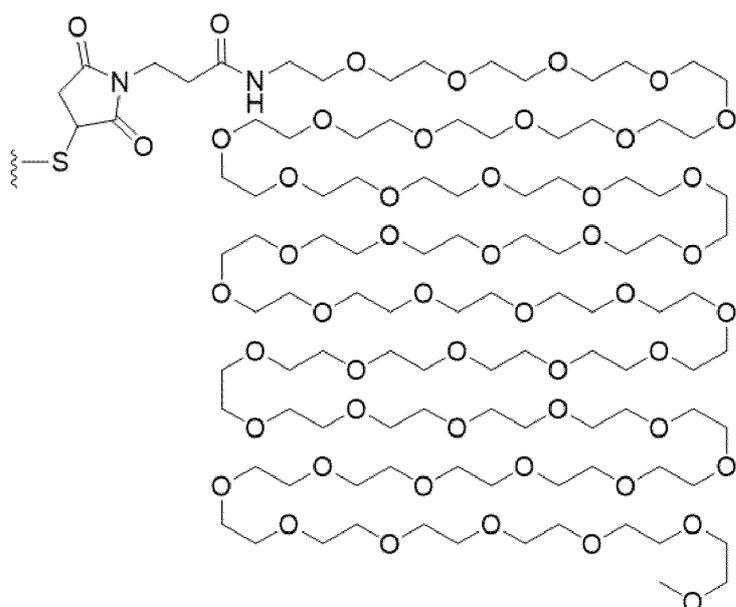
где S\* представляет собой атом серы из остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и

где ~~~ указывает на ковалентное присоединение к остатку антитела MEF.

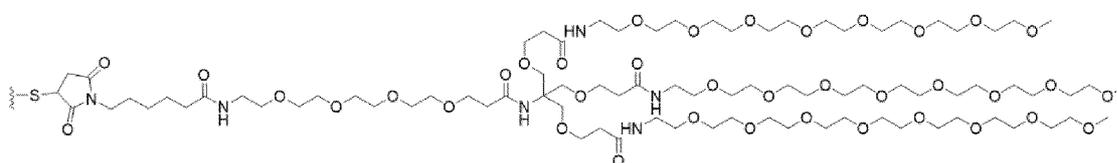
85. Антитело MEF по любому из пп. 23 или 25-42 или 47, в котором каждый ВРМ и расщепляемый фрагмент вместе с атомом серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF имеют структуру согласно любой из формул (IIIa)-(IIIg):



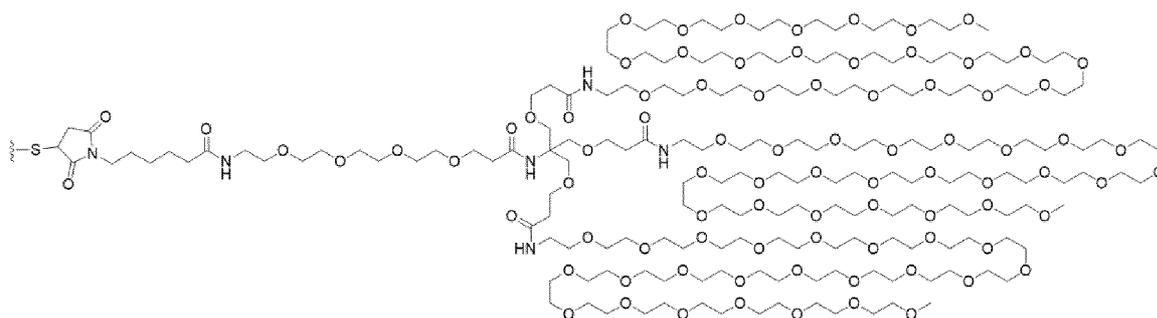
(IIIa),



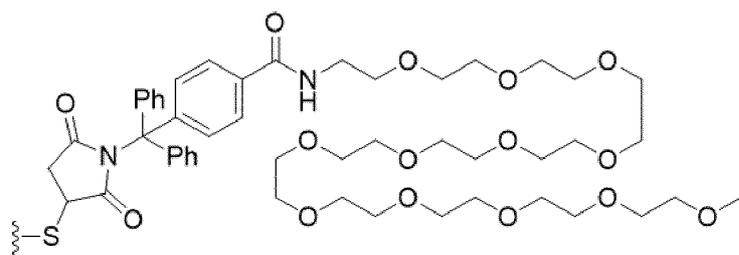
(IIIb),



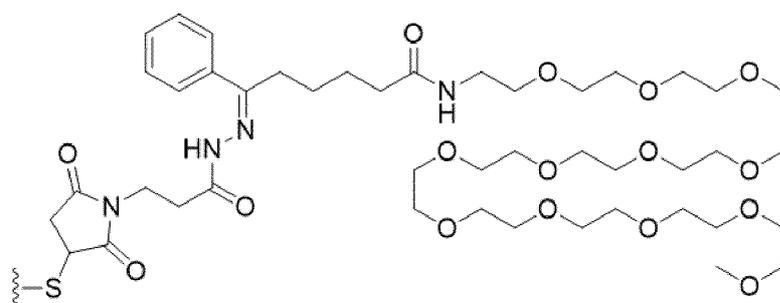
(IIIc),



(III d),



(IIIe),



(III f)



99. Антитело MEF по любому из пп. 1-98, причем антитело MEF представляет собой антитело IgG<sub>1</sub>.

100. Антитело MEF по любому из пп. 1-99, причем антитело MEF представляет собой моноклональное антитело.

101. Антитело MEF по п. 100, в котором моноклональное антитело представляет собой химерное антитело.

102. Антитело MEF по п. 100, в котором моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

103. Антитело MEF по любому из пп. 1-102, причем антитело MEF имеет одну или более мутаций в Fc-области;

при этом антитело MEF, имеющее одну или более мутаций, обладает более высокой эффекторной функцией по сравнению с эквивалентным антителом.

104. Антитело MEF по п. 103, причем антитело MEF представляет собой антитело IgG<sub>1</sub>; и одна или более мутаций в Fc-области выбраны из группы, состоящей из S298A, E333A, K334A, S239D, I332E, G236A, S239E, A330L, I332E, G236A, S239D, I332E, G236A, L234Y, G236W, S296A, F243, R292P, Y300L, V305L и P396L.

105. Антитело MEF по любому из пп. 1-104, причем антитело MEF связывается с раковой клеткой.

106. Антитело MEF по любому из пп. 1-103, причем антитело MEF включает ритуксимаб, обинутузумаб, офатумумаб, трастузумаб, алемтузумаб, могамулизумаб, цетуксимаб или динутуксимаб.

107. Антитело MEF по любому из пп. 1-104, причем антитело MEF связывается с иммунной клеткой.

108. Антитело MEF по любому из пп. 1-105 или 107, причем антитело MEF связывается с CD40 человека.

109. Антитело MEF по любому из пп. 1-105 или 107-108, причем антитело MEF содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности с SEQ ID NO: 890.

110. Антитело MEF по любому из пп. 1-105 или 107-109, причем антитело MEF содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности с SEQ ID NO: 891.

111. Антитело MEF по любому из пп. 1-105 или 107-110, причем антитело MEF содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности вариабельной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 890.

112. Антитело MEF по любому из пп. 1-105 или 107-111, причем антитело MEF содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности вариабельной области легкой цепи с SEQ ID NO: 891.

113. Антитело MEF по любому из пп. 1-105 или 107-112, причем антитело MEF имеет константу диссоциации не более 500 нМ для CD40 человека.

114. Антитело MEF по любому из пп. 1-105 или 107-113, причем антитело MEF

имеет константу диссоциации не более 10 нМ для CD40 человека.

115. Антитело MEF по любому из пп. 1-114, причем когда антитело MEF вводят в популяцию клеток, содержащую одну или более клеток-мишеней, связывание антитела MEF с одной или более клетками-мишенями обеспечивает зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов по сравнению с уровнями периферических цитокинов, обеспечиваемыми путем связывания эквимольного количества эквивалентного антитела.

116. Антитело MEF по п. 115, в котором зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется начальным снижением по меньшей мере на около 50%.

117. Антитело MEF по п. 115, в котором зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется начальным снижением по меньшей мере на около 80%.

118. Антитело MEF по любому из пп. 115-117, в котором зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется восстановлением уровней периферических цитокинов до по меньшей мере около 50% по сравнению с эквимольным количеством эквивалентного антитела через период от около 48 часов до около 96 часов.

119. Антитело MEF по любому из пп. 115-117, в котором зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется восстановлением уровней периферических цитокинов до около 100% по сравнению с эквимольным количеством эквивалентного антитела через период от около 48 часов до около 96 часов.

120. Антитело MEF по п. 115 или 116, причем популяция клеток представляет собой биологический образец; и при этом зависящее от времени снижение уровней периферических цитокинов характеризуется начальным снижением уровней периферических цитокинов в супернатанте биологического образца по сравнению с эквимольным количеством эквивалентного антитела.

121. Антитело MEF по п. 115, причем популяция клеток находится у субъекта; и при этом уровни периферических цитокинов представляют собой системные уровни цитокинов в плазме субъекта.

122. Антитело MEF по любому из пп. 1-115, причем когда антитело MEF вводят в популяцию клеток, содержащую одну или более клеток-мишеней, связывание антитела MEF с одной или более клетками-мишенями обеспечивает первоначальное снижение скорости лизиса клеток одной или более клеток-мишеней относительно скорости лизиса клеток, обеспечиваемой связыванием эквимольного количества эквивалентного антитела.

123. Антитело MEF по п. 122, причем популяция клеток представляет собой биологический образец.

124. Антитело MEF по п. 122, причем популяция клеток находится у субъекта.

125. Антитело MEF по любому из пп. 115-124, причем одна или более клеток-мишеней содержат раковые клетки, содержащие антигены, или иммунные клетки, содержащие антигены.

126. Антитело MEF по п. 125, причем клетки-мишени мечены радиоактивным

изотопом.

127. Антитело MEF по любому из пп. 115-124, причем популяция клеток дополнительно содержит нормальные РВМС.

128. Антитело MEF по п. 127, причем нормальные РВМС включают естественные клетки-киллеры.

129. Антитело MEF по любому из пп. 1-114, причем введение антитела MEF субъекту обеспечивает снижение  $C_{max}$  цитокина на около 20-75% по сравнению с введением эквимольного количества эквивалентного антитела.

130. Антитело MEF по п. 129, причем введение антитела MEF субъекту обеспечивает по существу такую же общую  $AUC_{0-\infty}$  антитела по сравнению с введением эквимольного количества эквивалентного антитела.

131. Композиция, содержащая распределение антител MEF по любому из пп. 1-130.

132. Композиция по п. 131, причем композиция содержит единичную дозу распределения антител MEF.

133. Композиция по п. 132, причем единичная доза не повышает системные уровни хемотаксического белка-1 моноцитов (MCP-1), фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ), интерлейкина 1 бета (IL1B), интерлейкина 6 (IL6) или интерлейкина 10 (IL10) более чем в 10 раз относительно уровней до введения.

134. Композиция по п. 131, дополнительно содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

135. Композиция, содержащая первую популяцию из композиции по любому из пп. 131-134; вторую популяцию из композиции по любому из пп. 131-134; и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель; при этом ВРМ, присутствующие в первой популяции антител MEF, отличаются от ВРМ, присутствующих во второй популяции антител MEF.

136. Композиция, содержащая первую популяцию из композиции по любому из пп. 131-134; вторую популяцию из композиции по любому из пп. 131-134; и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель; при этом расщепляемые фрагменты, присутствующие в первой популяции антител MEF, отличаются от расщепляемых фрагментов, присутствующих во второй популяции антител MEF.

137. Композиция по любому из пп. 131-136, причем единственным активным ингредиентом в композиции является антитело MEF.

138. Композиция по любому из пп. 131-134, причем процент агрегации антитела MEF в композиции увеличивается в около 1-1,1 раза по сравнению с эквивалентным антителом.

139. Композиция по любому из пп. 131-138, в которой по меньшей мере 90% антител распределения антител MEF являются афукозилированными.

140. Композиция по любому из пп. 131-139, в которой по меньшей мере 98% антител распределения антител MEF являются афукозилированными.

141. Способ лечения состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий:

введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей антитело с модулированной эффекторной функцией (MEF), которое содержит модификацию, уменьшающую эффекторную функцию, и эта модификация, снижающая эффекторную функцию, по меньшей мере частично обратима в физиологических условиях;  
и

лечение заболевания при поддержании системного уровня цитокина или маркера воспаления не более чем в 10 раз выше уровня до введения.

142. Способ по п. 141, в котором цитокин или маркер воспаления представляет собой хемотаксический белок-1 моноцитов (MCP-1), воспалительный белок-1 макрофагов (MIP-1 $\beta$ ), фактор некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), гамма-интерферон (IFN- $\gamma$ ), агонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA), интерлейкин 1 бета (IL1B), интерлейкин 6 (IL6), интерлейкин 10 (IL10) или их комбинацию.

143. Способ по п. 141 или 142, в котором цитокин или маркер воспаления представляет собой хемотаксический белок-1 моноцитов (MCP-1), воспалительный белок-1 макрофагов (MIP-1 $\beta$ ), агонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA) или их комбинацию.

144. Способ по любому из пп. 141-143, в котором модификация включает расщепляемый биосовместимый полимерный фрагмент (BPM), ковалентно присоединенный к аминокислотному остатку, или посттрансляционную модификацию антитела MEF.

145. Способ по п. 144, в котором до расщепления BPM антитело MEF обладает от 2% до 20% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишённого BPM.

146. Способ по любому из пп. 141-145, в котором через 192 часа после введения антитела MEF имеет от 30% до 70% активности эффекторной функции эквивалентного антитела, лишённого BPM.

147. Способ по любому из пп. 144-146, в котором скорость клиренса антитела MEF составляет от 25% до 200% от скорости расщепления BPM.

148. Способ по любому из пп. 141-147, в котором модификация, которая снижает эффекторную функцию антитела MEF, снижает аффинность связывания Fc $\gamma$ RIII антителом MEF.

149. Способ по любому из пп. 141-148, в котором композиция представляет собой композицию по любому из пп. 124-131.

150. Способ по любому из пп. 141-149, в котором антитело MEF представляет собой антитело по любому из пп. 1-130.

151. Способ снижения тяжести реакции, связанной с инфузией, у субъекта, ассоциированной с антителом, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию по любому из пп. 131-140;

причем антитело эквивалентно антителу MEF; и

при этом тяжесть реакции, связанной с инфузией, снижается с 1 до 4 единиц по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества антитела.

152. Способ снижения частоты и/или риска развития реакции, связанной с инфузией,

у субъекта, связанной с антителом, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию по любому из пп. 131-140; причем антитело эквивалентно антителу MEF; и

при этом частота и/или риск развития реакции, связанной с инфузией, снижается по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества эквивалентного антитела.

153. Способ уменьшения одного или более симптомов реакции, связанной с инфузией, у субъекта, ассоциированной с антителом, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию по любому из пп. 131-140;

причем антитело эквивалентно антителу MEF; и

при этом один или более симптомов реакции, связанной с инфузией, уменьшаются по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества эквивалентного антитела.

154. Способ снижения  $C_{\max}$  активного антитела, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию по любому из пп. 131-140; причем активное антитело эквивалентно антителу MEF; и при этом  $C_{\max}$  активного антитела после внутривенного введения композиции антитела MEF снижается по сравнению с  $C_{\max}$  после внутривенного введения эквимольного количества активного антитела.

155. Способ задержки максимального связывания антитела с Fc-гамма-рецептором IIIa у субъекта, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию по любому из пп. 131-140; причем антитело эквивалентно антителу MEF; и при этом антитело MEF задерживает связывание с Fc-гамма-рецептором IIIa по сравнению с антителом.

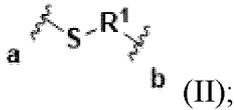
156. Способ селективного увеличения связывания антитела с Fc-гамма-рецептором IIIa в клетке-мишени у субъекта, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию по любому из пп. 131-140; причем антитело эквивалентно антителу MEF; и при этом соотношение антитела MEF (i), связанного с Fc-гамма-рецептором IIIa в клетке-мишени, и (ii) системно связанного с Fc-гамма-рецептором IIIa, увеличивается по сравнению с соотношением антитела (i), связанного с Fc-гамма-рецептором IIIa в клетке-мишени и (ii) системно связанного с гамма-рецептором Fc IIIa.

157. Способ снижения активации системного Fc-гамма-рецептора IIIa у субъекта после введения антитела, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию по любому из пп. 131-140; причем антитело эквивалентно антителу MEF; и при этом введение антитела MEF обеспечивает сниженную системную активацию Fc-гамма-рецептора IIIa по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества антитела.

158. Способ снижения системной продукции цитокинов у субъекта после введения антитела, включающий внутривенное введение субъекту композиции, содержащей композицию по любому из пп. 131-140; причем антитело эквивалентно антителу MEF; и при этом введение композиции, содержащей антитело MEF, снижает системную

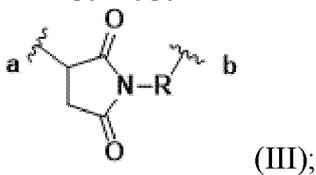
продукцию цитокинов по сравнению с внутривенным введением эквимольного количества антитела.

159. Способ по любому из пп. 151-158, в котором каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно формуле (II):



при этом по меньшей мере около 10% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов и по меньшей мере около 25% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 48 часов после внутривенного введения.

160. Способ по любому из пп. 151-158, в котором каждый расщепляемый фрагмент содержит структуру согласно формуле (III):



при этом около 10% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов и около 25% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 48 часов после внутривенного введения.

161. Способ по п. 159 или 160, в котором по меньшей мере около 10% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов и по меньшей мере около 30% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 48 часов после внутривенного введения.

162. Способ по п. 159 или 160, в котором по меньшей мере около 20% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов и по меньшей мере около 40% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 48 часов после внутривенного введения.

163. Способ по любому из пп. 159-162, в котором по меньшей мере около 30% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов и по меньшей мере около 50% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 48 часов после внутривенного введения.

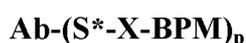
164. Способ по любому из пп. 159-163, в котором по меньшей мере около 50% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов и по меньшей мере около 100% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение 48 часов после внутривенного введения.

165. Способ по любому из пп. 159-163, в котором по меньшей мере около 50% ВРМ отщепляются от антитела МЕФ в течение около 12 часов.

166. Способ по любому из пп. 159-165, в котором антитело МЕФ представляет собой терапевтическое антитело.

167. Способ по любому из пп. 159-166, в котором антитело МЕФ выбрано из группы, состоящей из ритуксимаба, обинутузумаба, офатумумаба, трастузумаба, алемтузумаба, могамулизумаба, цетуксимаба и динутуксимаба.

168. Антитело МЕФ, имеющее структуру:



где:

каждый S\* представляет собой атом серы из остатка цистеина восстановленного межцепочечного дисульфида антитела MEF;

каждый X представляет собой расщепляемый фрагмент; каждый ВРМ представляет собой фрагмент полиэтиленгликоля, поликетальный фрагмент, полиглицериновый фрагмент, полисахаридный фрагмент, полисаркозиновый фрагмент, полипептидный фрагмент или полицвиттерионный фрагмент;

нижний индекс p равен 2, 4, 6 или 8; и

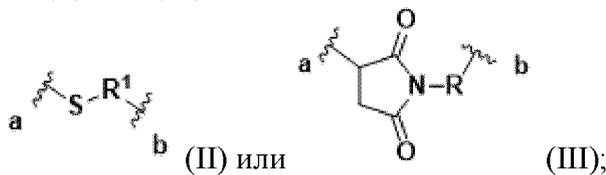
Ab представляет собой оставшуюся часть антитела.

169. Антитело MEF по п. 168, в котором каждый X ковалентно присоединен к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемую дисульфидную связь или через расщепляемую тиоэфирную связь с негидролизованным сукцинимидным фрагментом.

170. Антитело MEF по п. 168 или 169, в котором каждый X ковалентно присоединен к атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемую тиоэфирную связь.

171. Антитело MEF по п. 168 или 169, в котором каждый X ковалентно присоединен к атому серы цистеинового остатка восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF через расщепляемую дисульфидную связь.

172. Антитело MEF по п. 168 или 169, в котором каждый X содержит структуру формулы (II) или (III):



где:

R<sup>1</sup> представляет собой C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> алкилен, необязательно прерванный одним из -NH-C(=O)-, -C(=O)NH-, -NH- и -O-;

R отсутствует или представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкилен, необязательно прерванный одним или двумя фенилами, -NH-C(=O)-, -C(=O)NH-, -NH-, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)O-, -S-C(=O)-, -C(=O)S-, -O-C(=O)O-, -C(=NR<sup>1A</sup>), ацеталем, -O(SO<sub>2</sub>)O-, -O-[P(=O)(-OH)]O-, -C(=N-OH)-, -C(=N-NH<sub>2</sub>)-, и -C(R<sup>1A</sup>)=N-NH-; а R необязательно замещен 1-3 заместителями, независимо выбранными из фенила, оксо и -CO<sub>2</sub>R<sup>A</sup>; C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкилена; а фенил, необязательно замещенный 1-3 независимо выбранными C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> алкокси;

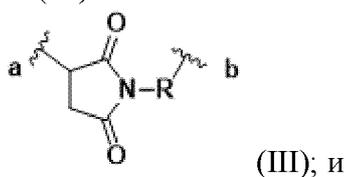
каждый R<sup>A</sup> независимо представляет собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил;

каждый R<sup>1A</sup> независимо представляет собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил;

где ~~~ (a) представляет собой ковалентное присоединение к остатку цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и

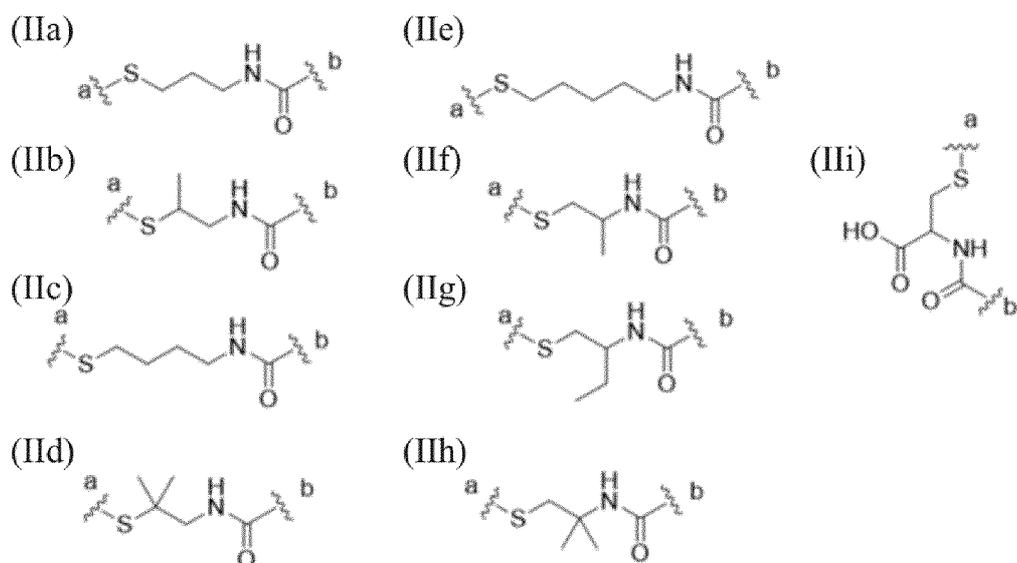
~~~~ (b) представляет собой ковалентное присоединение к ВРМ или оставшейся части X, которая сохраняет ковалентное присоединение к ВРМ.

173. Антитело MEF по п. 172, в котором каждый X содержит структуру согласно формуле (III):



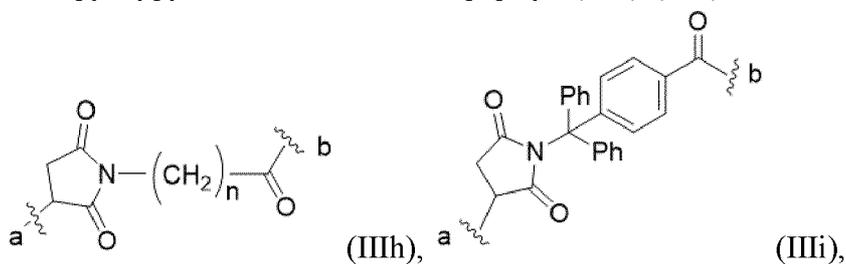
где R представляет собой  $C_1$ - $C_{12}$  алкилен, прерванный  $-C(=N-NH_2)-$  или  $-C(R^{1A})=N-NH-$ ; или прерванный фенилом и одним из  $-C(=N-NH_2)-$  и  $-C(R^{1A})=N-NH-$ .

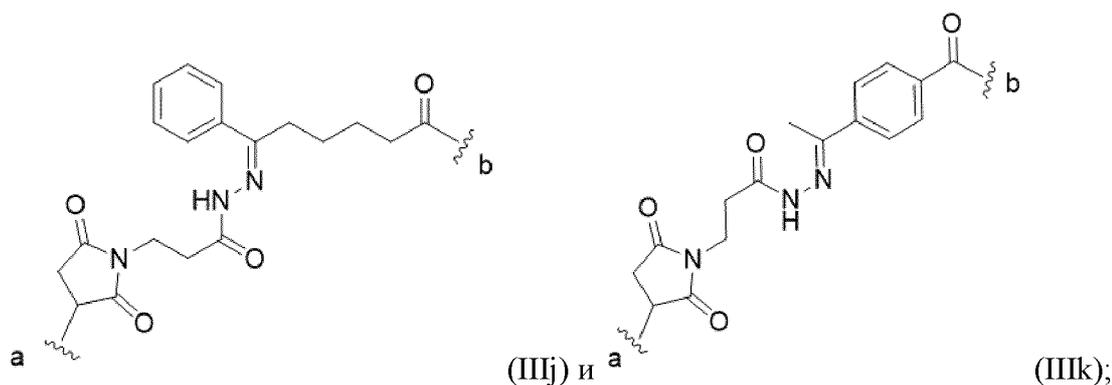
174. Антитело MEF по любому из пп. 168, 169, 171 или 172, в котором каждый X содержит структуру согласно любой из формул (IIa)-(IIi):



где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и  $\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение X к ВРМ.

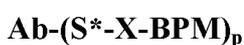
175. Антитело MEF по любому из пп. 168-170, 172 или 173, в котором каждый X содержит структуру согласно любой из формул (IIIh)-(IIIk):



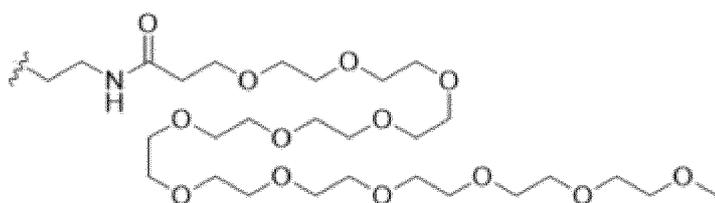


где индекс  $n$  представляет собой целое число от 2 до 8; и  
 где  $\sim$  (a) представляет собой ковалентное присоединение к атому серы остатка цистеина восстановленной межцепочечной дисульфидной связи антитела MEF; и  $\sim$  (b) представляет собой ковалентное присоединение X к BPM.

176. Антитело MEF по п. 169, причем антитело MEF имеет структуру:



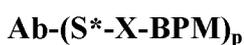
где каждый фрагмент BPM имеет структуру согласно формуле (IVa):



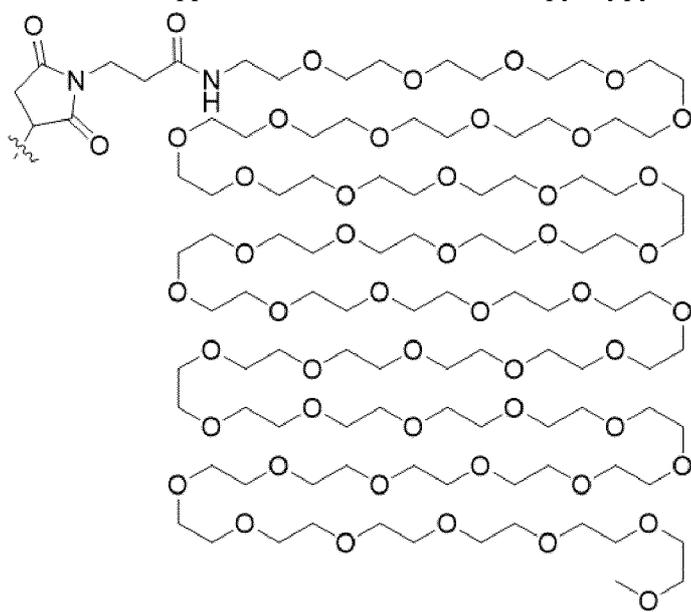
(IVa); и

где  $\sim$  представляет собой ковалентное присоединение к расщепляемому фрагменту.

177. Антитело MEF по п. 169, причем антитело MEF имеет структуру:



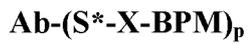
где каждый фрагмент -X-BPM имеет структуру согласно формуле (IIIb):



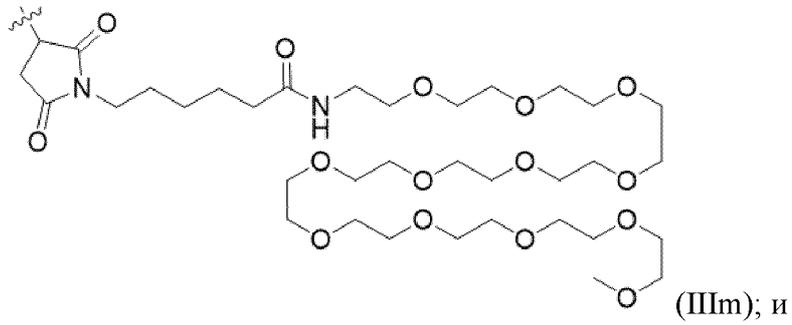
(IIIb); и

где  $\sim$  представляет собой ковалентное присоединение к  $S^*$ .

178. Антитело MEF по п. 169, причем антитело MEF имеет структуру:



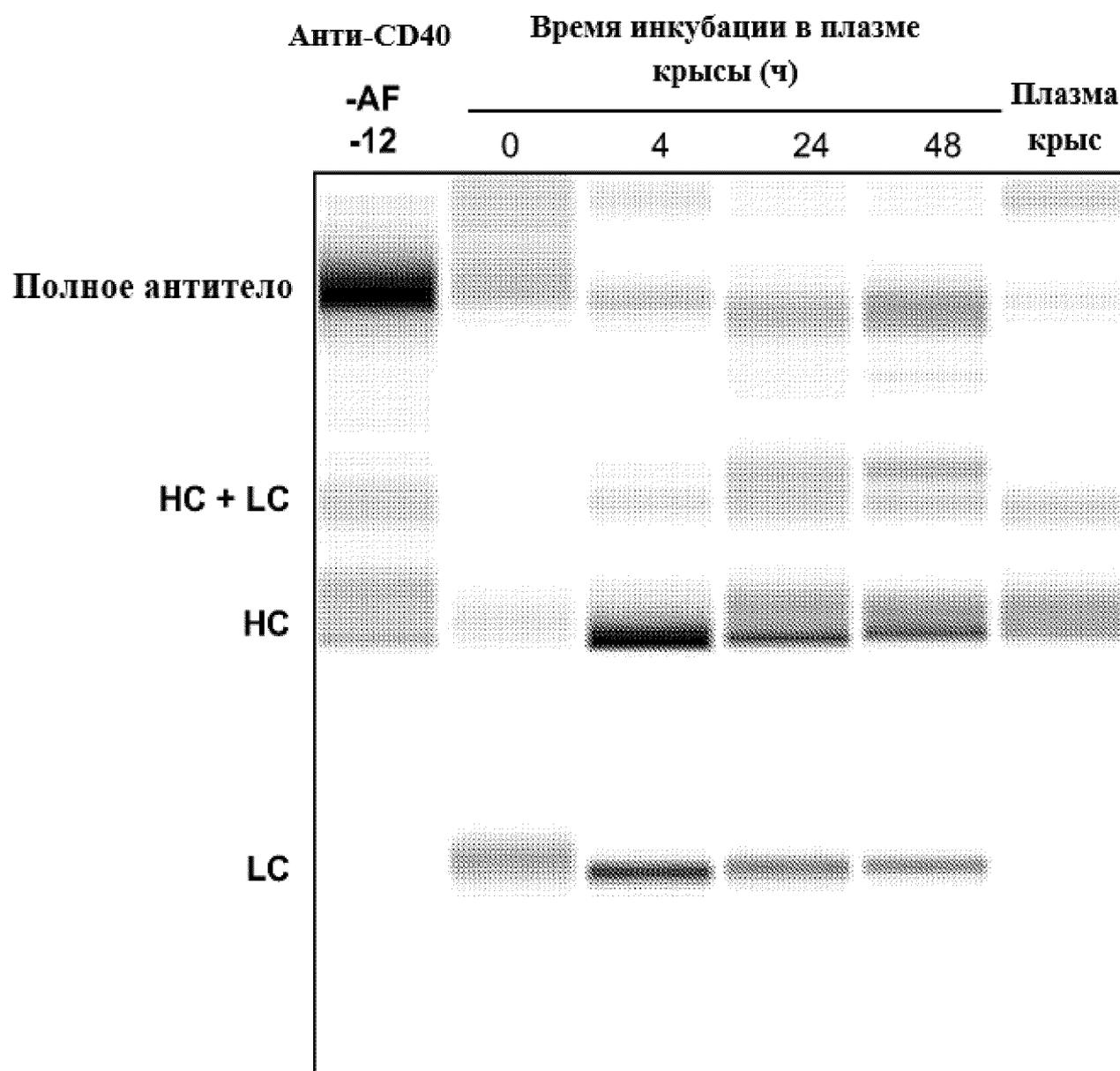
где каждый фрагмент -X-BPM имеет структуру согласно формуле (III<sub>m</sub>):



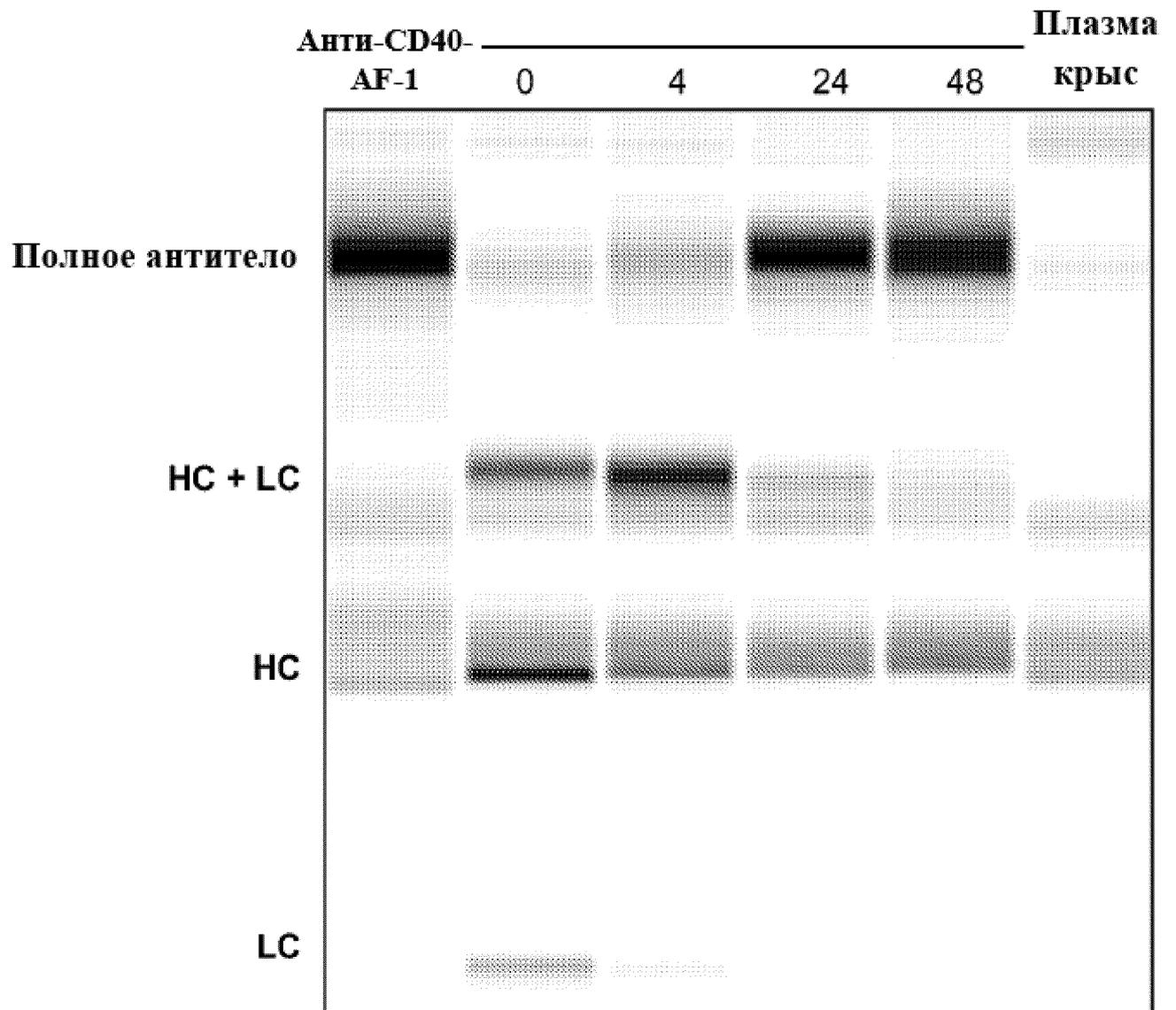
где  $\sim$  представляет собой ковалентное присоединение к  $S^*$ .

По доверенности

1/37

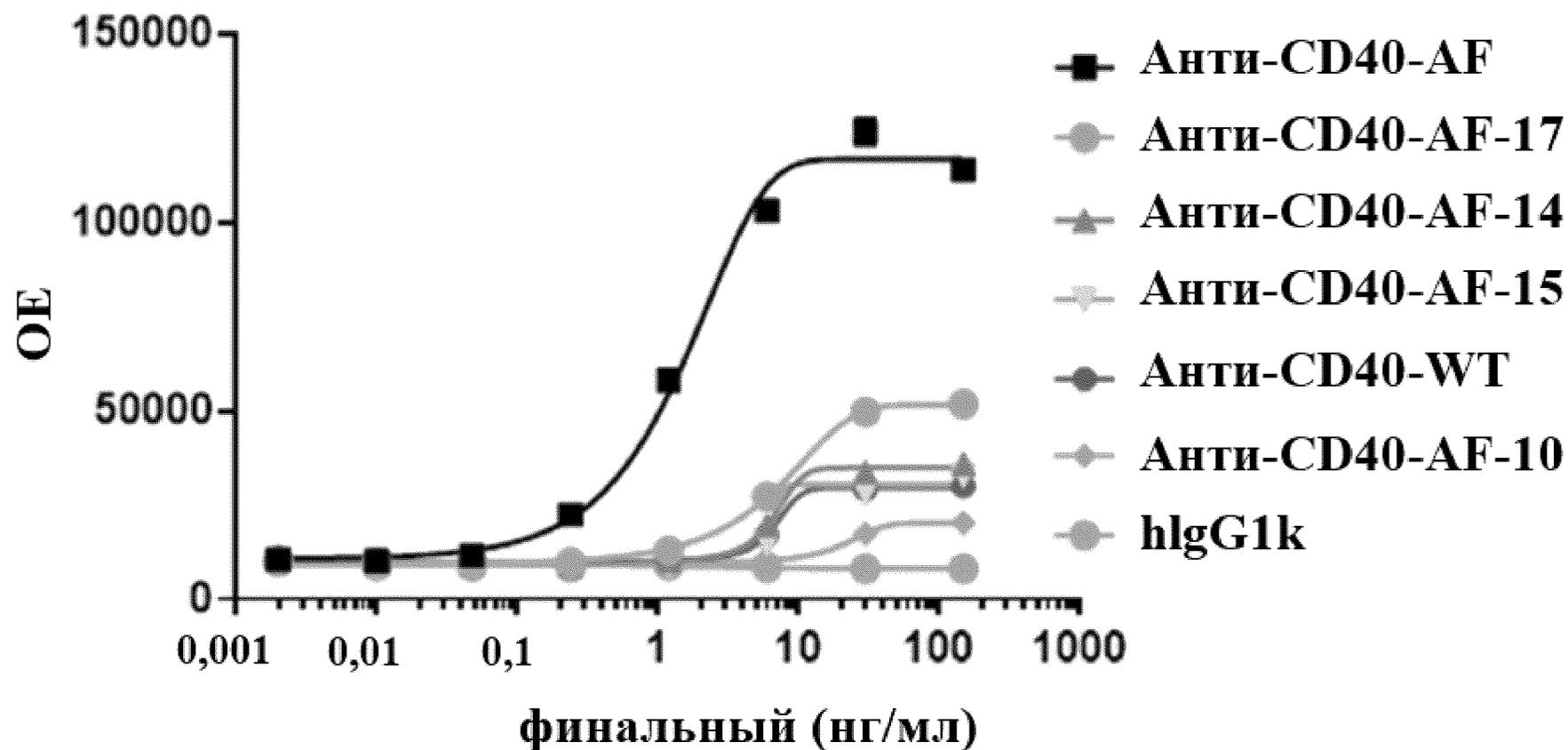


ФИГ. 1А



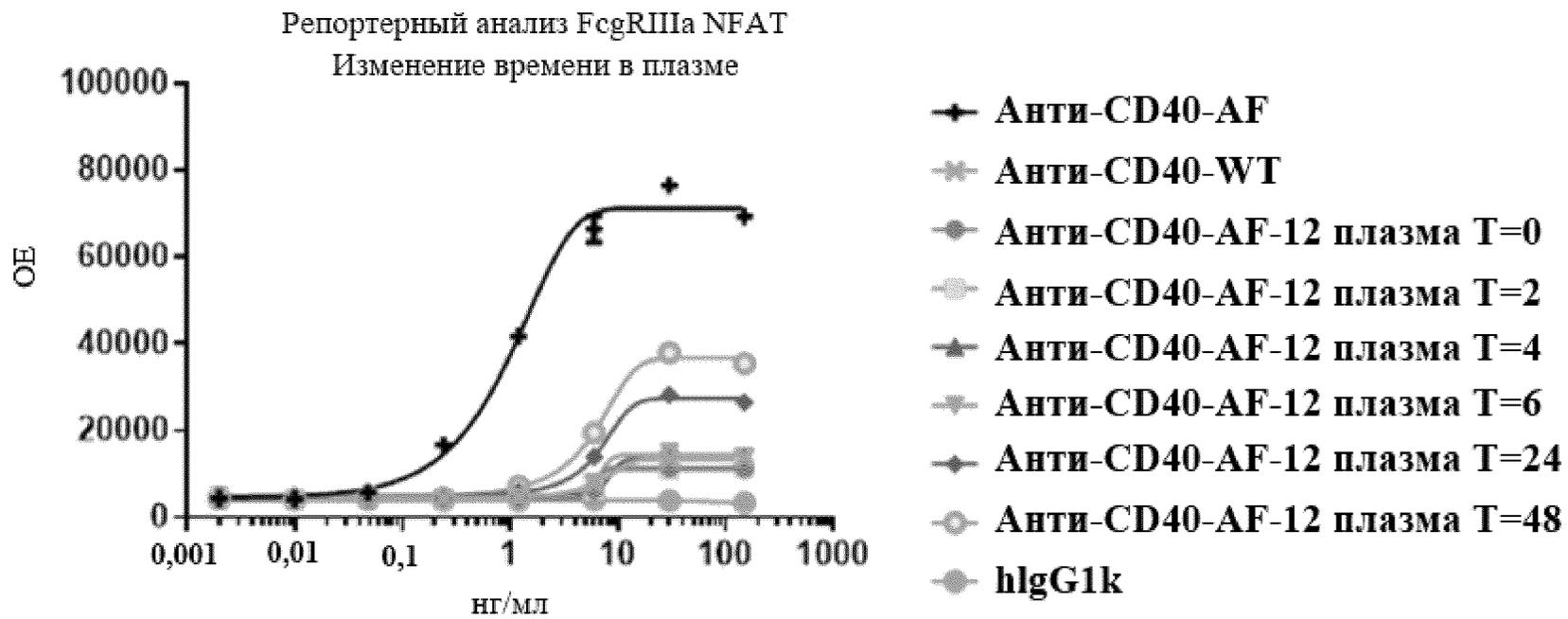
ФИГ. 1В

## NFAT-репортерный анализ анти-CD40 FcγRIIIa



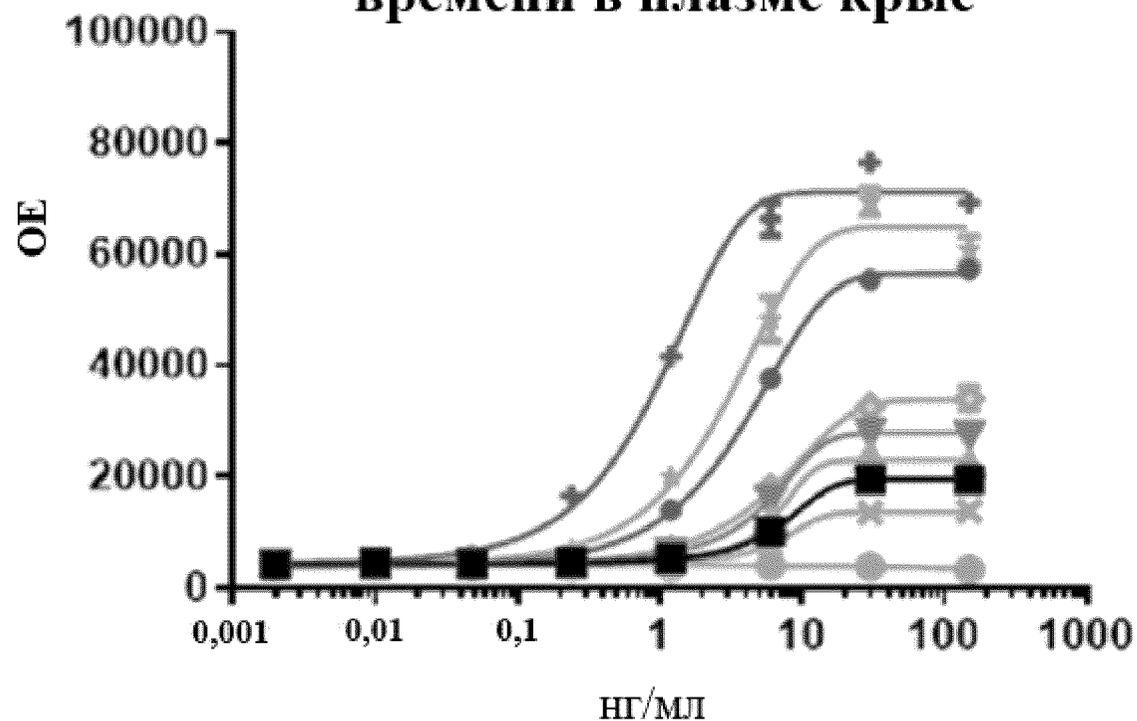
3/37

ФИГ. 2



ФИГ. 3А

**Репортерный анализ  
FcγRIIIa NFAT Изменение  
времени в плазме крыс**

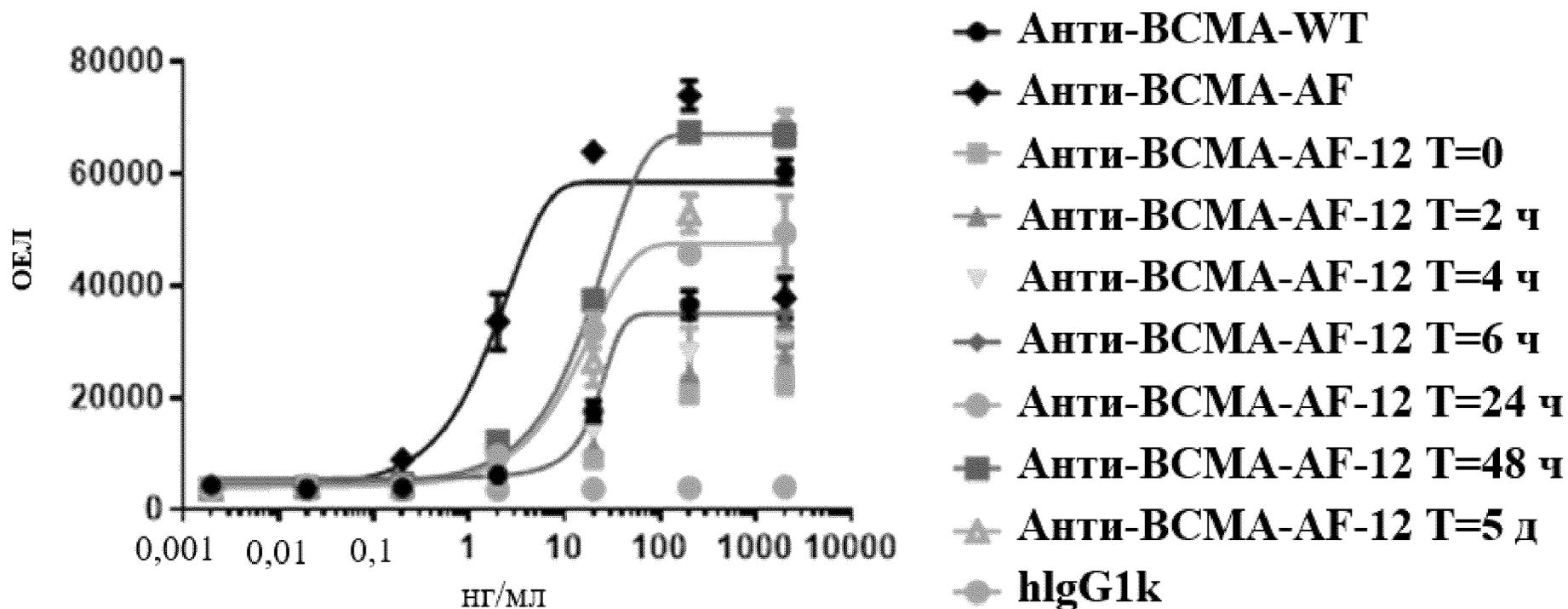


- ✱ Анти-CD40-AF
- ✚ Анти-CD40-WT
- Анти-CD40-AF-1 T=0
- ▲ Анти-CD40-AF-1 T=2
- ▼ Анти-CD40-AF-1 T=4
- ◆ Анти-CD40-AF-1 T=6
- ◆ Анти-CD40-AF-1 T=24
- ✚ Анти-CD40-AF-1 T=48
- hlgG1k

5/37

**ФИГ. 3В**

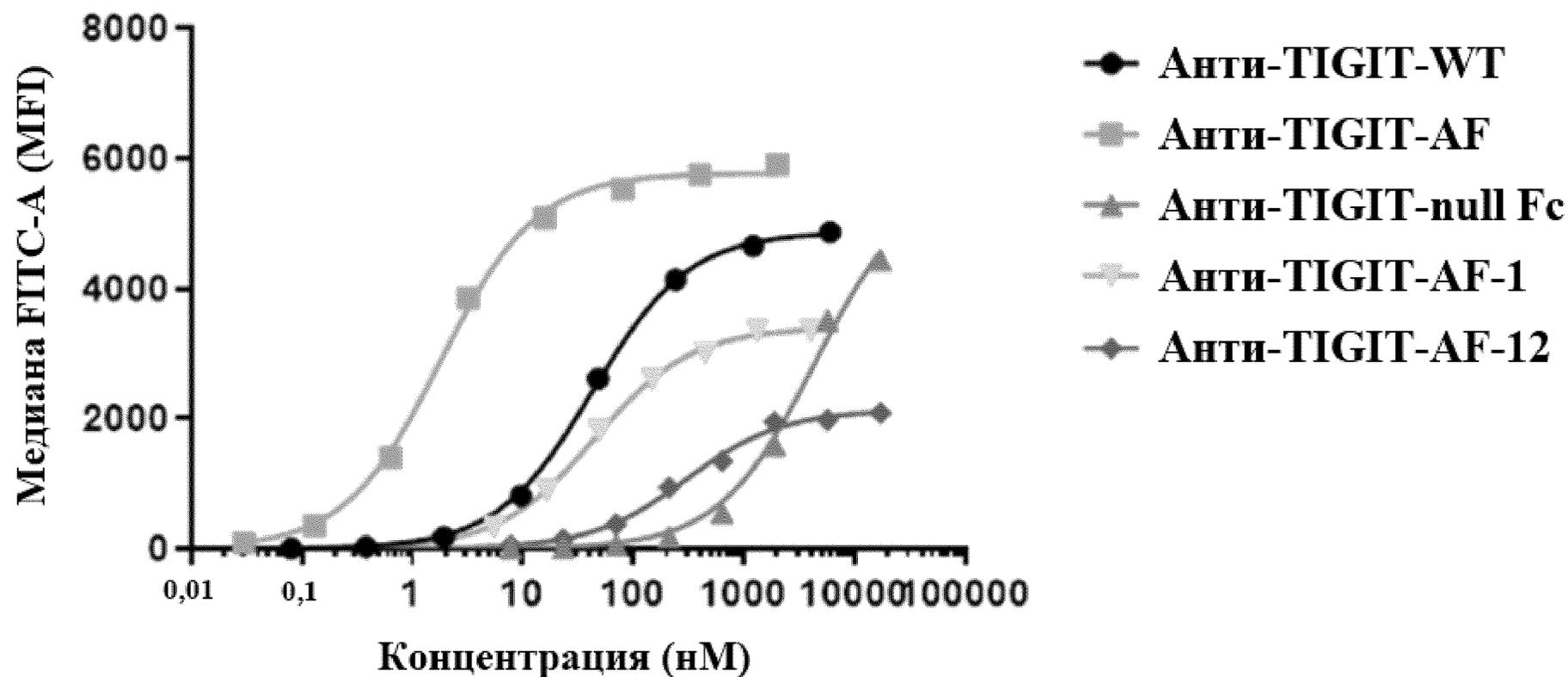
Репортерный анализ FcγRIIIa NFAT  
Изменение времени в плазме крыс



6/37

ФИГ. 3С

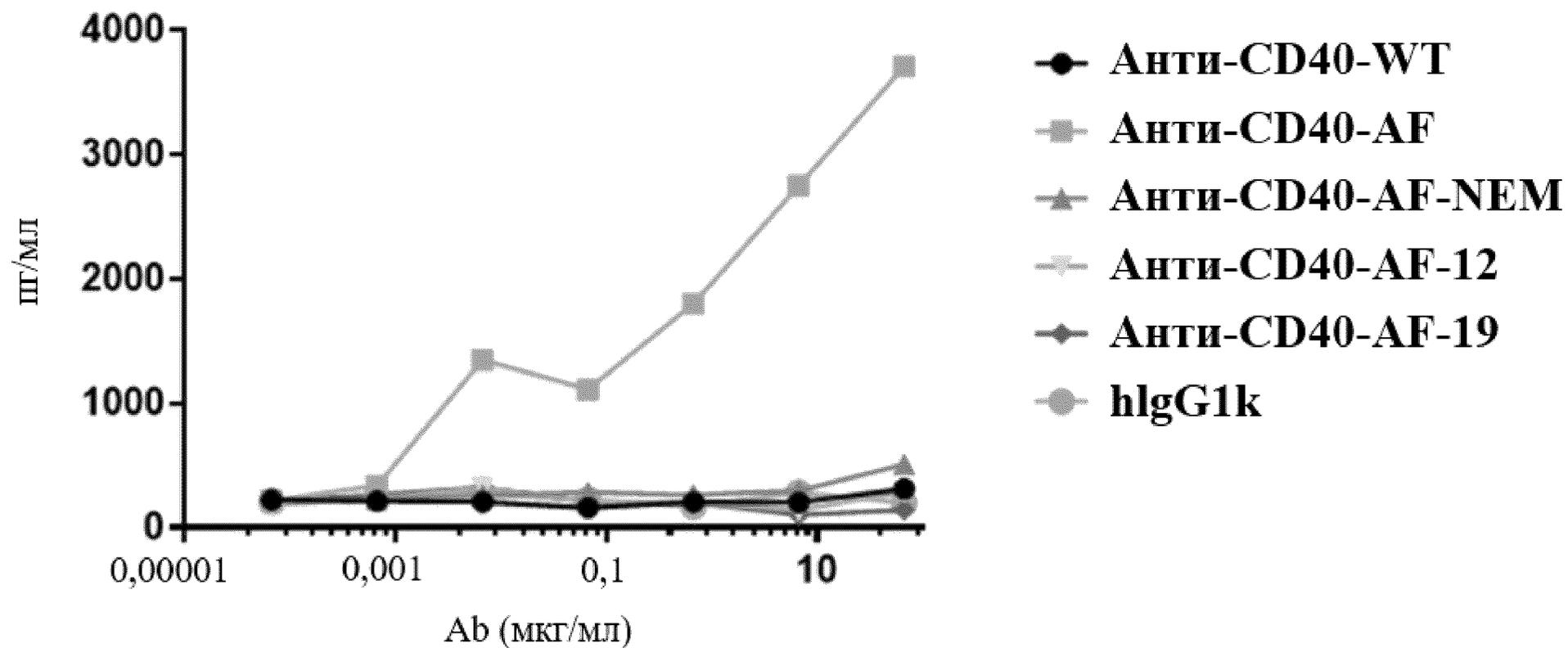
### Насыщающее связывание с клетками FcγRIIIa CHO



7/37

ФИГ. 4

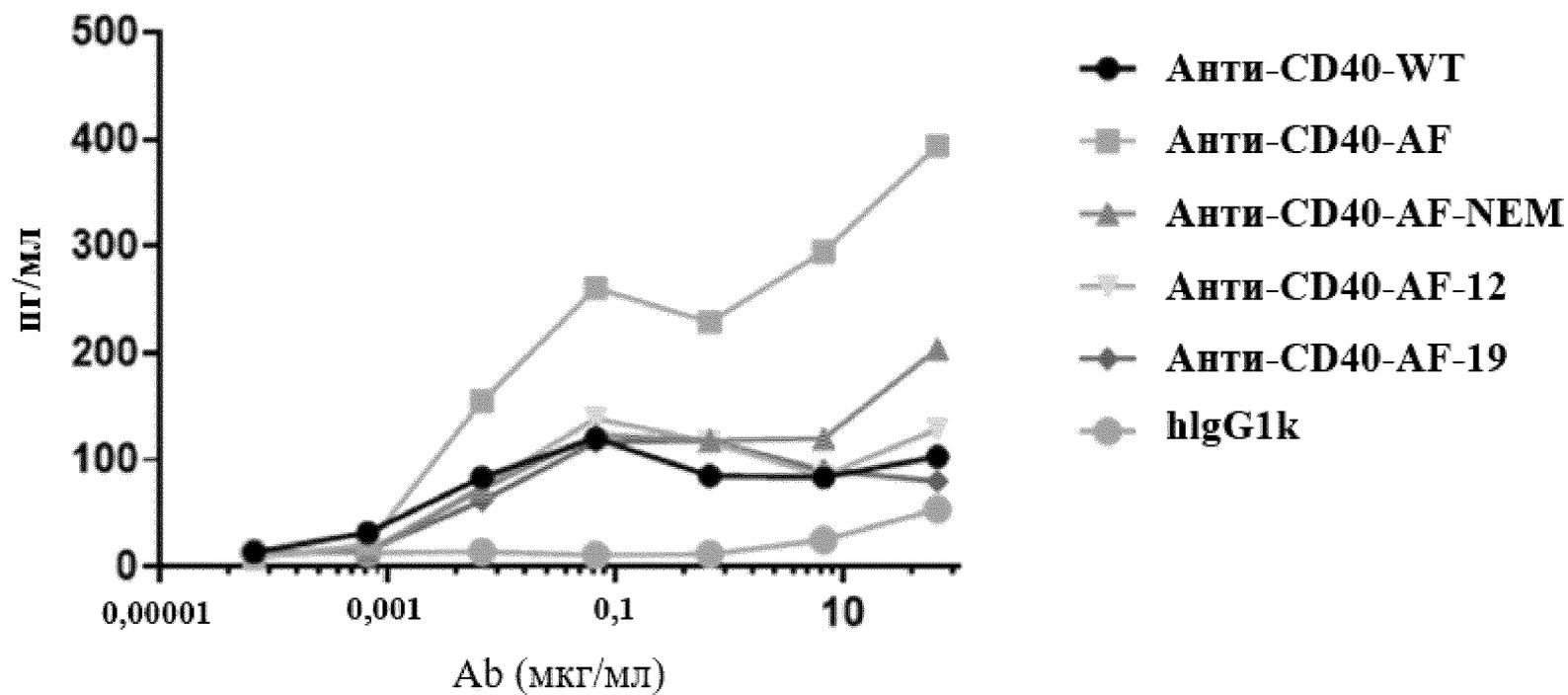
**IP10 6 ч**



8/37

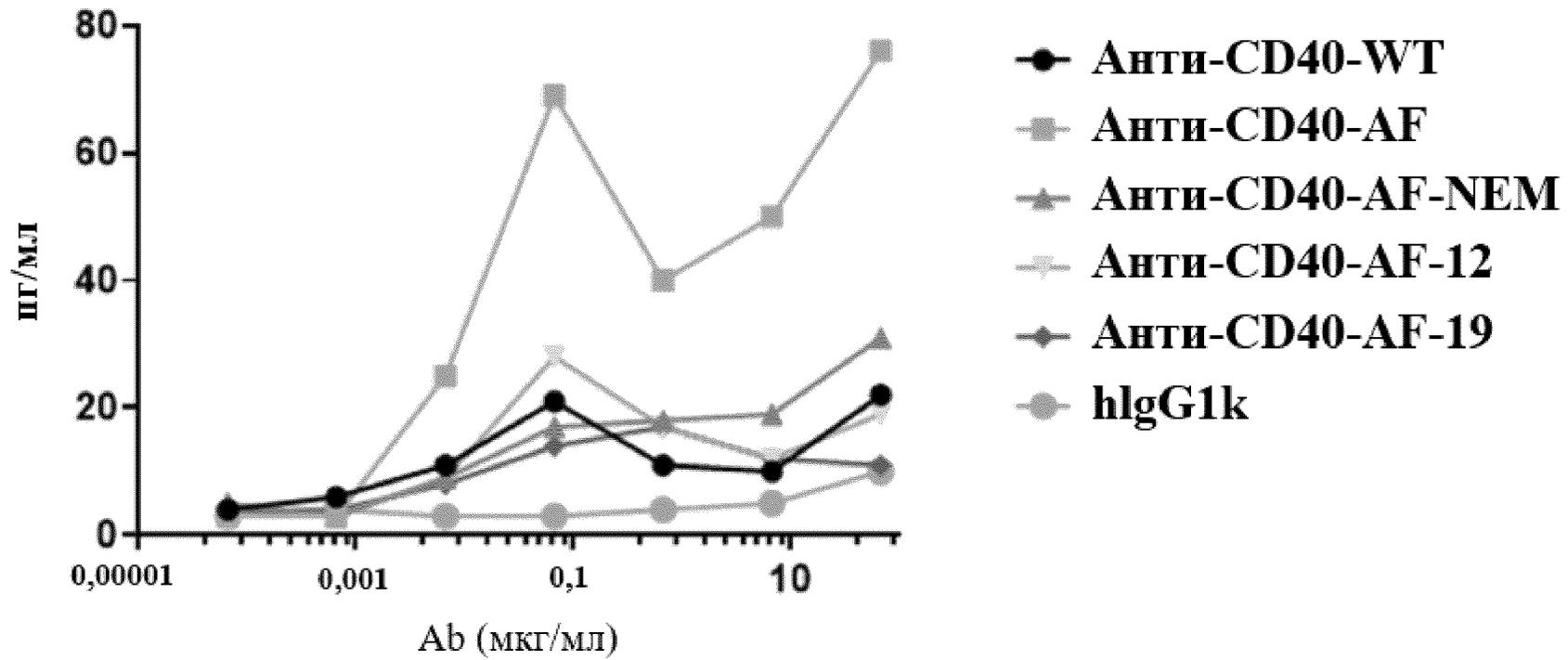
**ФИГ. 5А**

### МІР-1b 6 ч



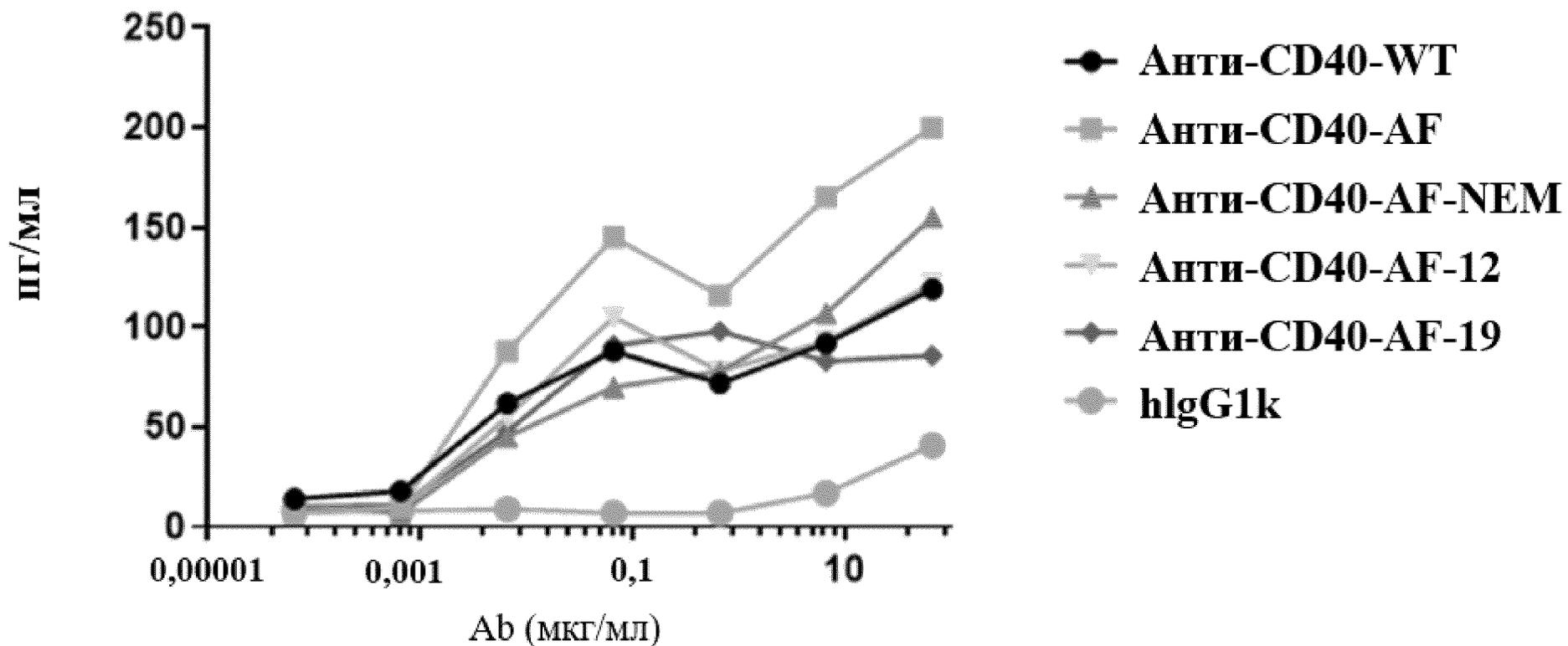
ФИГ. 5В

**TNF $\alpha$  6 ч**



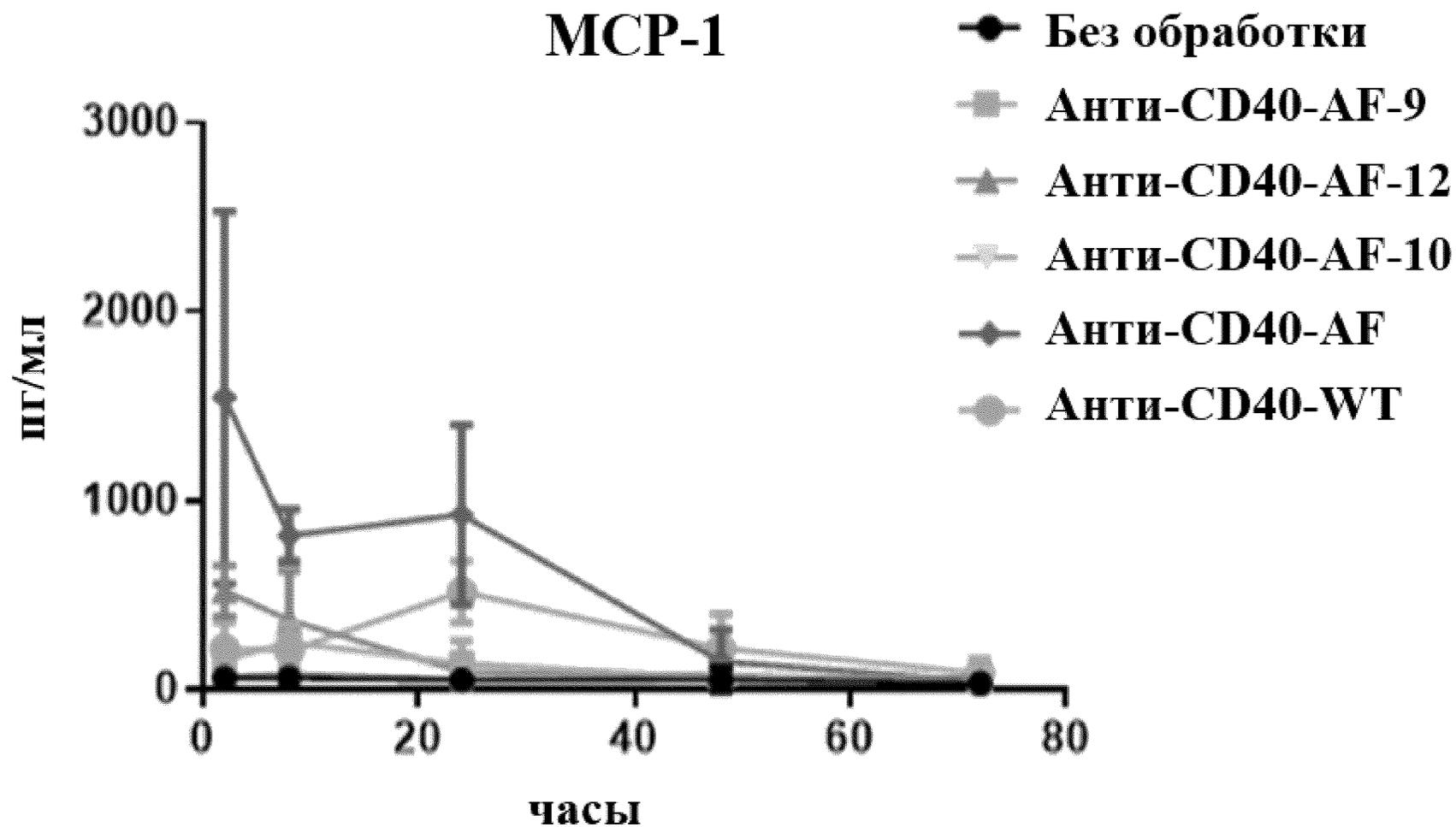
**ФИГ. 5С**

### МІР-1а 6 ч



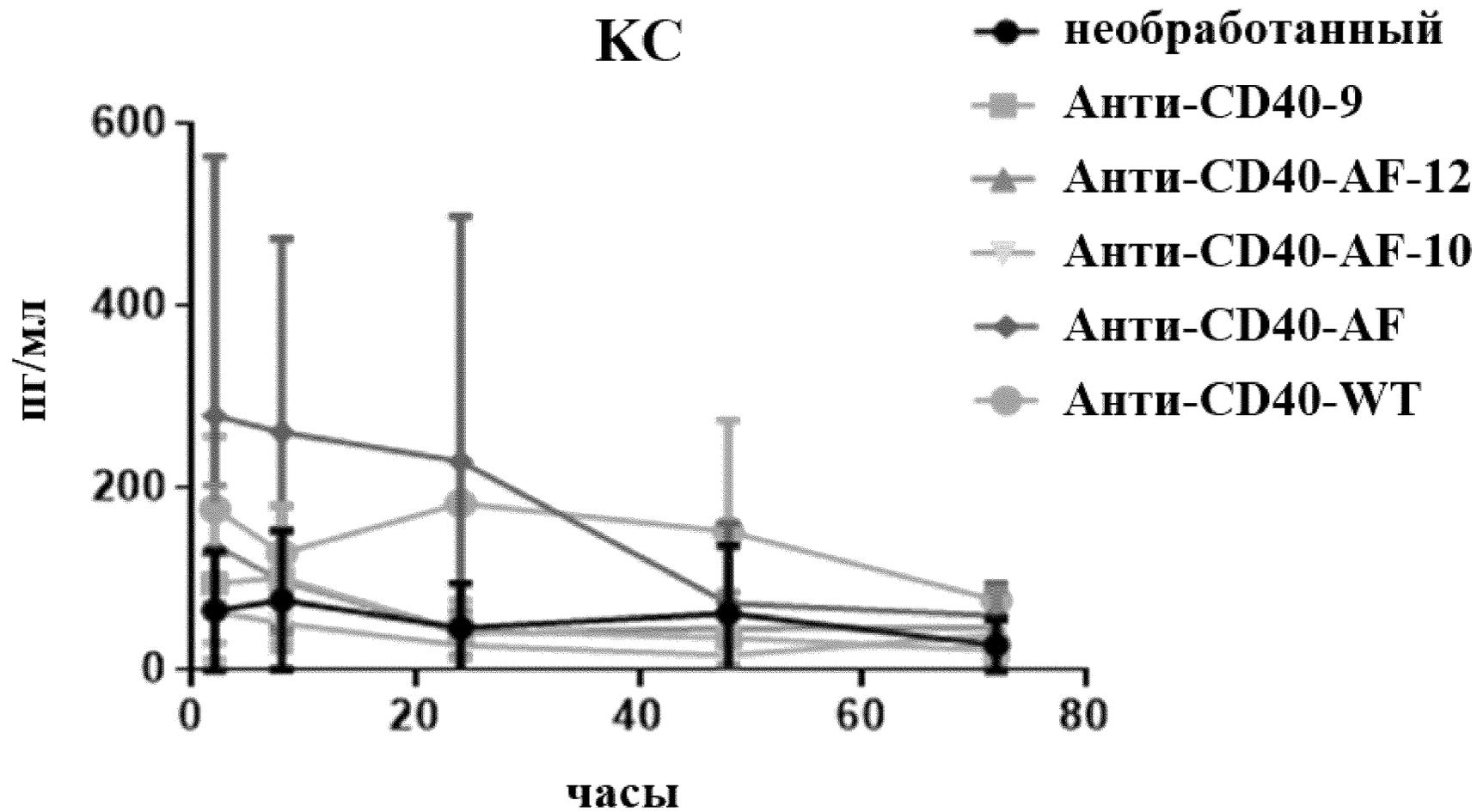
ФІГ. 5D

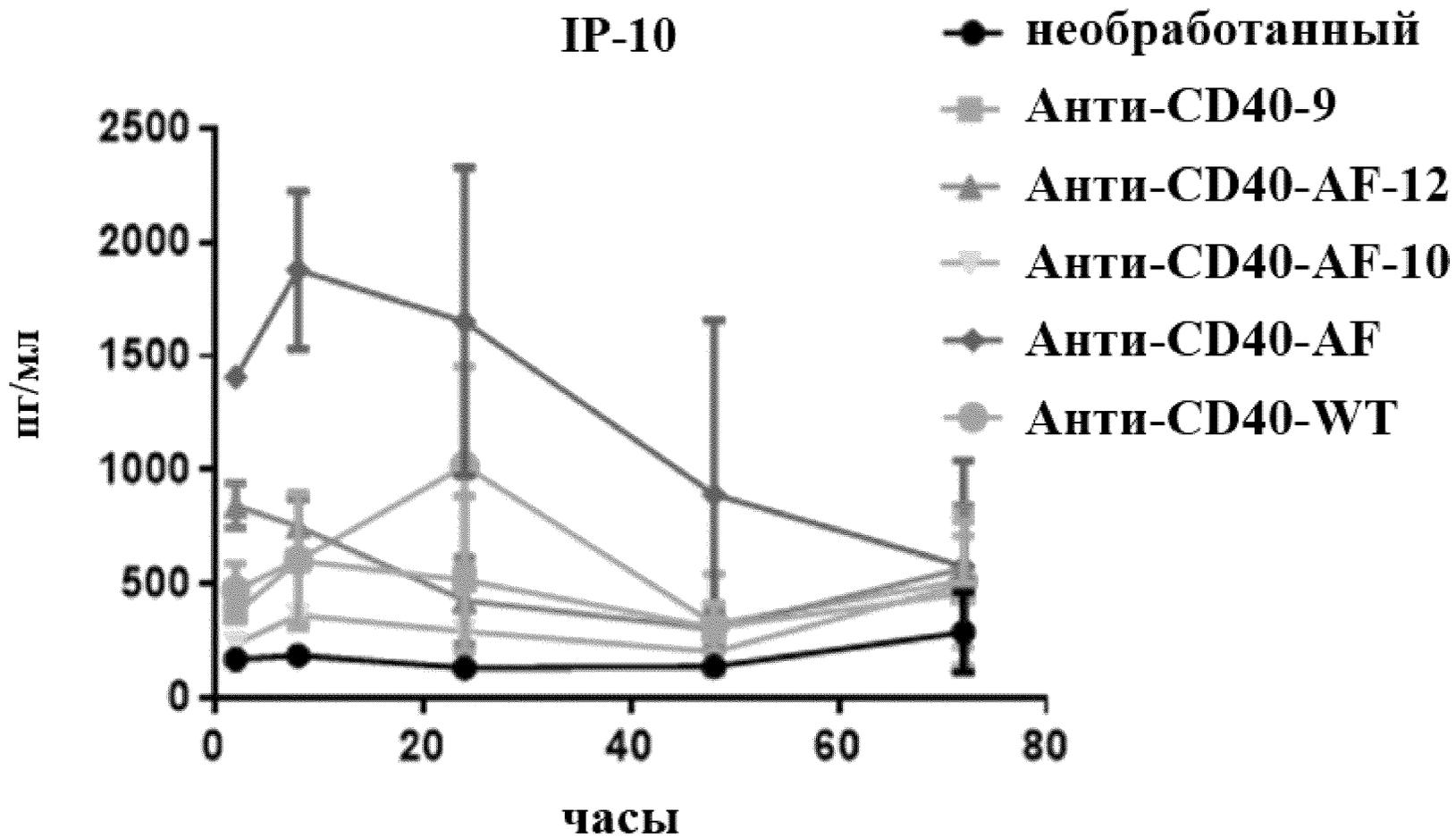
# МСП-1



12/37

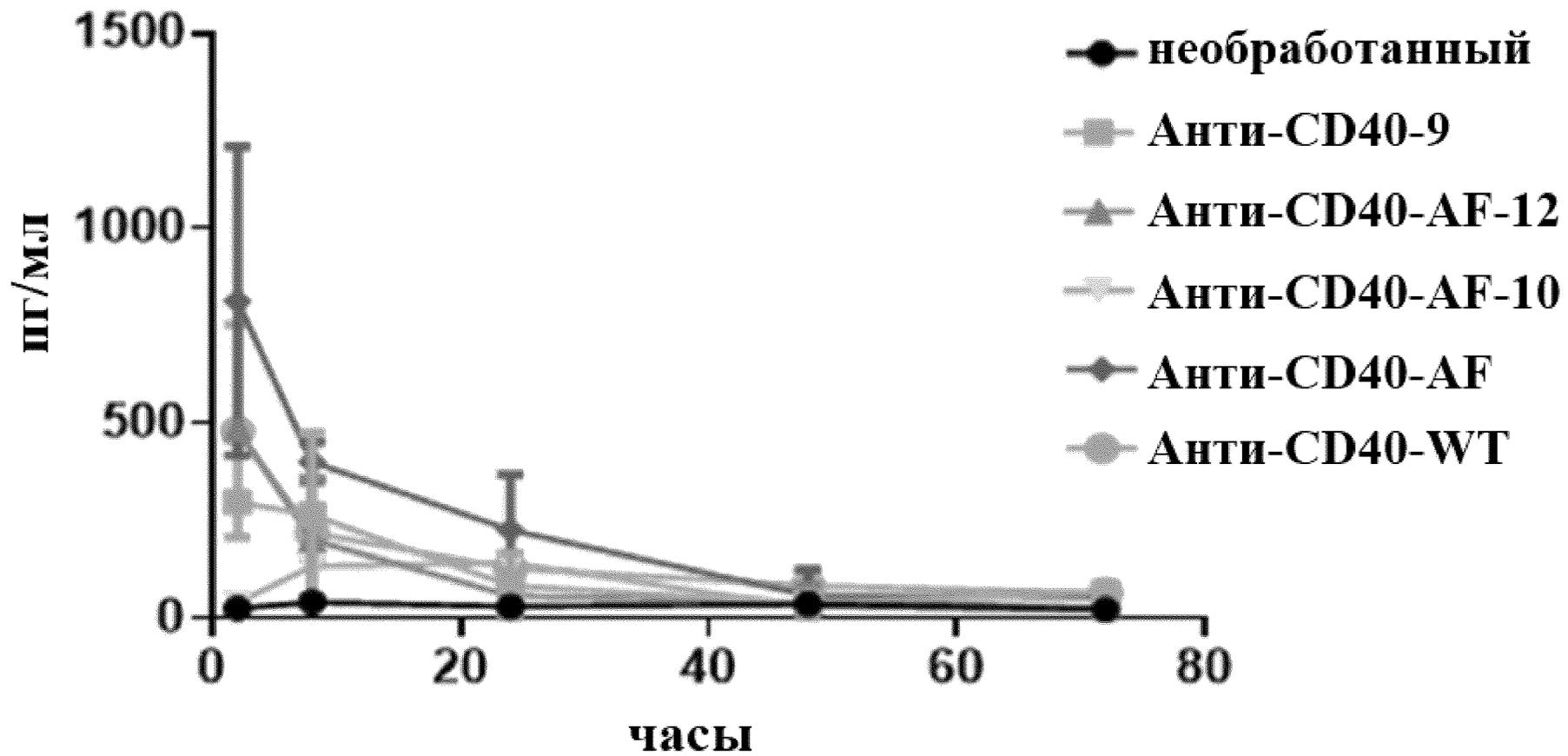
ФИГ. 6А





**ФИГ. 6С**

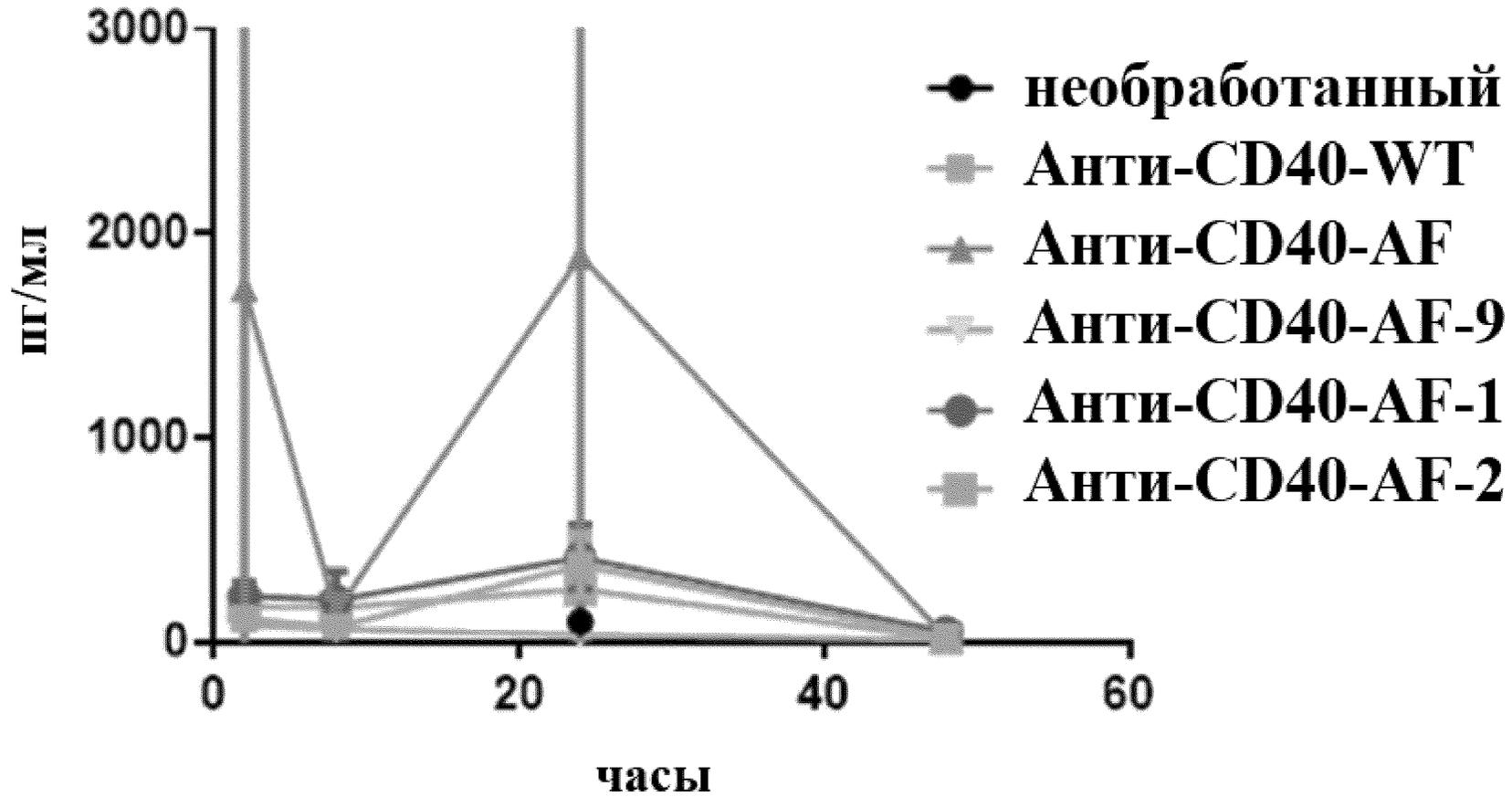
# MIP-1b



15/37

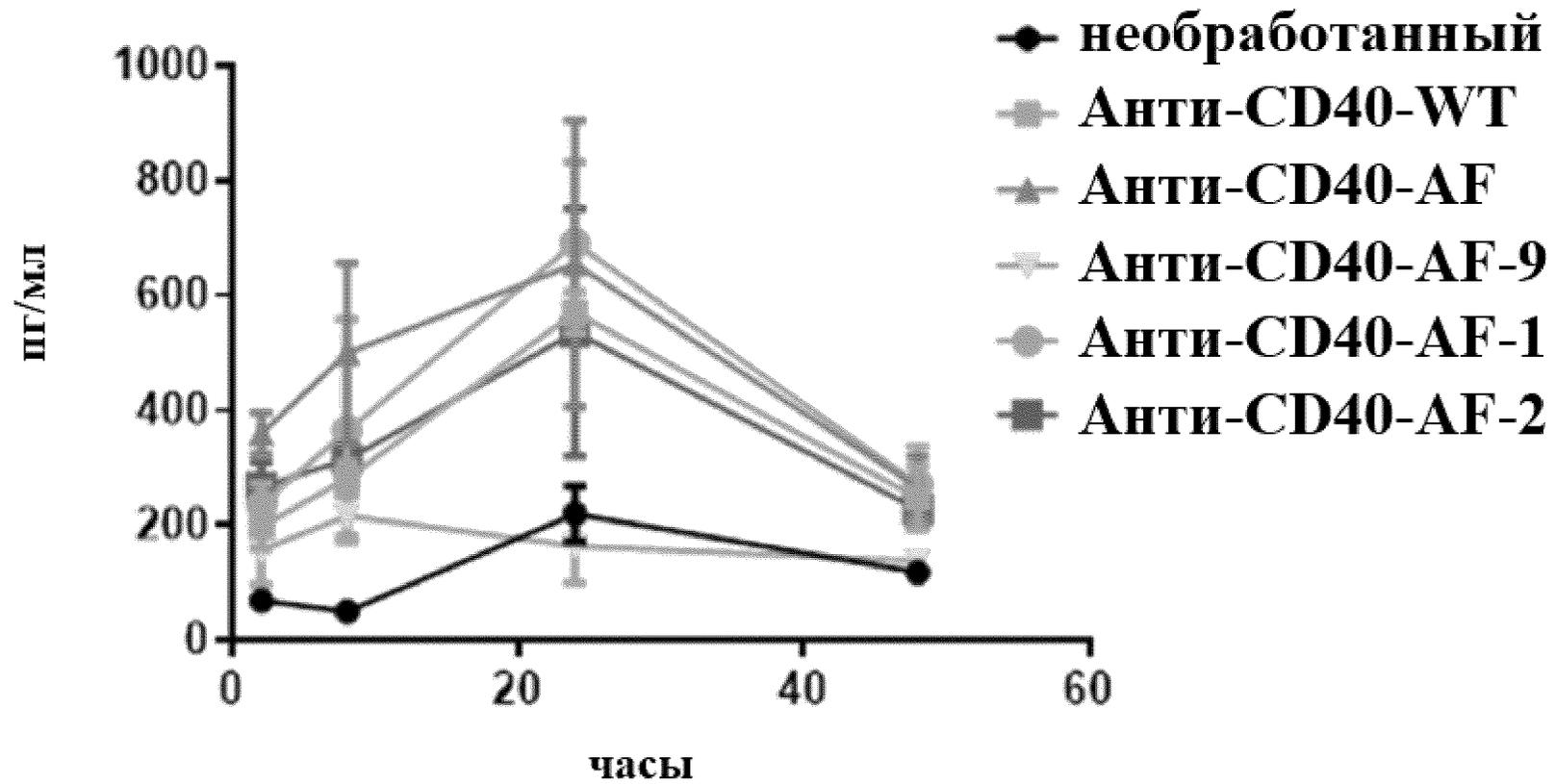
ФИГ. 6D

# МСР-1



ФИГ. 7А

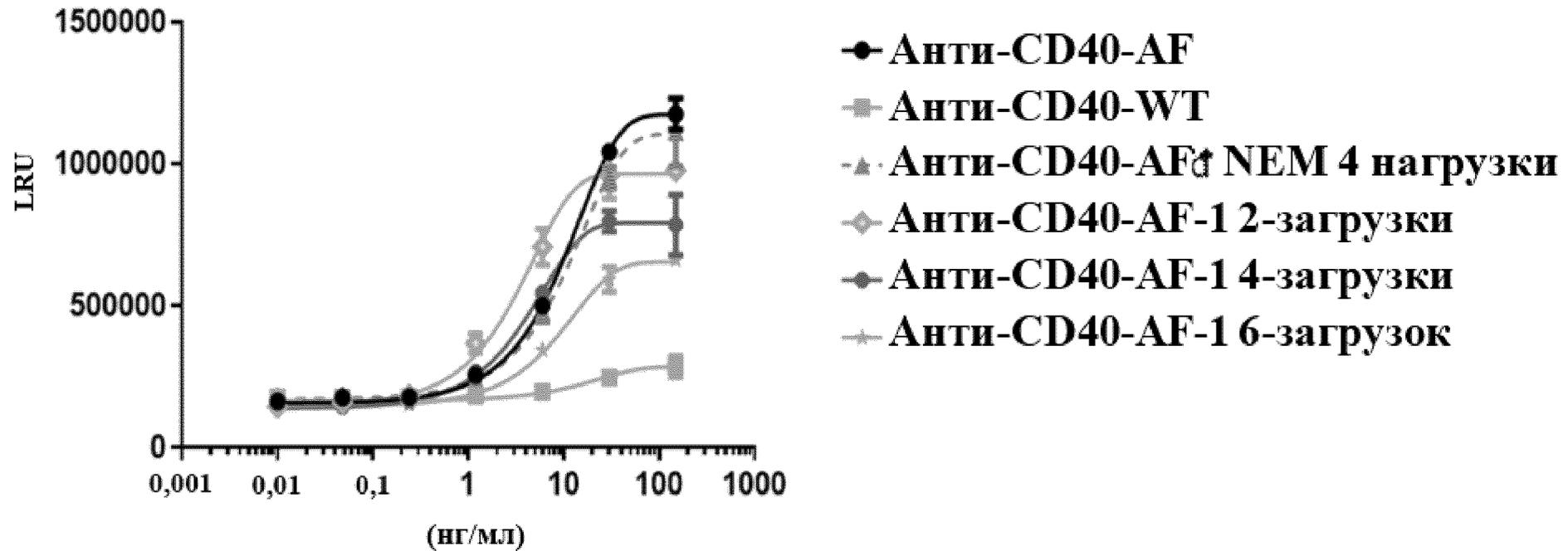
IP-10



17/37

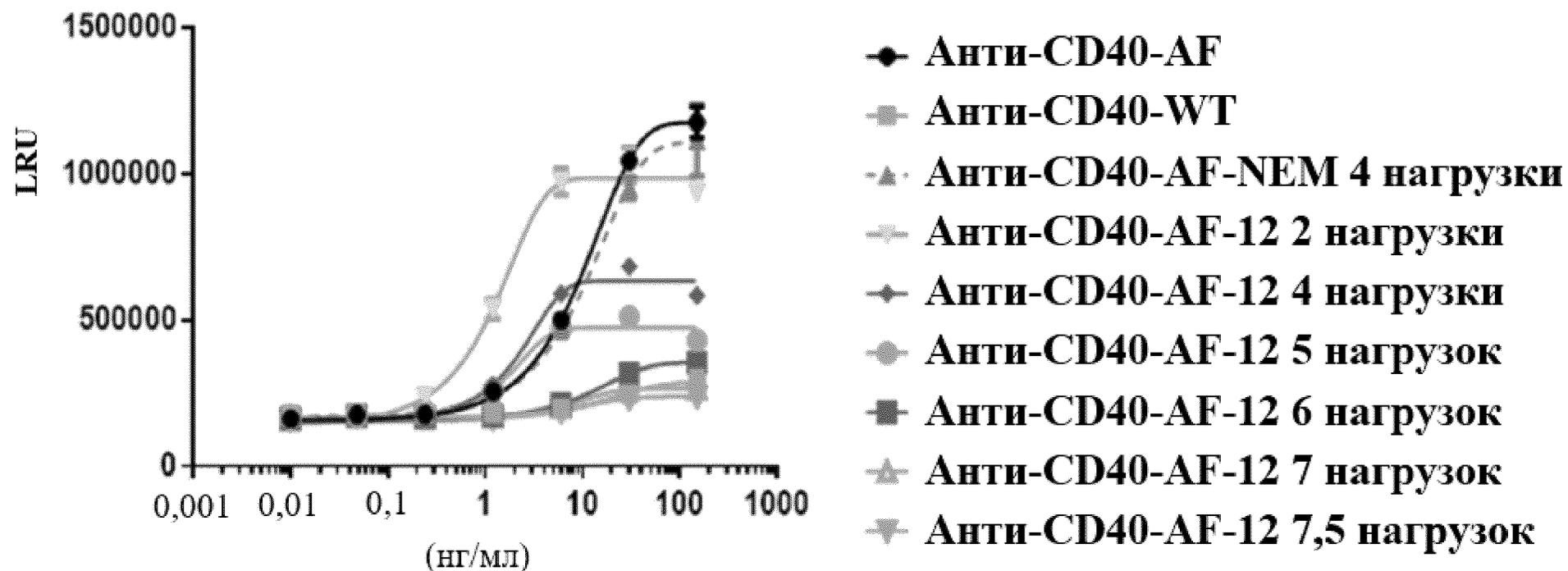
ФИГ. 7В

## Репортер FcγRIIIa NFAT



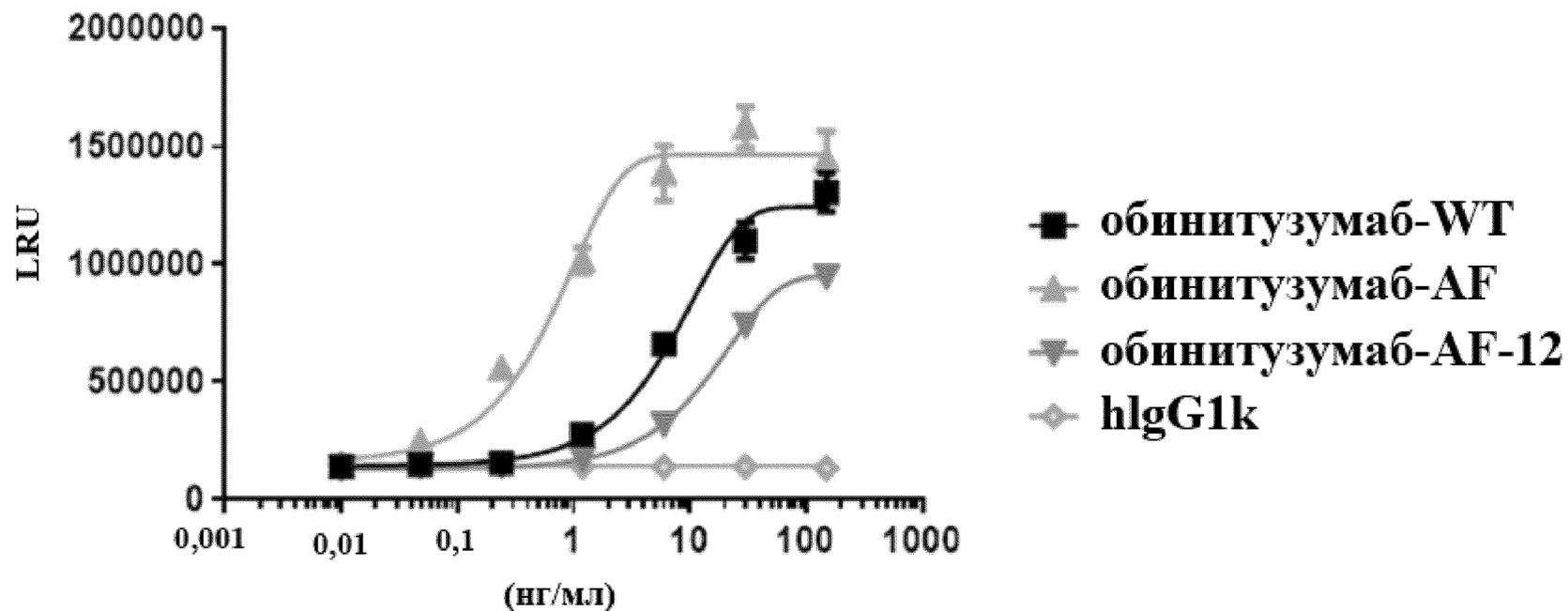
ФИГ. 8А

### Репортер FcγRIIIa NFAT



ФИГ. 8В

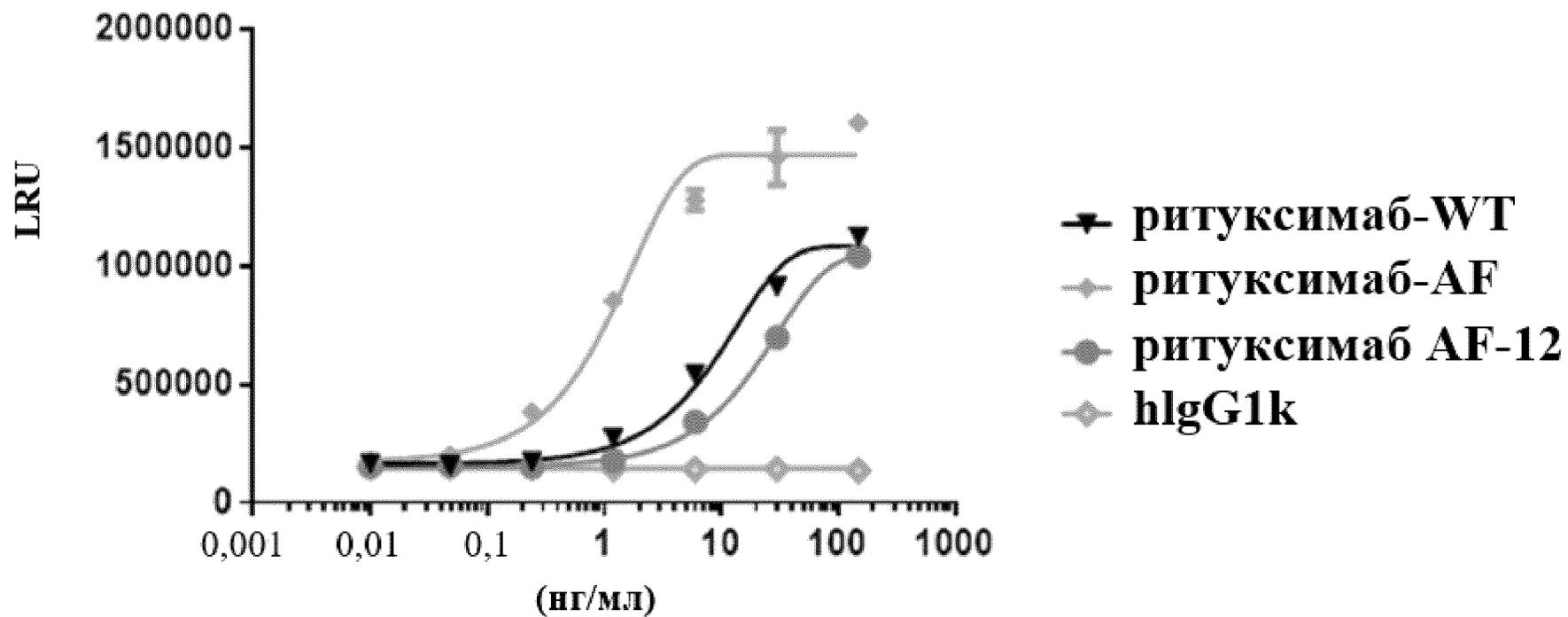
Репортерный анализ FcγRIIIa NFAT



20/37

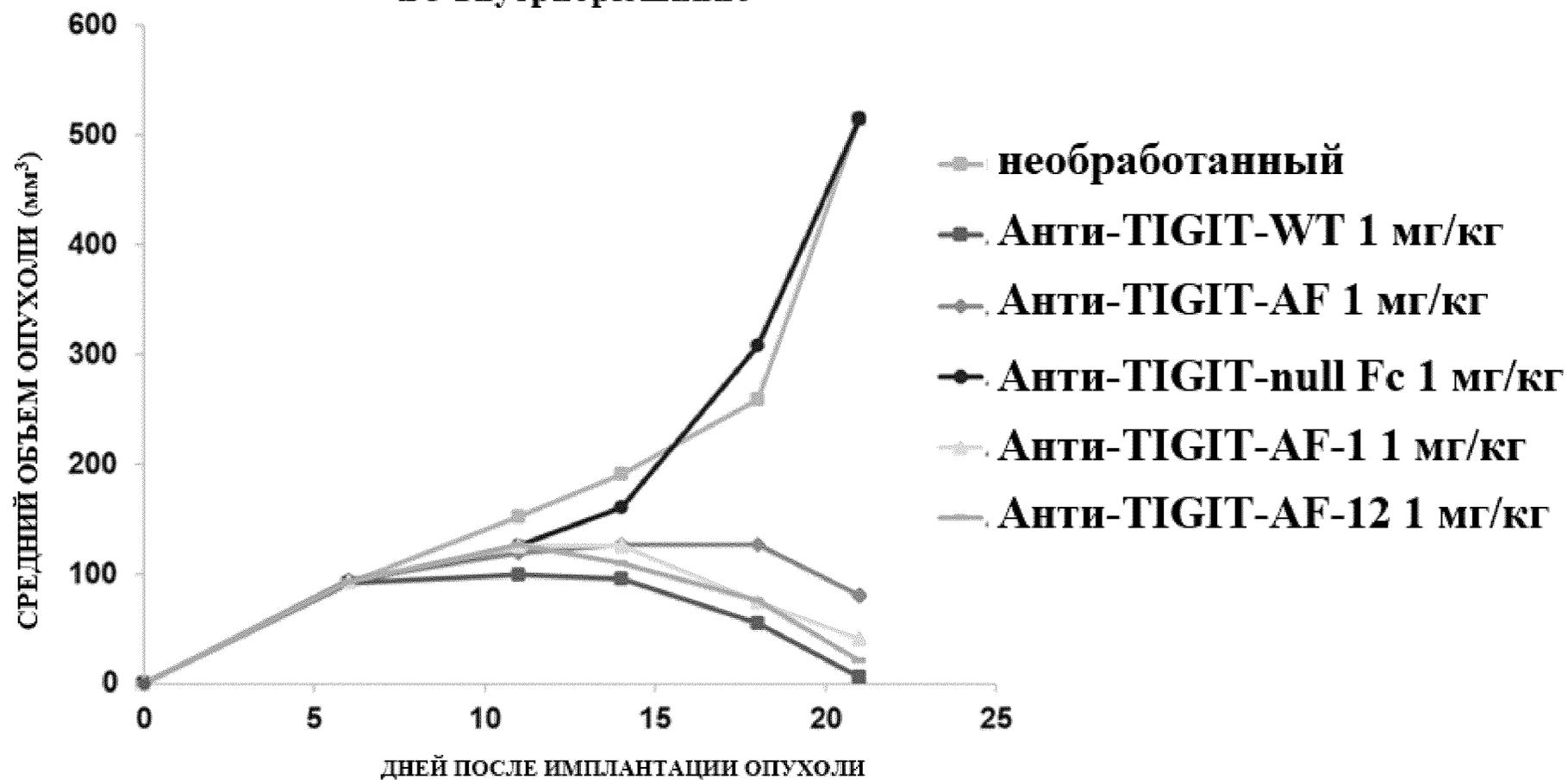
ФИГ. 9А

### Репортерный анализ FcγRIIIa NFAT



ФИГ. 9В

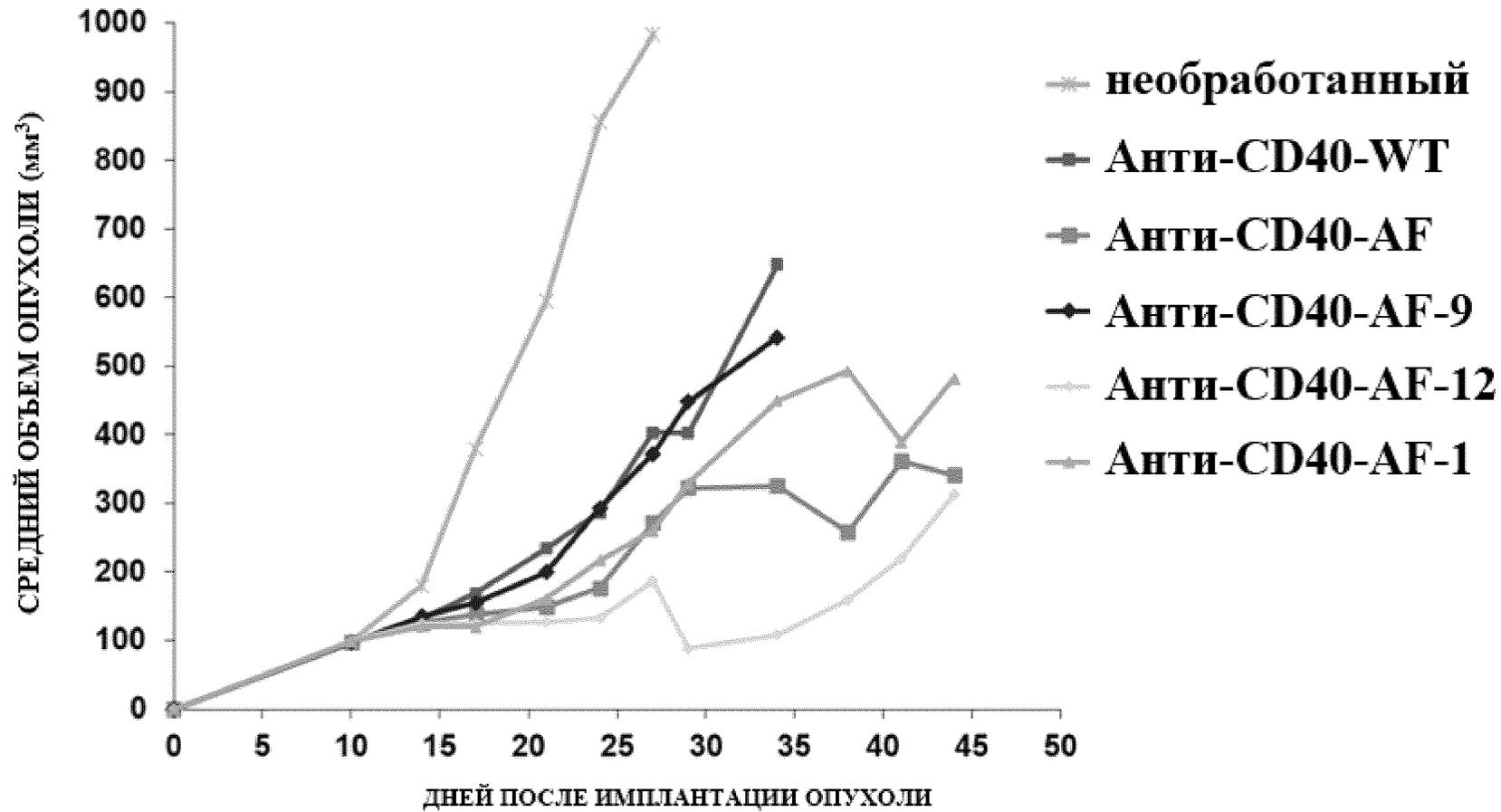
Модель СТ26WT 1 мг/кг каждые 3 дня  
x 3 внутривенно



22/37

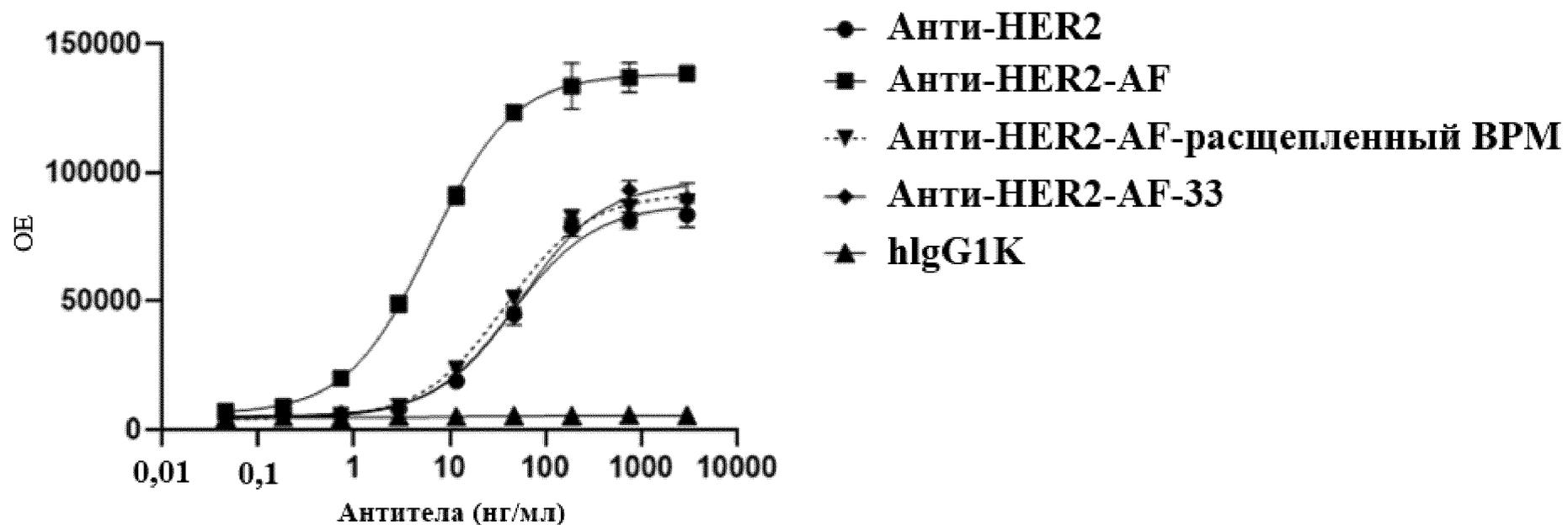
ФИГ. 10

Модель А20 1 мг/кг каждые 3  
дня x 3 внутрибрюшинно

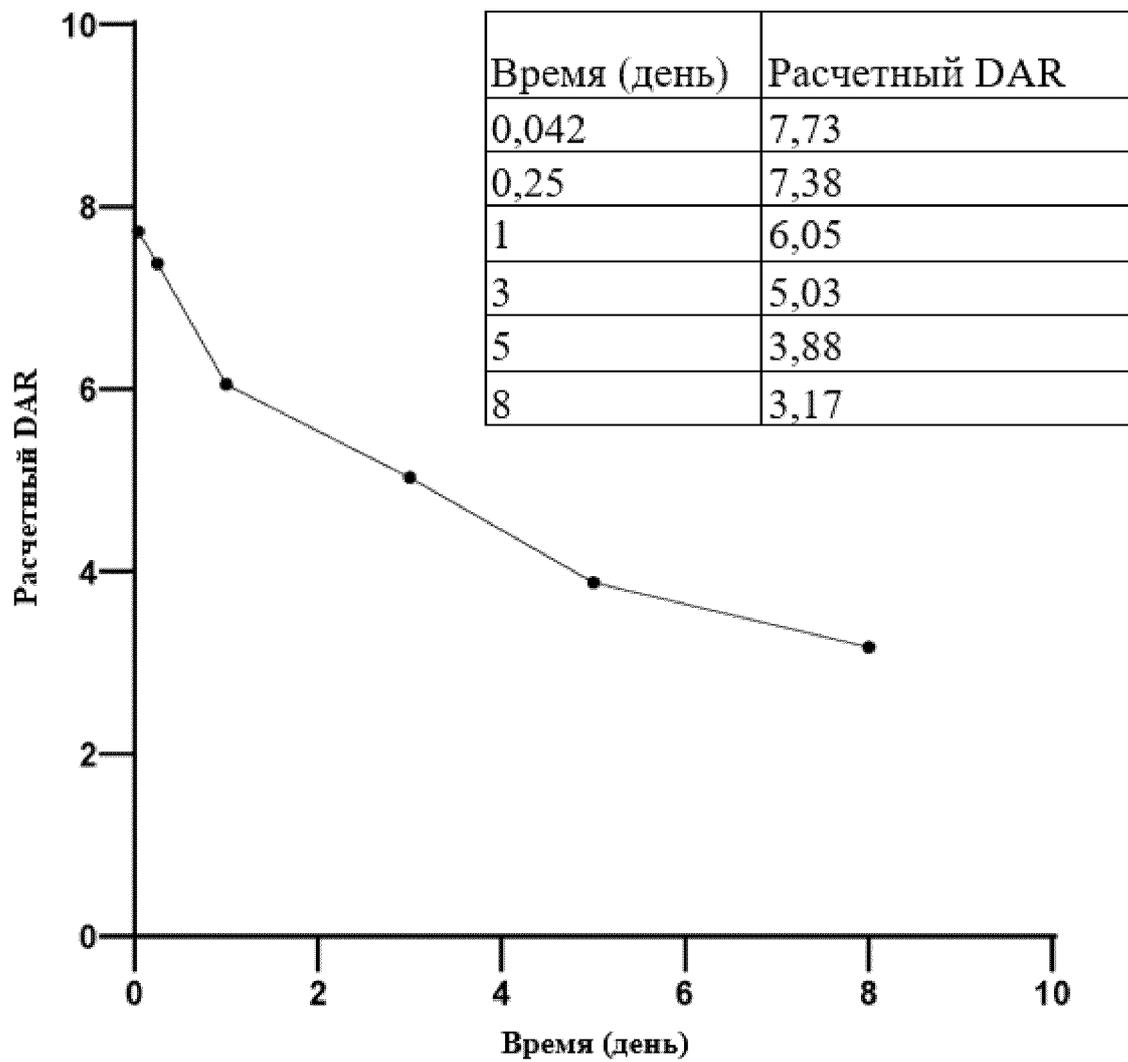


ФИГ. 11

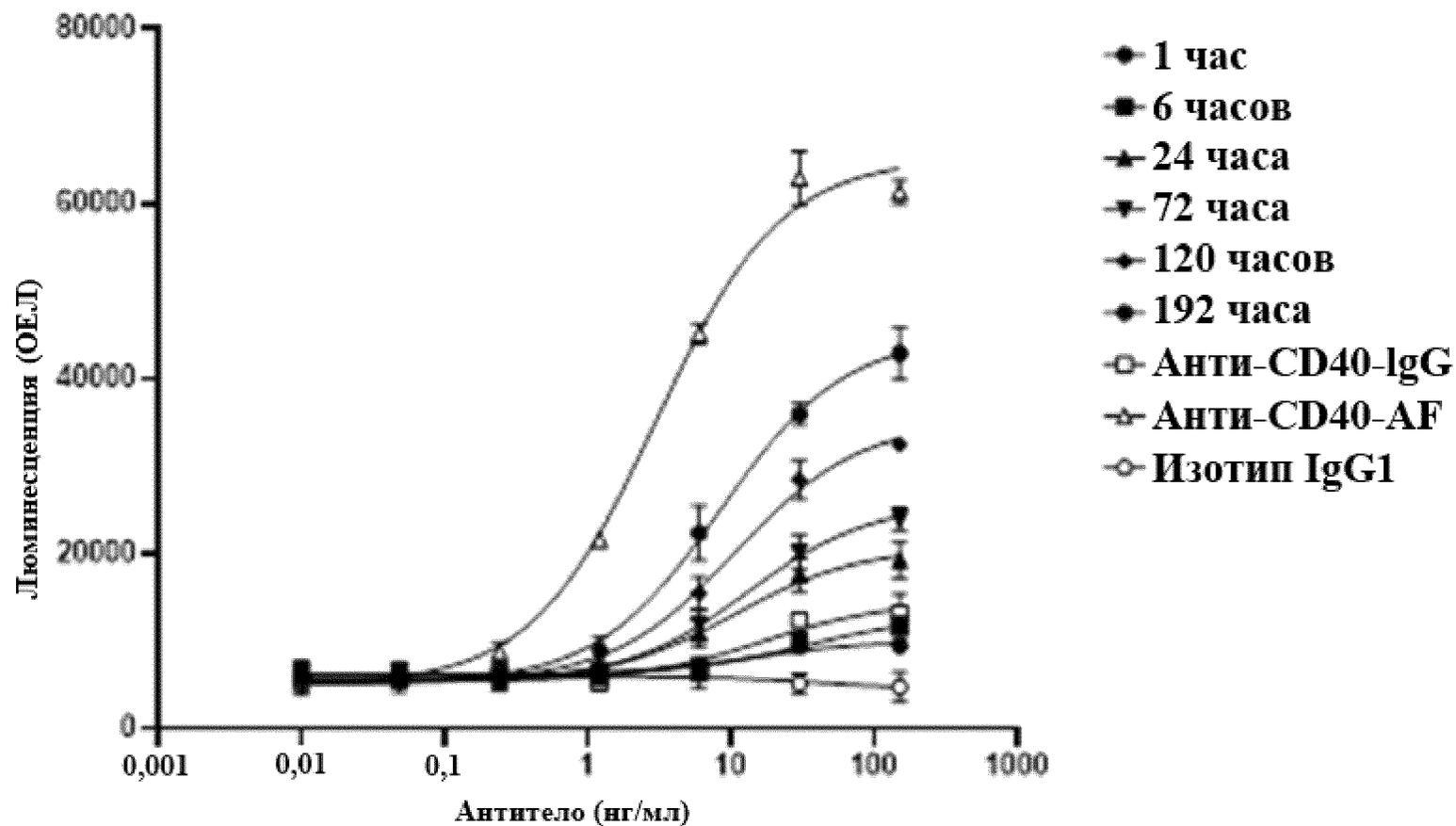
Jurkat-FcγR11a+ и SKBR3  
E:T = 7,5:1



ФИГ. 12

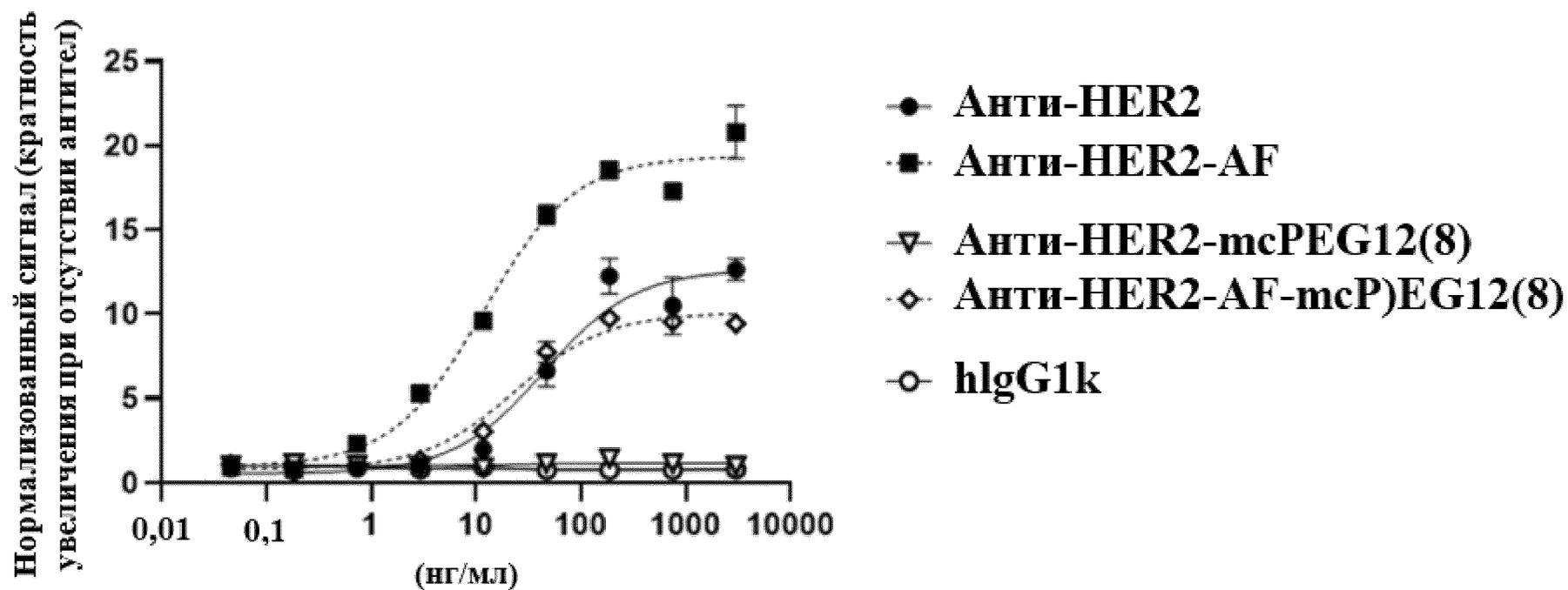
**АНТИ-CD40-AF-12 DAR по nSEC-MS****ФИГ. 13**

Крысиный фармакокинетический анализ  
Jurkat CD16a-WIL2-S NFAT (E:T=2:1),  
инкубация 5 часов



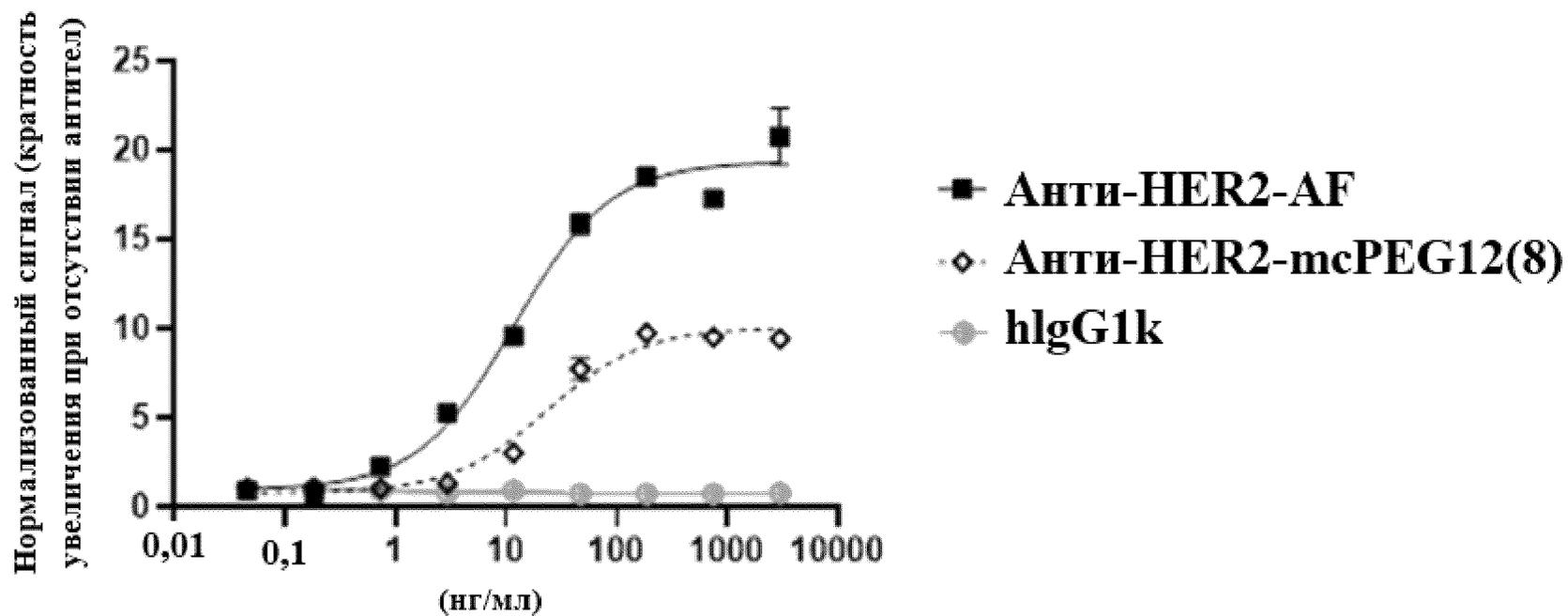
ФИГ. 14

Jurkat-FcγR111a+ и SKBR3 E:T = 7,5



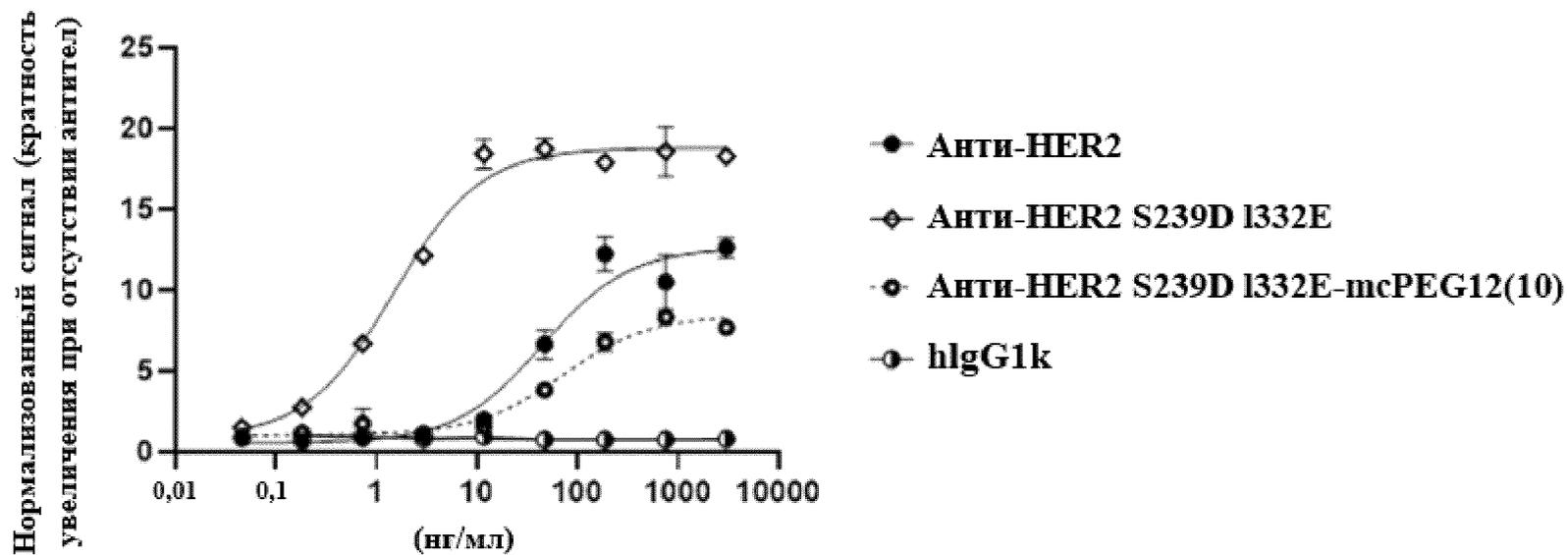
ФИГ. 15А

Jurkat-FcγRIIIa+ и SKBR3 E:T = 7,5



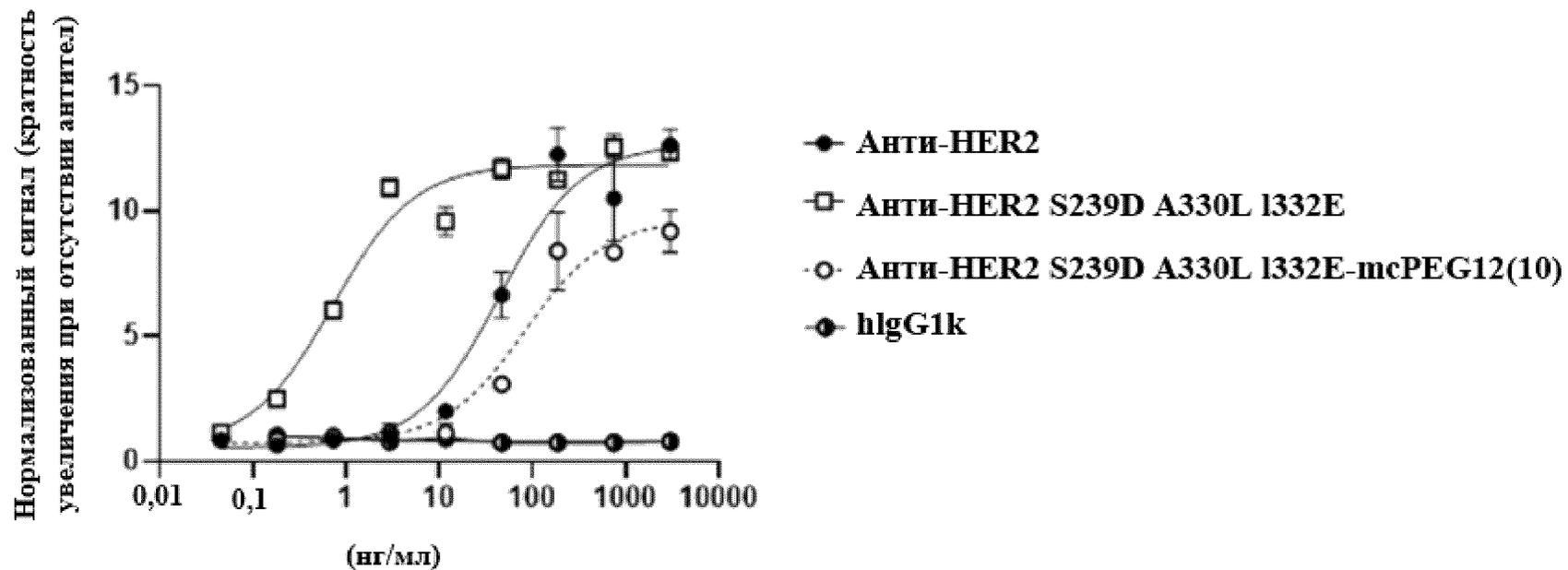
ФИГ. 15В

Jurkat-FcγR1a+ и SKBR3 E:T = 7,5



ФИГ. 15С

Jurkat-FcγR111a+ и SKBR3 E:T = 7,5

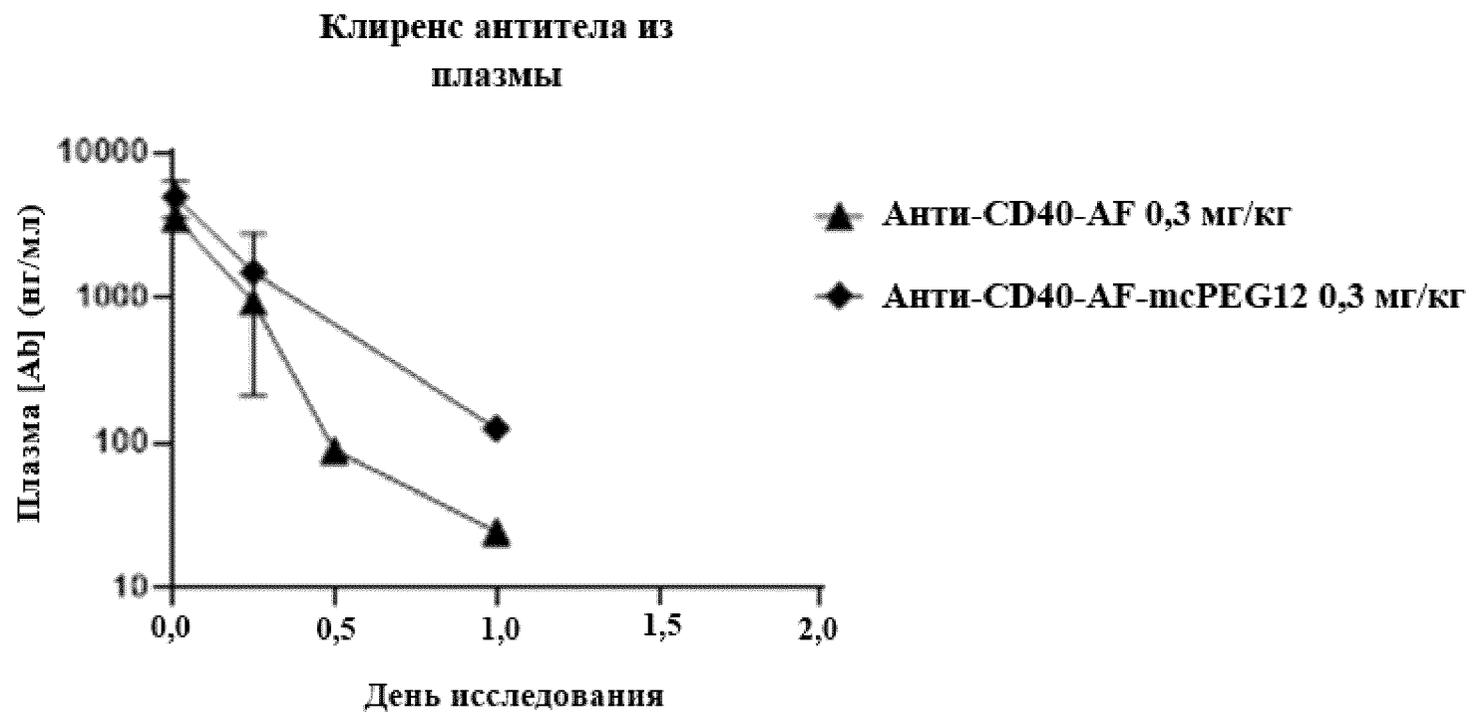


ФИГ. 15D

# МСР-1

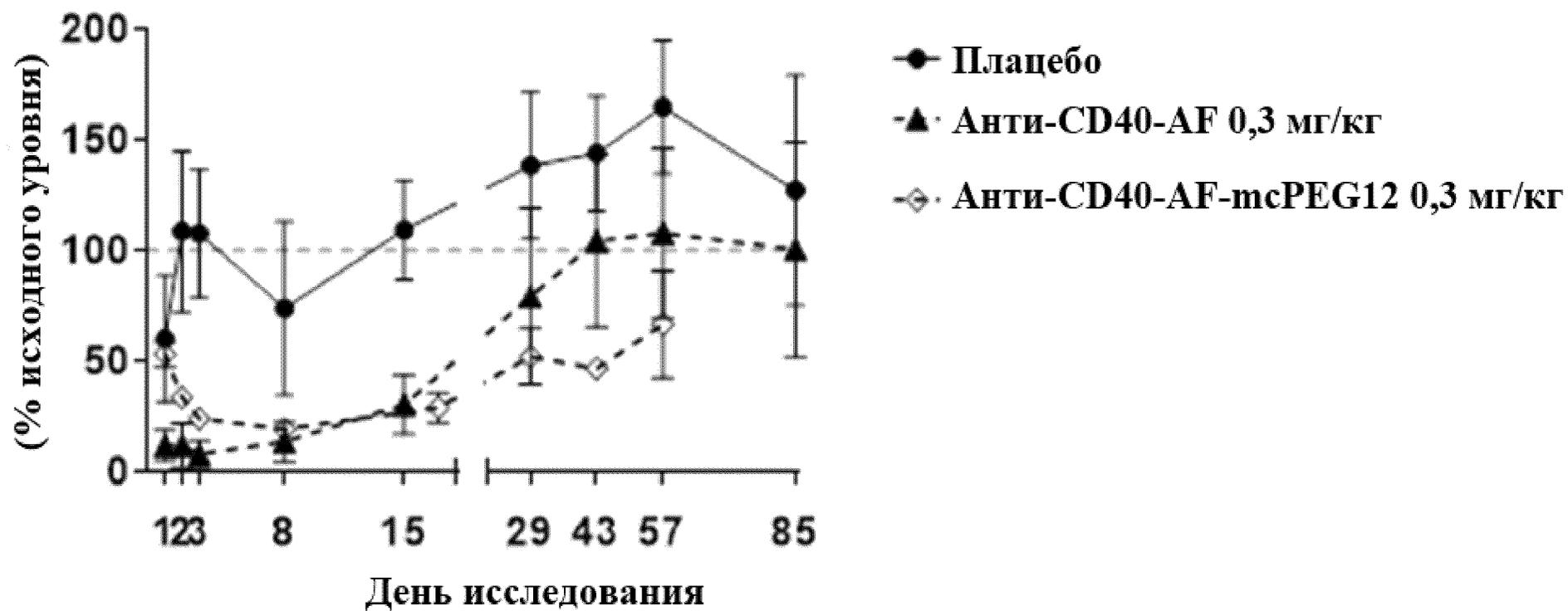


ФИГ. 16



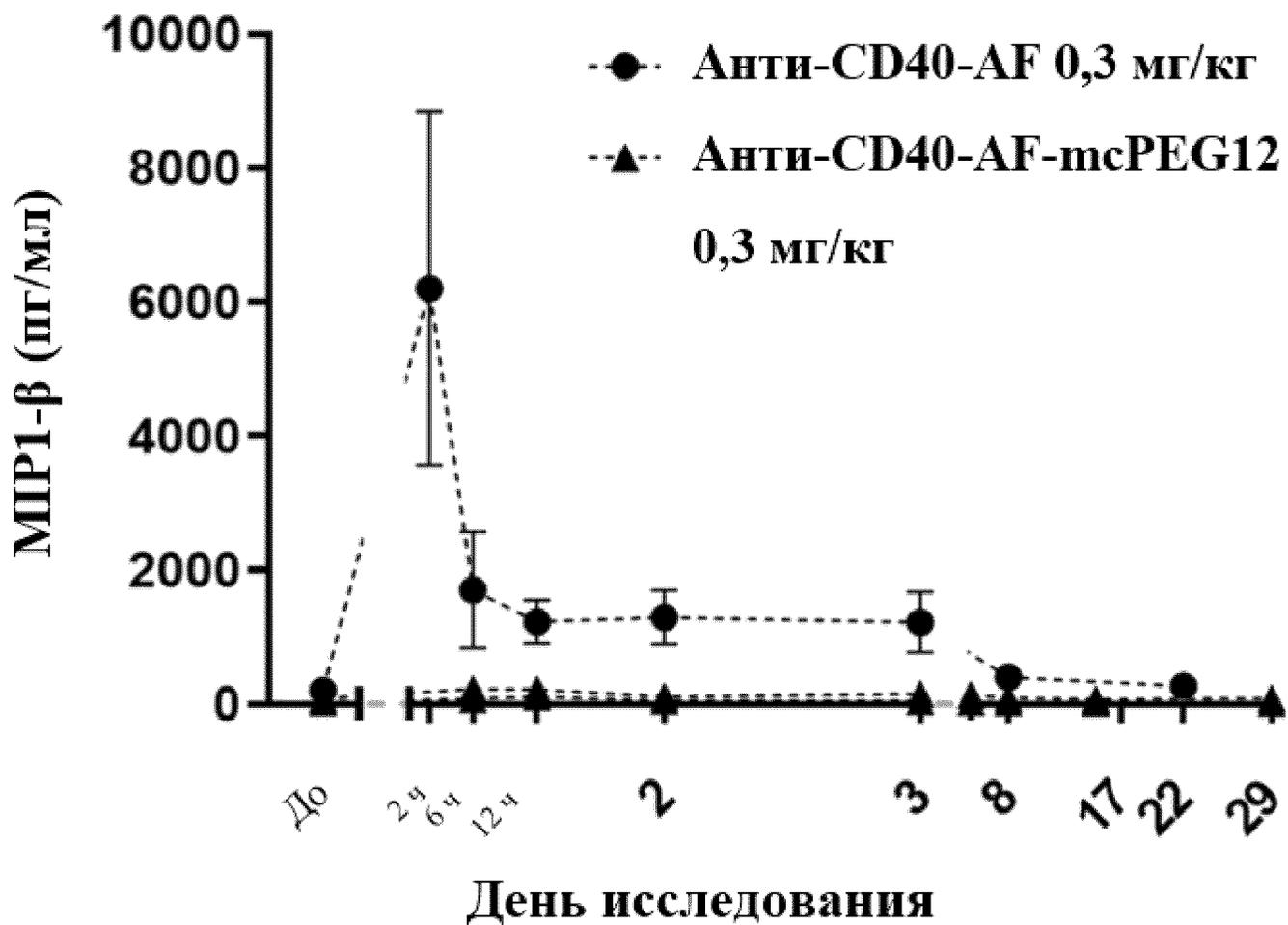
**ФИГ. 17**

### Всего В-клеток

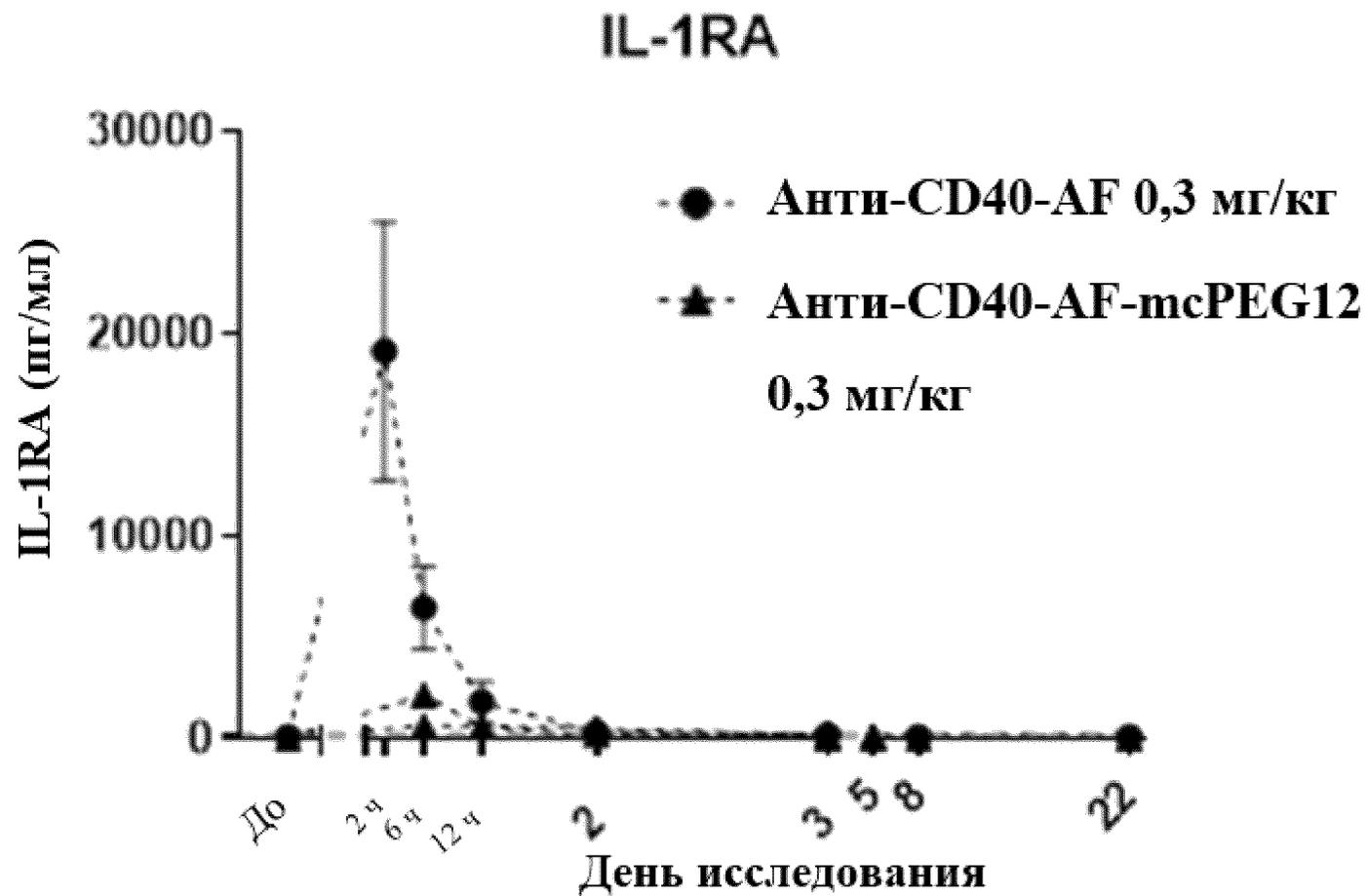


ФИГ. 18

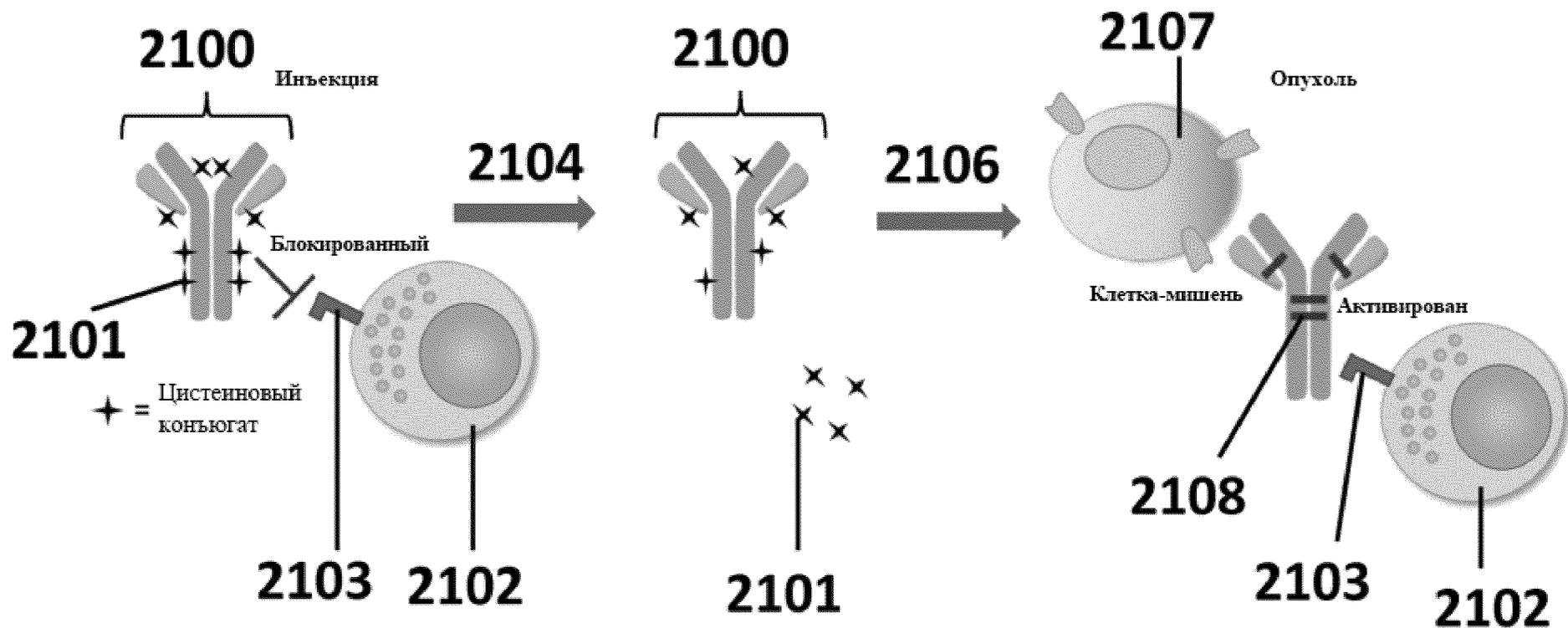
# MIP-1 $\beta$



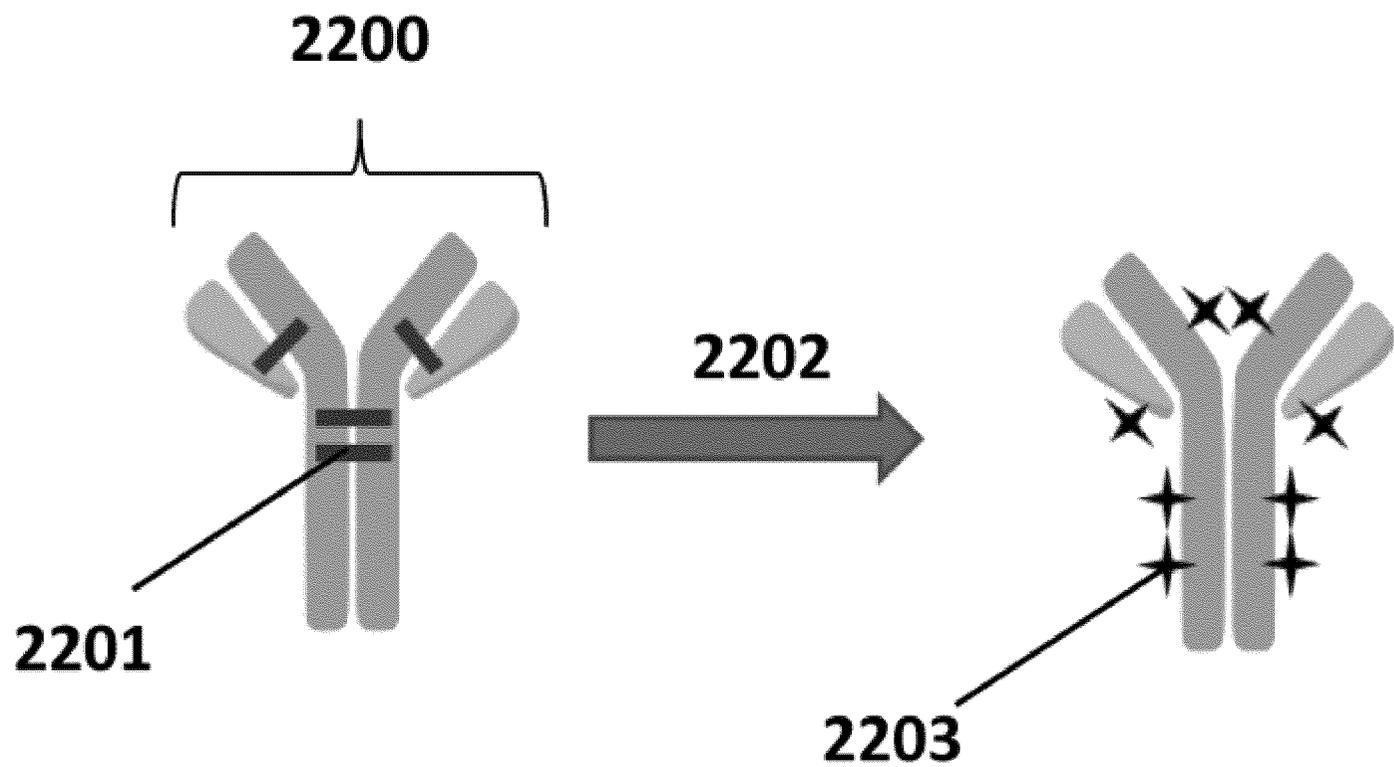
ФИГ. 19



**ФИГ. 20**



**ФИГ. 21**



ФИГ. 22