

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202393368 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.04.10

(22) Дата подачи заявки  
2022.07.14

(51) Int. Cl. C07K 16/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01)

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА, СПЕЦИФИЧНО СВЯЗЫВАЮЩАЯСЯ С  
HGFR И EGFR, И ЕЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202110794137.9

(32) 2021.07.14

(33) CN

(86) PCT/CN2022/105714

(87) WO 2023/284829 2023.01.19

(71) Заявитель:

ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛС КО.,  
ЛТД.; ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:

Е Синь, Сунь Лэ, Чжан Вэйвэй, Тао  
Вэйкан (CN)

(74) Представитель:

Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.,  
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)

(57) Антигенсвязывающая молекула, специфично связывающаяся с HGRF (рецептор фактора роста гепатоцитов) и EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), и ее фармацевтическое применение. Антигенсвязывающая молекула может быть использована для лечения заболеваний, связанных с опухолью.

A1

202393368

202393368

A1

## АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА, СПЕЦИФИЧНО СВЯЗЫВАЮЩАЯСЯ С HGFR И EGFR, И ЕЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Настоящая заявка испрашивает приоритет по заявке на патент Китая № 202110794137.9, поданной 14 июля 2021 года.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, и, в частности, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле и ее применению.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Изложенное в настоящем документе представляет собой лишь общую информацию, относящуюся к настоящему изобретению, и необязательно может представлять собой известный уровень техники.

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и рецептор фактора роста гепатоцитов (HGFR) представляют собой две рецепторные тирозинкиназы, которые обычно и высоко экспрессируются в различных опухолевых клетках, таких как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), колоректальный рак (CRC), рак головы и шеи (HNC) и тому подобное.

Сигнальный путь EGFR играет важную роль в биологии опухоли, регулируя пролиферацию клеток, ангиогенез, метастазирование и выживание раковых клеток, так что нарушение регуляции этого пути приводит к онкогенезу. HGFR также связан с развитием многих опухолей из-за сверхэкспрессии HGFR, активирующих мутаций и аномальной активации сигнала, вызванной аутокринной или паракринной трансдукцией сигнала или амплификацией гена. Важная связь между сигнальными путями EGFR и HGFR была обнаружена при исследовании эффективности лечения рака.

На NSCLC приходится 83% всех случаев рака легких, и активирующие мутации EGFR, являются наиболее распространенным типом (10-15% для белых, 50% для азиатов). Ингибиторы тирозинкиназы EGFR (TKI) использовались в качестве терапии первой линии при NSCLC. Несмотря на высокие показатели первоначального ответа (70-80%), резистентность обычно возникает в течение года. Существует два основных механизма лекарственной устойчивости. Одним из них является возникновение другой мутации EGFR, такой как EGFR T790M, а другим - компенсаторная активация сигнального пути HGFR. Оба эти фактора влияют на терапевтические эффекты опухоли.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, содержащей по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент 1, специфически связывающийся с HGFR, и по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, содержащей по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент 1, специфически связывающийся с HGFR, и по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR, где

антигенсвязывающий фрагмент 1 содержит вариабельную область тяжелой цепи M-VH (VH, специфически связывающаяся с HGFR) и вариабельную область легкой цепи M-VL, где M-VH содержит M-HCDR1 (определяющая комплементарность область тяжелой цепи 1, специфично связывающаяся с HGFR), M-HCDR2 и M-HCDR3, и M-VL содержит M-LCDR1 (определяющая комплементарность область легкой цепи 1, специфически связывающаяся с HGRF), M-LCDR2 и M-LCDR3, где:

(i) M-HCDR1, M-HCDR2 и M-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 16, соответственно, и M-LCDR1, M-LCDR2 и M-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 17, соответственно; или

(ii) M-HCDR1, M-HCDR2 и M-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 12, соответственно, и M-LCDR1, M-LCDR2 и M-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 13, соответственно; или

(iii) M-HCDR1, M-HCDR2 и M-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 14, соответственно, и M-LCDR1, M-LCDR2 и M-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 15, соответственно;

антигенсвязывающий фрагмент 2 содержит вариабельную область тяжелой цепи E-VH и вариабельную область легкой цепи E-VL, где E-VH содержит E-HCDR1, E-HCDR2 и E-HCDR3, и E-VL содержит E-LCDR1, E-LCDR2 и E-LCDR3, где E-HCDR1, E-HCDR2 и E-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 3, соответственно, и E-LCDR1, E-LCDR2 и E-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные

в SEQ ID NO: 5, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула, описанная выше, где M-HCDR1, M-HCDR2, M-HCDR3, M-LCDR1, M-LCDR2, M-LCDR3, E-HCDR1, E-HCDR2, E-HCDR3, E-LCDR1, E-LCDR2, E-LCDR3, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату, по IMGT, по Чотиа, по AbM или по контакту.

В некоторых вариантах осуществления M-HCDR1, M-HCDR2, M-HCDR3, M-LCDR1, M-LCDR2, M-LCDR3, E-HCDR1, E-HCDR2, E-HCDR3, E-LCDR1, E-LCDR2, E-LCDR3, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула, описанная выше, где M-HCDR1, M-HCDR2, M-HCDR3, M-LCDR1, M-LCDR2, M-LCDR3, E-HCDR1, E-HCDR2, E-HCDR3, E-LCDR1, E-LCDR2, E-LCDR3, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 определены в соответствии со схемой нумерации по IMGT.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула, описанная выше, где M-HCDR1, M-HCDR2, M-HCDR3, M-LCDR1, M-LCDR2, M-LCDR3, E-HCDR1, E-HCDR2, E-HCDR3, E-LCDR1, E-LCDR2, E-LCDR3, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 определены в соответствии со схемой нумерации по Чотиа.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула, описанная выше, где M-HCDR1, M-HCDR2, M-HCDR3, M-LCDR1, M-LCDR2, M-LCDR3, E-HCDR1, E-HCDR2, E-HCDR3, E-LCDR1, E-LCDR2, E-LCDR3, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 определены в соответствии со схемой нумерации по AbM.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула, описанная выше, где M-HCDR1, M-HCDR2, M-HCDR3, M-LCDR1, M-LCDR2, M-LCDR3, E-HCDR1, E-HCDR2, E-HCDR3, E-LCDR1, E-LCDR2, E-LCDR3, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 определены в соответствии со схемой нумерации по контакту.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где M-HCDR1, M-HCDR2, M-HCDR3, M-LCDR1, M-LCDR2 и M-LCDR3 определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату, где

(i) M-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, M-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, M-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, M-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, M-LCDR2

содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, и M-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, или

(ii) M-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, M-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, M-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, M-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, M-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, и M-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, или

(iii) M-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, M-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, M-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, M-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, M-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, и M-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29; и

E-HCDR1, E-HCDR2, E-HCDR3, E-LCDR1, E-LCDR2 и E-LCDR3 определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату, E-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, E-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, E-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, E-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, E-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и E-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где антигенсвязывающий фрагмент 1 специфически связывается с HGFR, его M-VH имеет: M-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, M-HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и M-HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и его M-VL имеет: M-LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, M-LCDR2, содержащую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, и M-LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; и

в антигенсвязывающем фрагменте 2, специфически связывающемся с EGFR, его E-VH имеет: E-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, E-HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и E-HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и его E-VL имеет: E-LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, E-LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и E-LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, содержит два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающихся с HGFR, где в одном из антигенсвязывающих фрагментов 1 его M-VH имеет: M-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, M-HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, и M-HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и его M-VL, имеет: M-LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, M-LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, и M-LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29; в другом антигенсвязывающем фрагменте 1, его M-VH имеет: M-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, M-HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и M-HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и его M-VL имеет: M-LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, M-LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, и M-LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; и

антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR, где в антигенсвязывающем фрагменте 2 его E-VH имеет: E-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, E-HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и E-HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:

8, и его E-VL имеет: E-LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, E-LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и E-LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула, описанная выше, где M-HCDR1, M-HCDR2, M-HCDR3, M-LCDR1, M-LCDR2, M-LCDR3, E-HCDR1, E-HCDR2, E-HCDR3, E-LCDR1, E-LCDR2 и E-LCDR3 определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где:

(i) M-VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 16, и M-VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 17, или

M-VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 12, и M-VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 13, или

M-VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 14, и M-VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 15 и/или

(ii) E-VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 3, и E-VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие молекулы, описанные выше, эквивалентны по следующим функциям, включая связывание с одним и тем же эпитопом, имеющим одинаковую аффинность (например, в пределах  $KD \pm 50\%$  (равновесная константа диссоциации)), или другим функциям, описанным в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где:

(i) M-VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO: 16, и M-VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, или

M-VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и M-VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, или

M-VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и M-VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15 и/или

(ii) E-VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и E-VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где:

(i) антигенсвязывающая молекула содержит два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающихся с HGFR, где M-VH одного из антигенсвязывающих фрагментов 1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, и M-VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17; M-VH другого антигенсвязывающего фрагмента 1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и M-VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; и E-VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и E-VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или

(ii) антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент 1, специфически связывающийся с HGFR, и по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR, где E-VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, E-VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, M-VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и M-VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, содержит два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающихся с HGFR, антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR, и Fc-область, где Fc-область содержит первую субъединицу Fc1 и вторую субъединицу Fc2, способные связываться друг с другом.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент 2,



специфически связывающийся с EGFR, представляет собой Fv, специфически связывающийся с EGFR; два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающиеся с HGFR, представляют собой первый Fab, специфически связывающийся с HGFR, и замещенный Fab, специфически связывающийся с HGFR, соответственно; замещенный Fab содержит M-VH, M-VL, цепь титина и цепь обскурина, причем цепь титина и цепь обскурина способны образовывать димер, где С-конец M-VH замещенного Fab слит с N-концом цепи титина напрямую или через линкер, и С-конец M-VL замещенного Fab слит с N-концом цепи обскурина напрямую или через линкер, или С-конец M-VH замещенного Fab слит с N-концом цепи обскурина напрямую или через линкер, и С-конец M-VL замещенного Fab слит с N-концом цепи титина напрямую или через линкер.

В некоторых вариантах осуществления С-конец E-VH Fv, специфически связывающегося с EGFR, слит с N-концом тяжелой цепи первого Fab, специфически связывающегося с HGFR, напрямую или через линкер, С-конец E-VL Fv, специфически связывающегося с EGFR, слит с N-концом легкой цепи первого Fab, специфически связывающегося с HGFR, напрямую или через линкер, С-конец тяжелой цепи первого Fab, специфически связывающегося с HGFR, слит с N-концом Fc1 напрямую или через линкер, и С-конец цепи титина или С-конец цепи обскурина слит с N-концом Fc2 напрямую или через линкер. В некоторых вариантах осуществления M-VH замещенного Fab находится на той же цепи, что и Fc2.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, содержит антигенсвязывающий фрагмент 1, специфически связывающийся с HGFR, антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR, и Fc-область, где Fc-область содержит первую субъединицу Fc1 и вторую субъединицу Fc2, способные связываться друг с другом. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент 1 представляет собой Fab; антигенсвязывающий фрагмент 2 представляет собой замещенный Fab, содержащий E-VH, E-VL, цепь титина и цепь обскурина, причем цепь титина и цепь обскурина способны образовывать димер, где С-конец E-VH слит с N-концом цепи титина напрямую или через линкер, и С-конец E-VL слит с N-концом цепи обскурина напрямую или через линкер, или С-конец E-VH слит с N-концом цепи обскурина напрямую или через линкер, и С-конец E-VL слит с N-концом цепи титина напрямую или через линкер. В некоторых вариантах осуществления С-конец тяжелой цепи Fab, специфически связывающегося с HGFR, слит с N-концом Fc1 напрямую или через линкер, и С-конец цепи титина или С-конец цепи обскурина слит с N-концом Fc2 напрямую или через линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения E-VH находится на той же цепи, что и Fc2.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, содержит Fc-область, где Fc-область предпочтительно представляет собой Fc-область IgG, более предпочтительно Fc-область IgG<sub>1</sub>. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит первую субъединицу Fc1 и вторую субъединицу Fc2, способные связываться друг с другом, и каждый из Fc1 и Fc2 независимо имеет одну или более аминокислотных замен, которые уменьшают гомодимеризацию Fc-области.

В некоторых вариантах осуществления: (i) Fc1 имеет структуру выступа в соответствии с механизмом «выступ-во-впадину», а Fc2 имеет структуру впадины в соответствии с механизмом «выступ-во-впадину»; предпочтительно, Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой W, Fc2 содержит аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой S, аминокислотный остаток в положении 368, представляющий собой A, и аминокислотный остаток в положении 407, представляющий собой V, и положения аминокислотных остатков пронумерованы в соответствии с EU-индексом; и/или (ii) между первой субъединицей Fc1 и второй субъединицей Fc2 присутствует сконструированная дисульфидная связь; предпочтительно, Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 354, представляющий собой C, Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 349, представляющий собой C, и положения аминокислотных остатков пронумерованы в соответствии с EU-индексом; более предпочтительно, Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 354, представляющий собой C, аминокислотный остаток в положении 356, представляющий собой E, аминокислотный остаток в положении 358, представляющий собой M, и аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой W, Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 349, представляющий собой C, аминокислотный остаток в положении 356, представляющий собой E, аминокислотный остаток в положении 358, представляющий собой M, аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой S, аминокислотный остаток в положении 368, представляющий собой A, и аминокислотный остаток в положении 407, представляющий собой V, и положения аминокислотных остатков пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

В некоторых других вариантах осуществления (i) Fc2 имеет структуру выступа в соответствии с механизмом «выступ-во-впадину» и Fc1 имеет структуру впадины в соответствии с механизмом «выступ-во-впадину»; предпочтительно, Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой W, Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой S, аминокислотный остаток в положении 368, представляющий собой A, и аминокислотный остаток в

положении 407, представляющий собой V и аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом; и/или (ii) между первой субъединицей Fc2 и второй субъединицей Fc1 присутствует сконструированная дисульфидная связь; предпочтительно, Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 354, представляющий собой C, Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 349, представляющий собой C, и положения аминокислотных остатков пронумерованы в соответствии с EU-индексом; более предпочтительно, Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 354, представляющий собой C, аминокислотный остаток в положении 356, представляющий собой E, аминокислотный остаток в положении 358, представляющий собой M, и аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой W, Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 349, представляющий собой C, аминокислотный остаток в положении 356, представляющий собой E, аминокислотный остаток в положении 358, представляющий собой M, аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой S, аминокислотный остаток в положении 368, представляющий собой A, и аминокислотный остаток в положении 407, представляющий собой V, и аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

В некоторых вариантах осуществления Fc1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, и Fc2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где:

антигенсвязывающая молекула содержит: первую цепь, имеющую структуру формулы (a), вторую цепь, имеющую структуру формулы (b), третью цепь, имеющую структуру формулы (c), и четвертую цепь, имеющую структуру формулы (d), где

формула (a) представляет собой [E-VH]-[линкер 1]-[M-VH]-[CH1]-[Fc1] (CH1 – константный домен 1 тяжелой цепи),

формула (b) представляет собой [E-VL]-[линкер 2]-[M-VL]-[CL] (CL - константная область легкой цепи),

формула (c) представляет собой [M-VH]-[линкер 3]-[цепь титина]-[Fc2] и

формула (d) представляет собой [M-VL]-[линкер 4]-[цепь обскурина].

В некоторых вариантах осуществления, линкеры в формуле (a), формуле (b), формуле (c) и формуле (d) представляют собой идентичные или различные пептидные линкеры. В некоторых вариантах осуществления каждый из пептидных линкеров независимо имеет структуру  $L_1-(GGGS)_n-L_2$ , где  $L_1$  представляет собой связь, A, GS, GGS или GGGS (SEQ ID NO: 116),  $n$  равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10,  $L_2$  представляет собой

связь, G, GG, GGG или GGGG (SEQ ID NO: 117), и пептидные линкеры не являются связями. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет длину 3-15 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления каждый из пептидных линкеров независимо имеет структуру (GGGS)<sub>n</sub>, где n равен 1, 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления линкеры в формуле (a), формуле (b), формуле (c) и формуле (d) содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105 или SEQ ID NO: 106. В некоторых вариантах осуществления линкеры в формуле (a) и формуле (b) содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105, и линкеры в формуле (c) и формуле (d) содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула имеет первую цепь, вторую цепь, третью цепь и четвертую цепь. В некоторых вариантах осуществления M-VH в формуле (a) и M-VH в формуле (c) не являются идентичными, и M-VL в формуле (b) и M-VL в формуле (d) не являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула имеет: первую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34, вторую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, третью цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и четвертую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, содержит: первую цепь, имеющую структуру формулы (e), вторую цепь, имеющую структуру формулы (f), третью цепь, имеющую структуру формулы (g), и четвертую цепь, имеющую структуру формулы (h), где

формула (e) представляет собой [M-VH]-[CH1]-[Fc1],

формула (f) представляет собой [M-VL]-[CL],

формула (g) представляет собой [E-VH]-[линкер 1]-[цепь титина]-[Fc2] и

формула (h) представляет собой [E-VL]-[линкер 2]-[цепь обскурина].

В некоторых вариантах осуществления линкеры в формуле (g) и формуле (h) представляют собой идентичные или различные пептидные линкеры. В некоторых вариантах осуществления каждый из пептидных линкеров независимо имеет структуру L<sub>1</sub>-(GGGS)<sub>n</sub>-L<sub>2</sub>, где L<sub>1</sub> представляет собой связь, A, GS, GGS или GGGS (SEQ ID NO: 116), n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, L<sub>2</sub> представляет собой связь, G, GG, GGG или GGGG (SEQ ID NO: 117), и пептидные линкеры не являются связями. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет длину 3-15 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления линкеры в формуле (h) и формуле (g) содержат

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула имеет: первую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, вторую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, третью цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40, и четвертую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, представляет собой биспецифическое антитело.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, содержащей Fv, первый Fab, замещенный Fab и Fc-область, где Fc-область содержит первую субъединицу Fc1 и вторую субъединицу Fc2, способные связываться друг с другом, Fv содержит вариабельную область тяжелой цепи Fv-VH и вариабельную область легкой цепи Fv-VL, первый Fab содержит вариабельную область тяжелой цепи Fab1-VH и вариабельную область легкой цепи Fab1-VL, и замещенный Fab содержит вариабельную область тяжелой цепи Fab-S-VH, вариабельную область легкой цепи Fab-S-VL, цепь титина и цепь обскурина, причем цепь титина и цепь обскурина способны образовывать димер; где:

С-конец Fab-S-VH слит с N-концом цепи титина напрямую или через линкер, и С-конец Fab-S-VL слит с N-концом цепи обскурина напрямую или через линкер, или С-конец Fab-S-VH слит с N-концом цепи обскурина напрямую или через линкер, и С-конец Fab-S-VL слит с N-концом цепи титина напрямую или через линкер и,

С-конец тяжелой цепи первого Fab слит с N-концом Fc1 напрямую или через линкер; С-конец Fv-VH Fv слит с N-концом тяжелой цепи первого Fab напрямую или через линкер, С-конец цепи титина или С-конец цепи обскурина слит с N-концом Fc2 напрямую или через линкер, и Fab-S-VH находится на той же цепи, что и Fc2;

В некоторых вариантах осуществления каждый из первого Fab и замещенного Fab независимо связываются с первым антигеном, и Fv связывается со вторым антигеном. В некоторых вариантах осуществления первый антиген представляет собой HGFR, а второй антиген представляет собой EGFR. В некоторых вариантах осуществления первый Fab и замещенный Fab связывают разные эпитопы первого антигена.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, содержит Fc-область, где Fc-область предпочтительно представляет собой Fc-область IgG, более предпочтительно Fc-область IgG<sub>1</sub>. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит первую

субъединицу Fc1 и вторую субъединицу Fc2, способные связываться друг с другом, и каждый из Fc1 и Fc2 независимо имеет одну или более аминокислотных замен, которые уменьшают гомодимеризацию Fc-области. В некоторых вариантах осуществления: (i) Fc1 имеет структуру выступа в соответствии с механизмом «выступ-во-впадину», а Fc2 имеет структуру впадины в соответствии с механизмом «выступ-во-впадину»; предпочтительно, Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой W, Fc2 содержит аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой S, аминокислотный остаток в положении 368, представляющий собой A, и аминокислотный остаток в положении 407, представляющий собой V, и положения аминокислотных остатков пронумерованы в соответствии с EU-индексом; и/или (ii) между первой субъединицей Fc1 и второй субъединицей Fc2 присутствует сконструированная дисульфидная связь; предпочтительно, Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 354, представляющий собой C, Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 349, представляющий собой C, и положения аминокислотных остатков пронумерованы в соответствии с EU-индексом; более предпочтительно, Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 354, представляющий собой C, аминокислотный остаток в положении 356, представляющий собой E, аминокислотный остаток в положении 358, представляющий собой M, и аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой W, Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 349, представляющий собой C, аминокислотный остаток в положении 356, представляющий собой E, аминокислотный остаток в положении 358, представляющий собой M, аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой S, аминокислотный остаток в положении 368, представляющий собой A, и аминокислотный остаток в положении 407, представляющий собой V, и положения аминокислотных остатков пронумерованы в соответствии с EU-индексом. В некоторых других вариантах осуществления (i) Fc2 имеет структуру выступа в соответствии с механизмом «выступ-во-впадину» и Fc1 имеет структуру впадины в соответствии с механизмом «выступ-во-впадину»; предпочтительно, Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой W, Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой S, аминокислотный остаток в положении 368, представляющий собой A, и аминокислотный остаток в положении 407, представляющий собой V и аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом; и/или (ii) между первой субъединицей Fc2 и второй субъединицей Fc1 присутствует сконструированная дисульфидная связь; предпочтительно, Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 354, представляющий собой C, Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 349, представляющий собой C, и положения аминокислотных остатков пронумерованы в соответствии с EU-индексом; более

предпочтительно, Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 354, представляющий собой С, аминокислотный остаток в положении 356, представляющий собой Е, аминокислотный остаток в положении 358, представляющий собой М, и аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой W, Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 349, представляющий собой С, аминокислотный остаток в положении 356, представляющий собой Е, аминокислотный остаток в положении 358, представляющий собой М, аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой S, аминокислотный остаток в положении 368, представляющий собой А, и аминокислотный остаток в положении 407, представляющий собой V, и аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU-индексом. В некоторых вариантах осуществления Fc1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, и Fc2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где Fc-область содержит одну или более аминокислотных замен, которые способны снижать связывание Fc-области с Fc-рецептором. В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислотные замены способны снижать связывание Fc-области с рецептором Fcγ. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc IgG<sub>1</sub> человека, и аминокислотные остатки в положениях 234 и 235 представляют собой А, как пронумеровано в соответствии с индексом EU.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где:

антигенсвязывающая молекула содержит: первую цепь, имеющую структуру формулы (k), вторую цепь, имеющую структуру формулы (l), третью цепь, имеющую структуру формулы (m), и четвертую цепь, имеющую структуру формулы (n), где

формула (k) представляет собой [Fv-VH]-[линкер 1]-[Fab1-VH]-[CH1]-[Fc1],

формула (l) представляет собой [Fv-VL]-[линкер 2]-[Fab1-VL]-[CL],

формула (m) представляет собой [Fab-S-VH]-[линкер 3]-[цепь титина]-[Fc2], и

формула (n) представляет собой [Fab-S-VL]-[линкер 4]-[цепь обскурина];

В некоторых вариантах осуществления, линкеры в формуле (k), формуле (l), формуле (m) и формуле (n) представляют собой идентичные или различные пептидные линкеры. В некоторых вариантах осуществления каждый из пептидных линкеров независимо имеет структуру L<sub>1</sub>-(GGGGS)<sub>n</sub>-L<sub>2</sub>, где L<sub>1</sub> представляет собой связь, А, GS, GGS или GGGG (SEQ ID NO: 116), n равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, L<sub>2</sub> представляет собой связь, G, GG, GGG или GGGG (SEQ ID NO: 117), и пептидные линкеры не являются связями. В некоторых

вариантах осуществления пептидный линкер имеет длину 3-15 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления каждый из пептидных линкеров независимо имеет структуру (GGGS)<sub>n</sub>, где n равен 1, 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления линкеры в формуле (k), формуле (l), формуле (m) и формуле (n) содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105 или SEQ ID NO: 106. В некоторых вариантах осуществления линкеры в формуле (k) и формуле (l) содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105, и линкеры в формуле (m) и формуле (n) содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула имеет первую цепь, вторую цепь, третью цепь и четвертую цепь.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где

цепь титина содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, или ее вариант, где вариант SEQ ID NO: 45 имеет одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 3W, 8C, 11I, 13L, 20C, 22M/22C, 25S, 26C, 39T, 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 60S, 64T, 66S/66K, 70R, 75V, 77S, 79T, 81R, 82M, 83D и 84L, по сравнению с SEQ ID NO: 45; и

цепь обскурина содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, или ее вариант, или аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, или ее вариант, где вариант SEQ ID NO: 64 имеет одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 2E, 3C, 7K/7R, 9C, 11L, 12S, 13Y/13S, 14T, 17E, 20L, 22M/22S, 25S, 30D, 32P/32F, 34E, 36T, 41K, 42L, 44I, 45T, 48V, 53L, 58V, 62E/62K/62H, 66C, 67Q/67T, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L, 92E, 93C, 94G и 97G по сравнению с SEQ ID NO: 64; вариант SEQ ID NO: 65 имеет одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 6E, 26S, 74C, 77S, 84C и 86C по сравнению с SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где вариант SEQ ID NO: 45 имеет замену аминокислотного остатка, выбранную из любого из следующего:

8C, 25S и 39T;

20C, 25S и 39T;

25S, 26C и 39T;

22C, 25S и 39T;

8C, 25S, 39T, 66S и 77S;

8C, 25S, 39T, 66K, 70R, 79T и 81R;



3W, 8C, 11I, 13L, 22M, 25S, 39T и 82M;  
8C, 11I, 25S, 39T, 66K, 79T и 81R;  
8C, 25S, 39T, 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 75V, 83D и 84L;  
8C, 25S, 39T, 47E, 49G, 56S, 58E и 75V;  
8C, 25S, 39T, 56S, 58E и 75V;  
8C, 25S, 39T, 56S, 58E, 66S и 77S;  
8C, 11I, 25S, 39T, 60S, 64T, 66K, 79T и 81R;  
8C, 11I, 20C, 25S, 39T, 60S, 64T, 66K, 79T и 81R и  
8C, 11I, 25S, 26C, 39T, 60S, 64T, 66K, 79T и 81R.

В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 45 имеет аминокислотную последовательность KAGIR (SEQ ID NO: 118) на N-конце по сравнению с SEQ ID NO: 45.

В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 45 имеет только замену аминокислотных остатков согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше по сравнению с SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 45 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 45.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где вариант SEQ ID NO: 64 имеет замену аминокислотного остатка, выбранную из любого из следующего:

88C;  
3C;  
9C;  
25S, 76S и 88C;  
25S, 76S и 3C;  
25S, 76S и 9C;  
7K, 25S, 62K, 76S и 88C;  
7K, 25S, 62H, 76S и 88C;  
7R, 25S, 62K, 76S и 88C;  
7R, 25S, 62H, 76S и 88C;  
11L, 25S, 62K, 76S и 88C;  
11L, 25S, 62H, 76S и 88C;  
12S, 13Y, 14T, 22S, 25S, 62K, 76S и 88C;  
2E, 11L, 17E, 25S, 30D, 32P, 34E, 36T, 44I, 45T, 58V, 62E, 67Q, 69S, 76S, 88C и 97G;  
11L, 20L, 22M, 25S, 53L, 62K, 76S и 88C;

11L, 25S, 41K, 45T, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C и 89L;  
11L, 25S, 42L, 45T, 62K, 67T, 69S, 76S, 88C, 92E и 94;  
11L, 12S, 13Y, 22S, 25S, 42L, 45T, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C, 92E и 94G;  
25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 88C и 89L;  
13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C и 89L;  
3C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C и 89L;  
9C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C и 89L;  
13S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 82H, 88C и 89L;  
3C, 13S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 82H, 88C и 89L;  
9C, 13S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 67Q, 69S, 82H, 88C и 89L;  
13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 66C, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L и 93C;  
3C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 66C, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L и 93C; и  
9C, 13S, 25S, 32F, 41K, 45T, 48V, 62K, 66C, 67Q, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L и 93C.

В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 64 имеет аминокислотную последовательность DQPQF (SEQ ID NO: 119) на N-конце по сравнению с SEQ ID NO: 64.

В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 64 имеет только замену аминокислотных остатков согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше по сравнению с SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 64 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 64.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где вариант SEQ ID NO: 65 имеет замену аминокислотного остатка, выбранную из любого из следующего:

6E и 74C;  
6E и 84C;  
6E и 86C;  
6E, 26S, 77S, и 74C;  
6E, 26S, 77S, и 84C и  
6E, 26S, 77S и 86C.

В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 65 имеет только замену аминокислотных остатков согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше по сравнению с SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления вариант SEQ ID NO: 65 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где цепь титина содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45 - SEQ ID NO: 63, и цепь обскурина содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 64 - SEQ ID NO: 104.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где цепь титина содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, и цепь обскурина содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 99.

В некоторых вариантах осуществления дополнительно предложена антигенсвязывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR, и два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающихся с HGFR, где два антигенсвязывающих фрагмента 1 связываются с различными эпитопами HGFR.

В некоторых вариантах осуществления предложены два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающиеся с HGFR, где один из антигенсвязывающих фрагментов 1 конкурирует с антителом к HGFR, содержащим переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 16, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 17, за связывание с HGFR человека; другой антигенсвязывающий фрагмент 1 конкурирует с антителом к HGFR, содержащим переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 12, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 13, за связывание с HGFR человека.

В некоторых вариантах осуществления предложены два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающихся с HGFR, где один из антигенсвязывающих фрагментов 1 способен конкурировать с омабом (онартузумаб) за связывание и другой антигенсвязывающий фрагмент 1 способен конкурировать с Ab10.1 за связывание.

В некоторых вариантах осуществления предложены два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающихся с HGFR, где один из антигенсвязывающих фрагментов 1 способен конкурировать с омабом за связывание и другой антигенсвязывающий фрагмент 1 способен конкурировать с Ab10 за связывание.

В некоторых вариантах осуществления предложены два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающихся с HGFR, где один из антигенсвязывающих фрагментов 1 связывается с тем же эпитопом, что и омаб и другой антигенсвязывающий фрагмент 1 способен связываться с тем же эпитопом, что и Ab10.1.

В некоторых вариантах осуществления предложены два антигенсвязывающих

фрагмента 1, специфически связывающихся с HGFR, где один из антигенсвязывающих фрагментов 1 связывается с тем же эпитопом, что и омаб и другой антигенсвязывающий фрагмент 1 связывается с тем же эпитопом, что и Ab10.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR, содержит переменную область тяжелой цепи E-VH и переменную область легкой цепи E-VL, где E-VH содержит E-HCDR1, E-HCDR2 и E-HCDR3, и E-VL содержит E-LCDR1, E-LCDR2 и E-LCDR3, где E-HCDR1, E-HCDR2 и E-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 3, соответственно, и E-LCDR1, E-LCDR2 и E-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 5, соответственно; антигенсвязывающий фрагмент 1, специфически связывающийся с HGFR, содержит переменную область тяжелой цепи M-VH и переменную область легкой цепи M-VL, где M-VH содержит M-HCDR1, M-HCDR2 и M-HCDR3, и M-VL содержит M-LCDR1, M-LCDR2 и M-LCDR3, где: M-HCDR1, M-HCDR2 и M-HCDR3 из одного из антигенсвязывающих фрагментов 1 содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 16, соответственно, и M-LCDR1, M-LCDR2 и M-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 17, соответственно; M-HCDR1, M-HCDR2 и M-HCDR3 другого антигенсвязывающего фрагмента 1 содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 12, соответственно, и M-LCDR1, M-LCDR2 и M-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 13, соответственно. В некоторых вариантах осуществления M-HCDR1, M-HCDR2, M-HCDR3, M-LCDR1, M-LCDR2, M-LCDR3, E-HCDR1, E-HCDR2, E-HCDR3, E-LCDR1, E-LCDR2 и E-LCDR3 определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату, по IMGT, по Чотиа, по AbM или по контакту.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, имеет одну или более из следующих функций:

а. высокой аффинности к HGFR и/или EGFR. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с HGFR или EGFR человека со значением KD менее  $1,0 \times 10^{-8}$  М (например, менее  $8,5 \times 10^{-9}$  М, менее  $7,5 \times 10^{-9}$  М, менее  $2,5 \times 10^{-9}$  М или менее). Значение KD определяли методом Biacore, и конкретный метод испытания описан в тестовом примере 1;

b. активности специфического связывания *in vitro* против клеток, экспрессирующих HGFR и/или EGFR, и конкретный способ испытания, описанный в тестовом примере 2;

c. блокирования связывания EGF с EGFR. В некоторых вариантах осуществления связывание EGF с EGFR блокировали с  $IC_{50}$  (концентрация полумаксимального ингибирования) менее 2,7 мкг/мл, и конкретный способ испытания описан в тестовом примере 3;

d. блокирования связывания HGF с HGFR. В некоторых вариантах осуществления связывание HGF с HGFR блокировали с максимальной блокирующей силой более 90%, и конкретный способ испытания описан в тестовом примере 4;

e. ингибирования клеточного фосфорилирования EGFR и конкретный способ испытания, описанный в тестовом примере 5;

f. ингибирования клеточного фосфорилирования HGFR и конкретный способ испытания, описанный в тестовом примере 6;

g. ингибирования клеточного фосфорилирования АКТ (протеинкиназа В альфа) и конкретный способ испытания, описанный в тестовом примере 7;

h. ингибирования пролиферации клеток SNU-5 (линия клеток аденокарциномы желудка человека) и конкретный способ испытания, описанный в тестовом примере 9;

i. ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) уничтожения опухолевых клеток и конкретный способ испытания, описанный в тестовом примере 10; или

j. ингибирования роста опухолевых клеток *in vivo*, и конкретный способ испытания описан в Тестовом примере 11 или 12.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, представляет собой низкофукозилированную антигенсвязывающую молекулу; предпочтительно, низкофукозилированная антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело, которое по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95% или 100% не модифицировано фукозилированием; более предпочтительно, модификация фукозилированием в антигенсвязывающей молекуле не обнаруживается.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: терапевтически эффективное количество (или профилактически эффективное количество) антигенсвязывающей молекулы согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей, буферов или эксципиентов.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере один второй терапевтический агент.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей антигенсвязывающую молекулу согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к клетке-хозяину, содержащей вышеупомянутую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может быть выбрана из группы, состоящей из прокариотической клетки и эукариотической клетки, предпочтительно эукариотической клетки, более предпочтительно клетки млекопитающего, предпочтительно клетки млекопитающего, не включающей клетку млекопитающего-человека, где клетка млекопитающего включает, но не ограничивается ими, CHO (клетка яичника китайского хомячка), 293 (клетка эмбриональной почки человека 293), NSO (клетка несекретирующей мышинной миеломы) и клетку, в которой редактирование генов может быть выполнено для изменения характера гликозилирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, тем самым изменяя функцию ADCC антигенсвязывающей молекулы (например, антитела), например, нокаутируя гены, такие как Fut8 или GnT-III, для регулирования изменения характера гликозилирования.

Клетка-хозяин по настоящему изобретению не может развиваться в целое растение или особь животного.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения или предотвращения заболевания, включающему стадию введения субъекту антигенсвязывающей молекулы или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества (или профилактически эффективного количества) антигенсвязывающей молекулы согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к применению антигенсвязывающей молекулы или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных выше, для получения лекарственного средства для лечения или предотвращения заболевания.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к антигенсвязывающей молекуле или композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных выше, для применения в качестве лекарственного средства. Лекарственное средство применяли для лечения или предотвращения заболевания.

В некоторых вариантах осуществления заболевание согласно любому из вариантов

осуществления, описанных выше, представляет собой опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из группы, состоящей из рака легкого (включая немелкоклеточный рак легкого и мелкоклеточный рак легкого), рака молочной железы, рака поджелудочной железы, колоректального рака (включая рак толстой кишки и рак прямой кишки), саркомы, почечно-клеточной карциномы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака желудка, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи и глиобластомы. В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из группы, состоящей из рака легкого, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака головы и шеи, рака желудка и глиобластомы.

В некоторых конкретных вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

В некоторых конкретных вариантах осуществления рак легкого представляет собой метастатический немелкоклеточный рак легкого.

В некоторых конкретных вариантах осуществления рак легкого представляет собой мелкоклеточный рак легкого.

В некоторых конкретных вариантах осуществления рак легкого представляет собой аденокарциному легкого человека.

В некоторых конкретных вариантах осуществления рак легкого представляет собой рак желудка.

В некоторых конкретных вариантах осуществления данного изобретения указанная опухоль представляет собой опухоль, ассоциированную с EGFR и/или HGFR.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1 представляет собой структурную схему формата 1.

Фиг. 2 представляет собой структурную схему формата 2.

Фиг. 3 представляет собой график, демонстрирующий экспериментальные результаты для активности связывания антител с клетками EGFR CHO-S, где ордината графика относится к средней интенсивности флуоресценции (сокращенно MFI, то же относится и далее).

Фиг. 4 представляет собой график, демонстрирующий экспериментальные результаты активности связывания антител с клетками CHO-S HGFR.

Фиг. 5 представляет собой график, демонстрирующий экспериментальные результаты активности связывания антител с клетками H1975-HGF.

Фиг. 6 представляет собой график, демонстрирующий экспериментальные результаты активности связывания антител с клетками MKN-45 (клетка аденокарциномы

желудка человека).

Фиг. 7 показывает экспериментальные результаты ингибирования клеточного фосфорилирования EGFR с помощью антител.

Фиг. 8 показывает экспериментальные результаты ингибирования клеточного фосфорилирования HGFR с помощью антител.

Фиг. 9 показывает экспериментальные результаты ингибирования клеточного фосфорилирования АКГ с помощью антител.

Фиг. 10 показывает экспериментальные результаты снижения HGFR на клеточных поверхностях с помощью антител.

Фиг. 11 показывает ингибирование пролиферации клеток SNU-5 с помощью антител.

Фиг. 12 показывает экспериментальные результаты ADCC-киллинга с помощью антител клеток Hs746T (клетка карциномы желудка человека).

Фиг. 13 показывает экспериментальные результаты ADCC-киллинга с помощью антител клеток H292 (клетка карциномы легкого).

Фиг. 14 показывает ингибирование роста опухолевых клеток HCC827 (клетки немелкоклеточного рака легких человека) мыши с помощью антител.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Терминология

Терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для описания вариантов осуществления изобретения и не является ограничивающей. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое обычно подразумевается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Если контекст явно не требует иного, во всем описании и формуле изобретения слова «содержать», «иметь», «включать» и тому подобное должны толковаться во всеобъемлющем смысле, а не в исключительном или исчерпывающем смысле; то есть в смысле «включая, но не ограничиваясь этим». Если не указано иное, «содержать» включает «состоять из». Например, для M-HCDR1, содержащего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, он, в частности, содержит HGFR-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

Трехбуквенные и однобуквенные коды, используемые в настоящем описании для аминокислот, являются такими, как описано в J. Biol. Chem., 243, с. 3558 (1968).

Термин «и/или», например, «X и/или Y», следует понимать как означающий «X и Y»



или «X или Y» и должен использоваться для обеспечения явной поддержки обоих значений или любого определения.

Термин «аминокислота» относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, и те аминокислоты, которые затем модифицируются, например, гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксиглутаминовая кислота и O-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют по существу идентичную химическую структуру (т.е.  $\alpha$ -углерод, который связывается с водородом, карбоксильной, аминами и R-группой) с встречающимися в природе аминокислотами, например, гомосерином, норлейцином, сульфоксидом метионина и метионинметилсульфонием. Такие аналоги имеют модифицированную R-группу (например, норлейцин) или модифицированный пептидный скелет, но сохраняют по существу идентичную химическую структуру с встречающимися в природе аминокислотами. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличную от аминокислот, но функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам.

Термин «аминокислотная мутация» включает аминокислотные замены, делеции, вставки и модификации. Для получения конечной конструкции может быть выполнена любая комбинация замен, делеций, вставок и модификаций, до тех пор пока конечная конструкция обладает желаемыми свойствами, такими как сниженное связывание с рецептором Fc. Делеции и вставки аминокислотной последовательности включают делеции и вставки на аминоконце и/или карбоксиконце полипептидной цепи. Конкретные аминокислотные мутации могут представлять собой аминокислотные замены. В одном варианте осуществления аминокислотная мутация представляет собой неконсервативную замену аминокислоты, т.е. замену одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей различные структурные и/или химические свойства. Аминокислотные замены включают замену на не встречающиеся в природе аминокислоты или аминокислотные производные 20 нативных аминокислот (например, 4-гидроксипролин, 3-метилгистидин, орнитин, гомосерин и 5-гидроксилизин). Аминокислотные мутации могут быть получены с использованием генетических или химических способов, хорошо известных в данной области техники. Генетические способы могут включать сайт-направленный мутагенез, PCR (полимеразная цепная реакция), синтез генов и тому подобное. Также могут быть использованы способы изменения групп боковых цепей аминокислот, отличные от геной инженерии, такие как химическая модификация. В настоящем документе могут быть

использованы различные названия для обозначения одной и той же аминокислотной мутации. В настоящем документе выражение «положение + аминокислотный остаток» может быть использовано для обозначения аминокислотного остатка в определенном положении. Например, 366W указывает, что аминокислотный остаток в положении 366 представляет собой W. T366W указывает, что аминокислотный остаток в положении 366 мутирован из исходного T в W.

Термин «антигенсвязывающая молекула» используется в самом широком смысле и охватывает множество молекул, которые специфически связываются с антигеном, включая, но не ограничиваясь ими, антитела, другие полипептиды, обладающие антигенсвязывающей активностью, и слитые белки антител, в которых они слиты. В качестве примера, антигенсвязывающие молекулы в настоящем документе представляют собой биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела). Термин «биспецифическая антигенсвязывающая молекула» относится к антигенсвязывающей молекуле, способной специфически связываться с двумя различными антигенами или по меньшей мере двумя различными эпитопами одного и того же антигена.

Термин «антитело» используется в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая, но не ограничиваясь, моноклональные антитела, поликлональные антитела; моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и полноразмерные антитела и фрагменты антител (или антигенсвязывающие фрагменты, или антигенсвязывающие части), при условии, что они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность. «Природное антитело» относится встречающейся в природе молекуле иммуноглобулина. Например, нативное антитело IgG представляет собой гетеротетрамерный протеин около 150000 Дальтон, состоящий из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, связанных дисульфидной связью. От N-конца к C-концу каждая тяжелая цепь имеет одну переменную область (VH), также известную как переменный домен тяжелой цепи или переменная область тяжелой цепи, за которой следует три константных домена (CH1, CH2 и CH3). Аналогичным образом, от N-конца к C-концу каждая легкая цепь имеет одну переменную область (VL), также известную как переменный легкий домен или переменный домен легкой цепи, за которой следует один константный домен легкой цепи (константная область легкой цепи, CL).

Термин, «биспецифическое антитело» относится к антителу (включая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как одноцепочечное антитело), способному специфически связываться с двумя различными антигенами или двумя различными эпитопами одного и того же антигена. Биспецифические антитела различных структур были

описаны в предшествующем уровне техники. Биспецифические антитела могут быть классифицированы на IgG-подобные биспецифические антитела и биспецифические антитела типа фрагмента антитела в соответствии с целостностью молекул IgG. Биспецифические антитела могут быть классифицированы на бивалентные, трехвалентные, четырехвалентные или высоковалентные биспецифические антитела в соответствии с количеством антигенсвязывающих областей. Биспецифические антитела могут быть классифицированы на симметричные биспецифические антитела и асимметричные биспецифические антитела в зависимости от того, являются ли их структуры симметричными или асимметричными. Среди них биспецифические антитела фрагментного типа, такие как Fab-фрагменты, не содержащие Fc-фрагментов, образованные путем связывания 2 или более Fab-фрагментов в одной молекуле, имеют относительно низкую иммуногенность, малую молекулярную массу и относительно высокую проницаемость для опухолевой ткани, и типичные структуры антител этого типа включают F(ab)<sub>2</sub>, scFv-Fab, (scFv)<sub>2</sub>-Fab и тому подобное. IgG-подобные биспецифические антитела (например, антитела, содержащие Fc-фрагменты) имеют большую относительную молекулярную массу, и Fc-фрагменты облегчают очистку антител и повышают их растворимость и стабильность, а Fc-фрагменты могут дополнительно связываться с рецептором FcRn и увеличивать период полувыведения антител в сыворотке. Типичные структурные модели биспецифических антител включают биспецифические антитела, такие как KiH, CrossMAb, триомаб-квадрома, FcΔAdp, ART-Ig, BiMAb, Biclonics, BEAT, DuoBody, Azymetric, XmAb, 2:1 TCB, 1Fab-IgG TDB, FynomAb, два в одном/DAF, scFv-Fab-IgG, DART-Fc, LP-DART, CODV-Fab-TL, HLE-BiTE, F(ab)<sub>2</sub>-CrossMAb, IgG-(scFv)<sub>2</sub>, Bs4Ab, DVD-Ig, Tetravalent-DART-Fc, (scFv)<sub>4</sub>-Fc, CODV-Ig, mAb2 и F(ab)<sub>4</sub>-CrossMAb (см. Aran F. Labrijn et al., Nature Reviews Drug Discovery, том 18, страницы 585-608 (2019); Chen S1 et al., J Immunol Res., Feb. 11, 2019; 2019: 4516041).

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену в антигенсвязывающей молекуле, который связывается с антигеном. В настоящем документе вариабельная область тяжелой цепи в антигенсвязывающем фрагменте 1, специфически связывающемся с HGFR, обозначена M-VH, и вариабельная область легкой цепи обозначена M-VL; вариабельная область тяжелой цепи в антигенсвязывающем фрагменте 2, специфически связывающемся с EGFR, обозначена E-VH, а вариабельная область легкой цепи обозначена E-VL. Каждый из VH и VL содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три определяющие комплементарность области (CDR). Термин «определяющая комплементарность область» или «CDR» относится к области в вариабельном домене, которая в первую очередь способствует связыванию антигена;

«каркас» или «FR» относится к остаткам варибельного домена, отличным от остатков CDR. VH содержит 3 области CDR: HCDR1, HCDR2 и HCDR3; VL содержит 3 области CDR: LCDR1, LCDR2 и LCDR3. В настоящем документе 3 области CDR в M-VH обозначены M-HCDR1, M-HCDR2 и M-HCDR3, соответственно; 3 области CDR в M-VL обозначены M-LCDR1, M-LCDR2 и M-LCDR3, соответственно; 3 области CDR в E-VH обозначены E-HCDR1, E-HCDR2 и E-HCDR3, соответственно; 3 области CDR в E-VL обозначены E-LCDR1, E-LCDR2 и E-LCDR3, соответственно. Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Одной VH или VL может быть достаточно для обеспечения антигенсвязывающей специфичности.

Границы аминокислотных последовательностей CDR могут быть определены с использованием любой из множества хорошо известных схем, включая схему нумерации «по Кабату» (см. Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5<sup>th</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), схема нумерации «по Чотиа», схема нумерации «по АВМ», схема нумерации «по контакту» (see Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001), and the ImMunoGenTics (IMGT) numbering scheme (Lefranc, M.P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003); Front Immunol., Oct. 16, 2018; 9: 2278), и тому подобное. Соответствующие взаимосвязи между различными схемами нумерации хорошо известны специалистам в данной области техники. Схемы нумерации по настоящему изобретению показаны в таблице 1 ниже.

Таблица 1. Связи между схемами нумерации CDR

CDR	по IMGT	по Кабату	по AbM	по Чотиа	по контакту
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

Если не указано иное, схема нумерации «по Кабату» применяется к последовательностям варибельных областей и CDR в примерах настоящего изобретения. Хотя схема нумерации по Кабату используется для определения аминокислотных остатков

в конкретных вариантах осуществления, соответствующие технические решения для других схем нумерации следует рассматривать как эквивалентные технические решения.

Термин «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит фрагмент интактного антитела, сохраняющий антигенсвязывающую способность интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, однодоменные антитела, одноцепочечные Fab (scFab), диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител (например, scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

“Fab” относится к белку, состоящему из VH и CH1 (тяжелая цепь Fab) и VL и CL (легкая цепь Fab) иммуноглобулина.

Fv относится к антигенсвязывающему домену, состоящему из VH и VL иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления первый Fab имеет структуру Fab по настоящему изобретению. В замещенном Fab CH1 и CL заменены цепью титина или цепью обскурина.

Термин «область Fc» или «кристаллизуемая область фрагмента» используется для определения C-концевой области тяжелой цепи антитела, включая нативные области Fc и модифицированные области Fc. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит две субъединицы, которые могут быть идентичными или разными. В некоторых вариантах осуществления область Fc тяжелой цепи IgG человека определяется как проходящая от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбоксильного конца. Подходящие Fc-области нативной последовательности для антител, описанных в настоящем документе, включают IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> человека (IgG<sub>2A</sub>, IgG<sub>2B</sub>), IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>. Если не указано иное, схема нумерации для Fc-области представляет собой EU-индекс.

Термин «цепь титина» относится к фрагменту длиной 78-118 аминокислот, содержащему пептидный фрагмент Ig-подобного домена 152 титина или его функциональный вариант в белке титина. Цепь титина способна образовывать димеризованный комплекс с цепью обскурина.

Термин «цепь обскурина» относится к фрагменту длиной 87-117 аминокислот, содержащему пептидный фрагмент Ig-подобного домена 1 обскурина или его функциональный вариант в белке обскурина; или фрагменту длиной 78-118 аминокислот, содержащему пептидный фрагмент Ig-подобного домена 1 обскурина или его функциональный вариант в белке 1, подобном обскурину. Цепь обскурина способна

связываться с цепью титина с образованием димеризованного комплекса. Цепь титина и цепь обскурина по настоящему изобретению могут быть использованы для замены CH1 и CL в Fab с образованием замещенного Fab (Fab-S). Эта замена не влияет на связывание антигенсвязывающей молекулы с антигеном.

Термин «химерное» антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи в антителе происходит из конкретного источника или вида, в то время как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из источника или вида.

Термин «гуманизированное» антитело относится к антителу, которое сохраняет реакционную способность нечеловеческого антитела, обладая при этом низкой иммуногенностью у человека. Например, гуманизация может быть достигнута путем сохранения нечеловеческих CDR-областей и замещением остальной части антитела его человеческими аналогами (т.е. константными областями и частью каркасной области переменных областей).

Термин «аффинность» относится к общей силе нековалентного взаимодействия между одним сайтом связывания молекулы (например, антигенсвязывающей молекулы настоящего изобретения) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, используемый в настоящем документе термин «аффинность связывания» относится к аффинности внутреннего связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее лиганду Y обычно может быть выражена равновесной константе диссоциации (KD). Аффинность может быть определена обычными способами, известными в данной области техники, включая описанные в настоящем документе. Термин «kassoc» или «ka» относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, в то время как термин «kdis» или «kd», используемый в настоящем документе для обозначения скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Используемый в настоящем документе термин «KD» относится к равновесной константе диссоциации, которая получена из отношения kd к ka (т.е. kd/ka) и выражена как молярная концентрация (M). Значения KD антител могут быть определены способами, известными в данной области техники, например, способы определения KD антитела включают измерение поверхностного плазмонного резонанса с использованием биосенсорной системы, такой как система, или измерение аффинности в растворе с помощью анализа титрования при равновесии в растворе (SET).

Термин «эффекторная функция» относится к биологической активности, относящейся к Fc-области антитела (либо к Fc-области с естественной последовательностью, либо к Fc-области с вариантом аминокислотной

последовательности), и которая варьируется в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность; связывание рецептора Fc; антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; пониженную регуляцию рецепторов поверхности клетки (например, рецептора В-клеток) и активацию В-клеток.

Термин «моноклональное антитело» относится к популяции по существу гомогенных антител или ее члену, то есть аминокислотные последовательности молекул антител, содержащихся в популяции, идентичны, за исключением небольшого количества природных мутаций, которые могут существовать. Напротив, составы на основе поликлональных антител обычно содержат множество различных антител, имеющих различные аминокислотные последовательности в своих переменных доменах, которые, как правило, специфичны для различных эпитопов. «Моноклональный» относится к характеристикам антитела, полученного из по существу гомогенной популяции антител, и не должен толковаться как требующий продукции антитела каким-либо конкретным способом. В некоторых вариантах осуществления предложенное в настоящем изобретении антитело представляет собой моноклональное антитело.

Термин «антиген» относится к молекуле или части молекулы, которая способна селективно связываться антигенсвязывающей молекулой (например, антителом). Антиген может иметь один или более эпитопов, способных взаимодействовать с различными антигенсвязывающими молекулами (например, антителами).

Термин «эпитоп» относится к области или участку на антигене, который способен специфически связываться с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Эпитопы могут быть образованы смежными аминокислотами (линейными эпитопами) или содержать несмежные аминокислоты (конформационные эпитопы), например, несмежные аминокислоты, которые находятся в пространственной близости друг от друга из-за укладки антигена (т.е. путем третичной укладки антигена). Разница между конформационным эпитопом и линейным эпитопом заключается в том, что в присутствии денатурирующих растворителей связывание антитела с конформационным эпитопом теряется. Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Скрининг антител, которые связываются с конкретными эпитопами (т.е. антител, которые связываются с идентичными эпитопами), можно проводить с использованием обычных методов в данной области техники, таких как, помимо прочего, аланиновое сканирование, пептидный блоттинг (см. Meth. Mol. Biol. 248 (2004) 443-463), анализ расщепления пептидов, удаление эпитопа, извлечение эпитопа, химическая

модификация антигена (см. Prot. Sci. 9 (2000) 487-496) и перекрестное блокирование (см. “Antibodies”, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)).

Термин «способный специфически связываться», «специфически связывающийся» или «связывание» означает, что антитело способно связываться с определенным антигеном или его эпитопом с более высокой аффинностью, чем с другими антигенами или эпитопами. Как правило, антитело связывается с антигеном или его эпитопом с равновесной константой диссоциации (KD), составляющей около  $1 \times 10^{-7}$  М или менее (например, около  $1 \times 10^{-8}$  М или менее). В некоторых вариантах осуществления KD для связывания антитела с антигеном составляет 10% или менее (например, 1%) от KD для связывания антитела с неспецифическим антигеном (например, BSA или казеином). KD можно определить с использованием известных способов, например, с помощью FACS (сортировка клеток с активированной флуоресценцией) или анализа поверхностного плазмонного резонанса BIACORE®. Однако антитело, которое специфически связывается с антигеном или его эпитопом, может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, с соответствующими антигенами других видов (гомологичными), таких как люди или обезьяны, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, cyno), *Pan troglodytes* (шимпанзе, chimp) или *Callithrix jacchus* (обыкновенная мартышка, мармозетка).

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к молекуле полипептида, специфически связывающейся с антигеном-мишенью. Антигенсвязывающие фрагменты включают антитела и их фрагменты, описанные в настоящем документе. Специфический антигенсвязывающий фрагмент включает антигенсвязывающий домен антитела, который содержит переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела. Термин «антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с HGFR» относится к фрагменту, который способен связываться с HGFR или его эпитопом с достаточной аффинностью. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с HGFR, имеет константу равновесной диссоциации (KD), как указано ниже: < около 1 мкМ, < около 100 нМ или < около 10 нМ или менее, как определено с помощью способа Biacore. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с HGFR, связывается с консервативным эпитопом в HGFR различных видов. Термин «антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с EGFR» относится к фрагменту, который способен связываться с EGFR или его эпитопом с достаточной аффинностью, так что молекула, содержащая фрагмент, может быть использована в качестве диагностического агента и/или терапевтического агента, нацеленного на EGFR. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, специфически



связывающийся с EGFR, имеет константу равновесной диссоциации (KD), как указано ниже: < около 1 мкМ, < около 100 нМ или < около 10 нМ или менее, как определено с помощью способа Viacore. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с EGFR, связывается с консервативным эпитопом в EGFR различных видов. Антигенсвязывающие фрагменты включают фрагменты антител, как определено в настоящем документе, например, Fab, замещенный Fab или Fv.

В этом контексте порядковые номера в «антигенсвязывающем фрагменте 1», «антигенсвязывающем фрагменте 2», «линкере 1» и «линкере 2» используются только с целью разграничения различных технических признаков и химических объектов без ограничения какого-либо порядка, уровня и количества.

Термин «линкер» относится к линкерному звену, которое связывает два полипептидных фрагмента. В настоящем документе линкеры, присутствующие в одной и той же структурной формуле или различных структурных формулах, могут быть идентичными или разными. Линкер может представлять собой пептидный линкер, содержащий одну или более аминокислот, обычно около 1-30, 2-24 или 3-15 аминокислот. Линкеры, используемые в настоящем документе, могут быть идентичными или различными. Когда «-» появляется в структурной формуле, это означает, что звенья с обеих сторон напрямую связаны ковалентной связью. Когда термин «связь» появляется в структурном блоке, это означает, что блоки с обеих сторон блока напрямую связаны.

«Tm» представляет собой температуру растворения и денатурации (например, определяемую эндогенной флуоресценцией). Когда белок денатурируется (посредством нагревания или денатурирующего вещества), третичная структура открывается и микроокружение ароматической аминокислоты изменяется, что приводит к изменению флуоресцентного эмиссионного спектра. В настоящем изобретении Tm1 относится к температуре, при которой значение флуоресценции изменяется до половины максимального значения.

«Tonset» представляет собой температуру начала денатурации. Она относится к температуре, при которой белок начинает денатурировать, то есть к температуре, при которой значение флуоресценции начинает изменяться.

«Tagg» представляет собой температуру начала агрегации. Температура, при которой образец начинает агрегировать, контролируется путем обнаружения агрегатов на двух длинах волн 266 нм и 473 нм путем статического рассеяния света. Tagg266 относится к температуре начала агрегации, контролируемой при 266 нм.

Термин «антителозависимая клеточная цитотоксичность», «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» представляет собой механизм

индуцирования гибели клеток, который зависит от взаимодействия клеток-мишеней, покрытых антителами, с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, такими как естественные киллерные клетки (NK), моноциты, макрофаги и нейтрофилы, через рецептор Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R), экспрессируемый на эффекторных клетках. Например, NK-клетки экспрессируют Fc $\gamma$ RIIIa, в то время как моноциты экспрессируют Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII и Fc $\gamma$ RIIIa. Активность ADCC антител, предложенных в настоящем документе, можно оценить с помощью анализов *in vitro* с использованием клеток, экспрессирующих антиген в качестве клеток-мишеней, и NK-клеток в качестве эффекторных клеток. Лизис клеток обнаруживали на основании высвобождения метки (например, радиоактивного субстрата, флуоресцентного красителя или природного внутриклеточного белка) из лизированных клеток.

Термин «антителозависимый клеточный фагоцитоз» («ADCP») относится к механизму, посредством которого клетки-мишени, покрытые антителом, элиминируются путем интернализации фагоцитарных клеток, таких как макрофаги или дендритные клетки.

Термин «комплемент-зависимая цитотоксичность» или «CDC» относится к механизму индукции гибели клеток, при котором эффекторный домен Fc целевого антитела, связывающегося с клеткой-мишенью связывается и активирует компонент комплемента C1q, а C1q затем активирует каскад комплемента, что приводит к гибели клетки-мишени. Активация комплемента также может приводить к отложению компонентов комплемента на поверхности клеток-мишеней, которые способствуют CDC, путем связывания с рецепторами комплемента на лейкоцитах (например, CR3).

Термин «фукозилирование», «фукозилированное» или «модификация фукозилированием» относится к присутствию остатка фукозы в олигосахариде, присоединенном к пептидной цепи антигенсвязывающей молекулы (например, антитела). Фукозилирование представляет собой процесс посттрансляционной модификации гликопротеинов. Репрезентативные ферментные гены, связанные с фукозилированием ядра, включают ген GMD (GDP-манноза 4,6-дегидратаза) и ген Fut8 (FUT8, fut8,  $\alpha$ -1,6-фукозилтрансфераза). Уровень фукозилирования ядра можно эффективно регулировать путем ингибирования экспрессии двух генов или конструирования клетки-хозяина CHO с Fut8-нокаутом (YAMANE-OHNUKI et al., "Establishment of FUT8knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity.", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 2004, p614-622). Как правило, фукозилирование локализовано в N-олигосахаридах Fc-области антитела, которое содержит  $\alpha$ -1,6-фукозу в остатке ядра N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) (например, положение Asn297 Fc IgG<sub>1</sub> человека

(соответствующее схеме нумерации EU)).

«Низкофукозилированное» означает, что доля антигенсвязывающих молекул (например, антител) с модификациями фукозилированием в популяции антигенсвязывающих молекул (например, популяции антител) не выше заданного значения, например, не выше 20%, не выше 15%, не выше 10%, не выше 5%, не выше 4%, не выше 3%, не выше 2%, не выше 1%, не выше 0,5% или не выше 0,1%.

«Необнаруживаемое фукозилирование», «нефукозилированное» или «афукозилированное» означает, что углеводная структура, присоединенная к Fc-области, не содержит модификации фукозилированием. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что «отсутствие» и «недостаток» в настоящем описании не следует интерпретировать как «полное отсутствие», но что модификация фукозилирования «не обнаруживается» способами определения олигосахаридов, известными в данной области техники.

Уровень фукозилирования антигенсвязывающей молекулы (например, антитела) может быть определен путем определения всех олигосахаридов способами, известными в данной области техники, для определения процента фукозилированных олигосахаридов. Способы, известные в данной области техники для определения фукозилирования, включают, но не ограничиваются ими, гель-электрофорез, жидкостную хроматографию, масс-спектрометрию и тому подобное. Например, уровень фукозилирования антитела определяли с помощью хроматографии гидрофильного взаимодействия (или жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия, HILIC), например, денатурируя образец пептид-N-гликаназой F для расщепления N-связанных гликанов, а затем анализируя N-связанные гликаны на содержание фукозы.

В настоящем описании в некоторых вариантах осуществления низкофукозилированное антитело согласно настоящему описанию представляет собой антитело, где по меньшей мере 80% тяжелых цепей не модифицированы фукозилированием, например, где по меньшей мере 80-95%, 90-95%, 95-100%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% тяжелой цепи не модифицированы фукозилированием. В настоящем изобретении «нефукозилированный» относится к антигенсвязывающей молекуле (например, антителу) со 100% тяжелой цепи, не модифицированной фукозилированием, если не указано иное.

Низкофукозилированные или нефукозилированные антигенсвязывающие молекулы (например, антитела) могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники. Например, они могут быть получены путем добавления, транслокации или делеции одного или более углеводных фрагментов, присутствующих в антителе, например,

путем расщепления остатка фукозы антитела с использованием фукозидазы (см. Tarentino et al., (1975) *Biochem.* 14: 5516). Антитела с пониженным фукозилированием могут быть получены путем изменения уровня гликозилирования путем изменения состава гликозилирования, например, путем модификации гликанового фрагмента, присоединенного к каждому фрагменту Fc в остатке N297 (Natsume et al., (2009) *Drug Des. Devel. Ther.* 3: 7). Они также могут быть получены без изменения последовательности антитела, например, путем экспрессии низкофукозилированного или нефукозилированного антитела клетками, которые изменяют картину гликозилирования антитела, включая, например, генетически сконструированные клетки со сконструированным гликозилированием (см., например, Hse et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 9062-9070; Yang et al., (2015) *Nature Biotechnology* 33, 842-844). В данной области техники были описаны различные клетки со сконструированным гликозилированием, например, клеточные линии Ms704, Ms705 и Ms709, не имеющие гена фукозилтрансферазы (Fut8, ( $\alpha$ -(1,6)фукозилтрансфераза)) (см. Yamane-Ohnuki et al., (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87: 614; патент США № 20040110704), клеточную линию CHO Lec13 с пониженной способностью присоединения фукозы к Asn (297)-связанным сахарам (см. WO 03/035835), клеточную линию миеломы крыс YB2/0 с незначительной активностью или отсутствием активности добавления фукозы к N-ацетилглюкозамину (которая связывается с Fc-областью антител) (см. EP 1176195) и растительные клетки для получения антител с модифицированными профилями гликозилирования (см. патент США № US20120276086). Кроме того, клетки, несущие рекомбинантные гены, кодирующие фермент, который использует GDP-6-дезоксид-ликсо-4-гексозу в качестве субстрата, такие как GDP-6-дезоксид-ликсо-4-гексозоредуктаза (RMD), также могут продуцировать низкофукозилированные или нефукозилированные антитела (см. патент США № US8642292).

Термин «нуклеиновая кислота» используется в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «полинуклеотид» и относится к дезоксирибонуклеотиду или рибонуклеотиду и их полимеру в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные нуклеотидные аналоги или модифицированные остатки или связи, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, имеющие сходные связывающие свойства с референсной нуклеиновой кислотой, и которые метаболизируются способом, подобным референсным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают, но не ограничиваются, тиофосфат, фосфорамидат, метилфосфонат, хиралметилфосфонат, 2-О-метилрибонуклеотид и пептиднуклеиновую кислоту (PNA).

«Выделенная нуклеиновая кислота» относится к молекуле нуклеиновой кислоты,

отделенной от компонента своего природного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетке, которая обычно содержит молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует внехромосомно или в хромосомном положении, отличном от ее природного хромосомного положения. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающую молекулу, относится к одной или более молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим тяжелую цепь и легкую цепь антитела (или его фрагмента), и включает одну или более молекул нуклеиновой кислоты в одном векторе или отдельных векторах или присутствует в одном или более положениях в клетке-хозяине. Если не указано иное, конкретная нуклеотидная последовательность также в неявной форме охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также явным образом указанную последовательность. В частности, как подробно описано ниже, замены вырожденных кодонов могут быть получены путем генерирования последовательностей, в которых третье положение одного или более выбранных (или всех) кодонов замещено вырожденными основаниями и/или остатками дезоксиинозина.

Термины «полипептид» и «белок» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и обозначают полимер аминокислотных остатков. Термины относятся к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственные химические имитации соответствующих встречающихся в природе аминокислот, а также к встречающимся в природе аминокислотным полимерам и не встречающимся в природе аминокислотным полимерам. Если не указано иное, конкретная полипептидная последовательность также неявно охватывает консервативно модифицированные варианты.

Термин «идентичность» относится к степени (проценту), до которой аминокислоты/нуклеиновые кислоты двух последовательностей идентичны в эквивалентных положениях, когда две последовательности оптимально выровнены; когда в процессе оптимального выравнивания допускается введение гэпов по мере необходимости для достижения максимального процента идентичности последовательности, и любая консервативная замена не рассматривается как часть идентичности последовательности. Для определения процентной идентичности последовательностей выравнивания могут быть выполнены методами, известными специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить параметры, подходящие для

измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания всей длины выровненных последовательностей.

Термин «слияние» или «связь» означает, что компоненты (например, антигенсвязывающие фрагменты и Fc-домены) ковалентно связаны напрямую или через линкер.

Термин «вектор» означает полинуклеотидную молекулу, способную транспортировать другой связанный с ней полинуклеотид. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая означает циклическую двухцепочечную петлю ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, такой как аденоассоциированный вирусный вектор (AAV или AAV2), где дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, куда они введены (например, бактериальные векторы с бактериальным происхождением репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Термин «вектор экспрессии» или «конструкция экспрессии» относится к вектору, который применяется для трансформации клетки-хозяина, и содержит нуклеотидную последовательность, которая направляет и/или контролирует (вместе с клеткой-хозяином) экспрессию одной или более гетерологичных кодирующих областей, функционально связанных с ней. Экспрессионные конструкции могут включать, но не ограничиваются, последовательности, которые влияют или контролируют транскрипцию и трансляцию и влияют на сплайсинг РНК кодирующей области, функционально связанной с ней, в присутствии интрона.

Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используются как взаимозаменяемые и относятся к клеткам, в которые ввели экзогенную нуклеиновую кислоту, включая потомства таких клеток. Клетки-хозяева включают «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первичные трансформированные клетки и полученные из них потомства, независимо от количества пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным родительским клеткам с точки зрения содержания нуклеиновой кислоты и может содержать мутации. Как используется в настоящем документе термин включает мутантных потомков, которые имеют ту же функцию или биологическую активность, что и клетки, прошедшие скрининг или выбранные из первичных трансформированных клеток. Клетки-хозяева включают прокариотические и эукариотические клетки-хозяева, где эукариотические клетки-хозяева включают, но не ограничиваются, клетки млекопитающих, клеточные линии насекомых,

растительные клетки и клетки грибов. Клетки-хозяева млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, быка, лошади и хомяка, включая, но не ограничиваясь, клетки яичника китайского хомяка (CHO), NSO, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почек новорожденного хомяка (BHK), клетки почек обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3 и клетки HEK-293. Клетки грибов включают дрожжевые и нитчатые клетки грибов, включая, например, *Pichiapastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichiaopuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia*, *Saccharomycescerevisiae*, *Saccharomyces*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium sp.*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens*, *Neurospora crassa*, *Pichia*, any *Saccharomyces*, *Hansenula polymorpha*, any *Kluyveromyces*, *Candida albicans*, any *Aspergillus*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, any *Fusarium*, *Yarrowia lipolytica* и *Neurospora crassa*.

«Необязательный» или «необязательно» означает, что описанный впоследствии признак может, но не обязательно, возникать, и указывает на условия, которые включают возникновение или отсутствие признака.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси, содержащей одну или более антител или антигенсвязывающих молекул, описанных в настоящем документе, и другие химические компоненты, например, физиологические/фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель (носитель), разбавитель, буфер или эксципиент» относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, который отличается от активного ингредиента и не токсичен для субъекта.

Термин «субъект» или «индивидуум» включает человека или животных, отличных от человека. Животные, отличные от человека, включают всех позвоночных (например, млекопитающих и не млекопитающих), таких как приматы, отличные от человека (например, яванские макаки), овцы, собаки, коровы, куры, земноводные и рептилии. Если не указано иное, термины «пациент» и «субъект» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Как используется в настоящем документе термин «яванский макак (Суно)» или «яванский макак» относится к *Macaca fascicularis*. В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект представляет собой человека.

«Введение» и «обработка», когда они применяются к животным, людям,

экспериментальным субъектам, клеткам, тканям, органам или биологическим жидкостям, относится к приведению экзогенного лекарственного средства, терапевтического агента, диагностического агента или композиции в контакт с животными, людьми, субъектами, клетками, тканями, органами или биологическими жидкостями.

Термин «образец» относится к коллекции, выделенной от субъекта, такой как жидкости, клетки или ткани, а также жидкости, клетки или ткани, присутствующие у субъекта. Примерные образцы представляют собой биологические жидкости (такие как кровь; сыворотка; серозные жидкости; плазма; лимфа; моча; слюна; кистозные жидкости; слезы; выделения; мокрота; слизистые выделения секреторной ткани и органов; влагалищные выделения; асцит; жидкости в плевре; перикарде; жидкости из перитонеальной полости; брюшной полости и других полостях тела; жидкости, собранные из бронхиального лаважа; синовиальные жидкости; жидкие растворы, контактирующие с субъектом или биологическим источником, например, культуральные среды (включая кондиционированные среды); промывные жидкости; и тому подобное), образцы тканей для биопсии, пункции тонкими иглами, хирургически иссеченные ткани, органические культуры или клеточные культуры.

«Лечение» или «лечить» (и их грамматические вариации) относится к клиническому вмешательству, применяемому к субъекту, получающему лечение, которое может быть выполнено либо для профилактики, либо в ходе клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают, но не ограничиваются, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, облегчение/уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение болезненного состояния и регрессию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению применяли для отсрочки развития или замедления прогрессирования заболевания.

«Эффективное количество», как правило, представляет собой количество, достаточное для уменьшения тяжести и/или частоты симптомов, устранения симптомов и/или основных причин, предотвращения появления симптомов и/или их основных причин и/или облегчения или улучшения повреждения, вызванного или связанного с болезненным состоянием. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой терапевтически эффективное количество или профилактически эффективное количество.

«Терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для лечения болезненного состояния или патологического состояния, в



частности, состояния или патологического состояния, связанного с болезненным состоянием, или для того, чтобы затруднить, задержать или обратить вспять прогрессирование болезненного состояния или любых других нежелательных симптомов, связанных с заболеванием.

«Профилактически эффективное количество» представляет собой количество, которое при введении субъекту будет оказывать predetermined профилактический эффект, например, предотвращая или задерживая начало (или рецидив) болезненного состояния или уменьшая вероятность начала (или рецидива) болезненного состояния или связанных с ним симптомов. Полный терапевтический или профилактический эффект не обязательно возникает после введения одной дозы и может возникать после введения серии доз. Таким образом, терапевтически или профилактически эффективное количество можно вводить в одной или более дозах. «Терапевтически эффективное количество» и «профилактически эффективное количество» могут варьироваться в зависимости от множества факторов, таких как болезненное состояние, возраст, пол и вес индивидуума, а также способность терапевтического агента или комбинации терапевтических агентов вызывать желаемый ответ у индивидуума. Примеры показателей эффективного терапевтического агента или комбинации терапевтических агентов включают, например, улучшение состояния здоровья пациента.

#### Молекула-мишень

«HGFR» следует понимать в самом широком смысле и предназначен для охвата различных форм молекул HGFR на различных стадиях у млекопитающих, таких как, но не ограничиваясь ими, молекулы, продуцируемые геном HGFR во время амплификации, репликации, транскрипции, сплайсинга, процессинга, трансляции и модификации, например, предшественник HGFR, зрелый HGFR, HGFR, экспрессируемый на мембране, варианты сплайсинга HGFR, модифицированный HGFR или его фрагменты; этот термин также охватывает HGFR, искусственно полученный или экспрессируемый *in vitro*.

«EGFR» следует понимать в самом широком смысле и предназначен для охвата различных форм молекул EGFR на различных стадиях у млекопитающих, таких как, но не ограничиваясь ими, молекулы, продуцируемые геном EGFR во время амплификации, репликации, транскрипции, сплайсинга, процессинга, трансляции и модификации, например, предшественник EGFR, зрелый EGFR, EGFR, экспрессируемый на мембране, варианты сплайсинга EGFR, модифицированный EGFR или его фрагменты; этот термин также охватывает EGFR, искусственно полученный или экспрессируемый *in vitro*.

#### Антигенсвязывающие молекулы согласно настоящему изобретению

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, которые

обладают рядом преимущественных свойств, таких как аффинность, специфическое связывание с HGFR и EGFR на клеточных поверхностях, блокирование связывания EGF с EGFR, блокирование связывания HGF с HGFR, ингибирование клеточного фосфорилирования EGFR, ингибирование клеточного фосфорилирования HGFR, ингибирование клеточного фосфорилирования АКТ, ингибирование пролиферации клеток SNU-5, ADCC-киллинг опухолевых клеток, терапевтическая активность, безопасность (например, более низкое высвобождение цитокинов), фармакокинетические свойства и/или лекарственная способность (например, выход, чистота, стабильность и тому подобное).

#### Примерные антигенсвязывающие молекулы

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, содержащей по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент 1, специфически связывающийся с HGFR, и по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR. В частности, антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению имеет одну или более из следующих функций:

a. высокой аффинности к HGFR и/или EGFR. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с HGFR или EGFR человека со значением KD менее  $1,0E-08$  М (например, менее  $8,5E-09$  М, менее  $7,5E-09$  М, менее  $2,5E-09$  М или менее). Значение KD определяли методом *Viacore*, и конкретный метод испытания описан в тестовом примере 1;

b. активности специфического связывания *in vitro* против клеток, экспрессирующих HGFR и/или EGFR, и конкретный способ испытания, описанный в тестовом примере 2;

c. блокирования связывания EGF с EGFR. В некоторых вариантах осуществления связывание EGF с EGFR блокируют с  $IC_{50}$  менее 2,7 мкг/мл, и конкретный способ испытания описан в тестовом примере 3;

d. блокирования связывания HGF с HGFR. В некоторых вариантах осуществления связывание HGF с HGFR блокировали с максимальной блокирующей силой более 90%, и конкретный способ испытания описан в тестовом примере 4;

e. ингибирования клеточного фосфорилирования EGFR и конкретный способ испытания, описанный в тестовом примере 5;

f. ингибирования клеточного фосфорилирования HGFR и конкретный способ испытания, описанный в тестовом примере 6;

g. ингибирования клеточного фосфорилирования АКТ (протеинкиназа В альфа) и конкретный способ испытания, описанный в тестовом примере 7;

h. ингибирования пролиферации клеток SNU-5 (линия клеток аденокарциномы желудка человека) и конкретный способ испытания, описанный в тестовом примере 9;

- i. ADCC-киллинг (антителозависимая клеточная цитотоксичность) опухолевых клеток и конкретный способ испытания, описанный в тестовом примере 10; или
- j. ингибирования роста опухолевых клеток *in vivo*, и конкретный способ испытания описан в Тестовом примере 11 или 12.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антигенсвязывающей молекуле, содержащей по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент 1, специфически связывающийся с HGFR, и по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR, где антигенсвязывающий фрагмент 1 содержит переменную область тяжелой цепи M-VH и переменную область легкой цепи M-VL, где M-VH содержит M-HCDR1, M-HCDR2 и M-HCDR3, и M-VL содержит M-LCDR1, M-LCDR2 и M-LCDR3; антигенсвязывающий фрагмент 2 содержит переменную область тяжелой цепи E-VH и переменную область легкой цепи E-VL, где E-VH содержит E-HCDR1, E-HCDR2 и E-HCDR3, и E-VL содержит E-LCDR1, E-LCDR2 и E-LCDR3; где

в антигенсвязывающем фрагменте 1, специфически связывающемся с HGFR, (i) M-HCDR1 представлена в SEQ ID NO: 30, M-HCDR2 представлена в SEQ ID NO: 31, M-HCDR3 представлена в SEQ ID NO: 32, M-LCDR1 представлена в SEQ ID NO: 27, M-LCDR2 представлена в SEQ ID NO: 33, и M-LCDR3 представлена в SEQ ID NO: 29; или (ii) M-HCDR1 представлена в SEQ ID NO: 18, M-HCDR2 представлена в SEQ ID NO: 19, M-HCDR3 представлена в SEQ ID NO: 20, M-LCDR1 представлена в SEQ ID NO: 21, M-LCDR2 представлена в SEQ ID NO: 22, и M-LCDR3 представлена в SEQ ID NO: 23; или (iii) M-HCDR1 представлена в SEQ ID NO: 24, M-HCDR2 представлена в SEQ ID NO: 25, M-HCDR3 представлена в SEQ ID NO: 26, M-LCDR1 представлена в SEQ ID NO: 27, M-LCDR2 представлена в SEQ ID NO: 28, и M-LCDR3 представлена в SEQ ID NO: 29; и

в антигенсвязывающем фрагменте 2, специфически связывающемся с EGFR, E-HCDR1 представлен в SEQ ID NO: 6, E-HCDR2 представлен в SEQ ID NO: 7, E-HCDR3 представлен в SEQ ID NO: 8, E-LCDR1 представлен в SEQ ID NO: 9, E-LCDR2 представлен в SEQ ID NO: 10, и E-LCDR3 представлен в SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула содержит два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающихся с HGFR, где в одном из антигенсвязывающих фрагментов 1 его M-VH имеет: M-HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 30, M-HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 31, и M-HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 32, и его M-VL, имеет: M-LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 27, M-LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 33, и M-LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 29; в другом антигенсвязывающем фрагменте 1 его M-VH имеет: M-HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 18, M-HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 19, и M-HCDR3, представленную в SEQ

ID NO: 20, и его M-VL имеет: M-LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 21, M-LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 22, и M-LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 23; и в

антигенсвязывающем фрагменте 2, специфически связывающемся с EGFR, его E-VH имеет: E-HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6, E-HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, и E-HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 8, и его E-VL имеет: E-LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 9, E-LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 10, и E-LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 11; или

в некоторых вариантах осуществления в антигенсвязывающем фрагменте 1, специфически связывающемся с HGFR, его M-VH имеет: M-HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 18, M-HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 19, и M-HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 20, и его M-VL имеет: M-LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 21, M-LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 22, и M-LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 23; и

в антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающемся с EGFR, его E-VH имеет: E-HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6, E-HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, и E-HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 8, и его E-VL имеет: E-LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 9, E-LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 10, и E-LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления M-VH представлена в SEQ ID NO: 16, и M-VL представлена в SEQ ID NO: 17, или M-VH представлена в SEQ ID NO: 12, и M-VL представлена в SEQ ID NO: 13, или M-VH представлена в SEQ ID NO: 14, и M-VL представлена в SEQ ID NO: 15; и/или

(ii) E-VH представлена в SEQ ID NO: 3, и E-VL представлена в SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления предложена антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, где:

(i) в антигенсвязывающей молекуле, такой как два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающихся с HGFR, M-VH одного из антигенсвязывающих фрагментов 1 представлена в SEQ ID NO: 16, и M-VL представлена в SEQ ID NO: 17; M-VH другого антигенсвязывающего фрагмента 1 представлена в SEQ ID NO: 12, и M-VL представлена в SEQ ID NO: 13; и E-VH представлена в SEQ ID NO: 3, и E-VL представлена в SEQ ID NO: 5; или

(ii) в антигенсвязывающей молекуле, такой как по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент 1, специфически связывающийся с HGFR, и по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR, E-VH

представлена в SEQ ID NO: 3, E-VL представлена в SEQ ID NO: 5, M-VH представлена в SEQ ID NO: 12, и M-VL представлена в SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, дополнительно содержит Fc-область, где Fc-область содержит первую субъединицу Fc1 и вторую субъединицу Fc2, способные связываться друг с другом. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область IgG, в частности, Fc-область IgG<sub>1</sub>.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, имеет: первую цепь, имеющую структуру формулы (a), вторую цепь, имеющую структуру формулы (b), третью цепь, имеющую структуру формулы (c), и четвертую цепь, имеющую структуру формулы (d), где

формула (a) представляет собой [E-VH]-[линкер 1]-[M-VH]-[CH1]-[Fc1],

формула (b) представляет собой [E-VL]-[линкер 2]-[M-VL]-[CL],

формула (c) представляет собой [M-VH]-[линкер 3]-[цепь титина]-[Fc2] и

формула (d) представляет собой [M-VL]-[линкер 4]-[цепь обскурина].

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула имеет: первую цепь, представленную в SEQ ID NO: 34, вторую цепь, представленную в SEQ ID NO: 35, третью цепь, представленную в SEQ ID NO: 36, и четвертую цепь, представленную в SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула согласно любому из вариантов осуществления, описанных выше, имеет: первую цепь, имеющую структуру формулы (e), вторую цепь, имеющую структуру формулы (f), третью цепь, имеющую структуру формулы (g), и четвертую цепь, имеющую структуру формулы (h), где

формула (e) представляет собой [M-VH]-[CH1]-[Fc1],

формула (f) представляет собой [M-VL]-[CL],

формула (g) представляет собой [E-VH]-[линкер 1]-[цепь титина]-[Fc2] и

формула (h) представляет собой [E-VL]-[линкер 2]-[цепь обскурина].

В некоторых конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула имеет: первую цепь, представленную в SEQ ID NO: 38, вторую цепь, представленную в SEQ ID NO: 39, третью цепь, представленную в SEQ ID NO: 40, и четвертую цепь, представленную в SEQ ID NO: 41.

Варианты антигенсвязывающих молекул

В некоторых вариантах осуществления охватываются варианты аминокислотных последовательностей антигенсвязывающих молекул, предложенных в настоящем документе. Например, может быть желательным улучшение аффинности и/или других

биологических свойств антитела. Варианты аминокислотных последовательностей антитела можно получить путем внесения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотной последовательности антигенсвязывающей молекулы. Для получения конечного конструкта можно внести любую комбинацию делеций, вставок и замен при условии, что конечный конструкт обладает желательными характеристиками, например, связыванием с антигеном.

Варианты, включающие замены, вставки и удаления

В некоторых вариантах осуществления предложены варианты антигенсвязывающей молекулы, имеющие одну или более аминокислотных замен. Сайты, представляющие интерес, включают CDR и FR. Консервативные замены приведены в таблице 2 под заголовком «предпочтительные замены». Иллюстративные замены представлены в таблице 2 под заголовком «примерная замена» и как дополнительно описано ниже со ссылкой на классы боковых цепей аминокислот. В исследуемое антитело можно внедрить аминокислотные замены и исследовать продукты посредством скрининга на предмет желательной активности, например, сохранения/улучшения связывания антигена, снижения иммуногенности или улучшения ADCC или CDC.

Таблица 2. Замены аминокислот

Исходный остаток	Примерная замена	Предпочтительная замена
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu

Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

В соответствии с общими свойствами боковой цепи аминокислоты могут быть сгруппированы следующим образом:

- (1) гидрофобные: Ile, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотные: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены представляют собой замены, в которых член одного класса заменяет члена другого класса.

Один тип вариантов, полученных путем замены, включает замену одного или более остатков CDR родительского антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). Как правило, полученный вариант, отобранный для дальнейшего исследования, характеризуются изменениями (например, улучшением) определенных биологических свойств (например, повышенной аффинностью, сниженной иммуногенностью) по сравнению с родительским антителом и/или в значительной степени сохраняют определенные биологические свойства родительского антитела. Типичный вариант, получаемый путем замены, представляет собой антитело с созревшей аффинностью, которое легко получить, например, с использованием методик созревания аффинности на основе фагового дисплея, например, описанных в настоящем документе. Вкратце, один или более остатков CDR подвергали мутации и варианты антитела подвергали фаговому дисплею и скринингу на предмет конкретной биологической активности (например, аффинности связывания). Изменения (например, замены) могут быть внесены в CDR, например, для улучшения аффинности антитела. Такие изменения могут быть внесены в «горячие точки» CDR, то есть остатки, кодируемые кодонами, которые подвергаются мутации с высокой частотой в процессе соматического созревания, и/или остатки, контактирующие с антигеном, и тем временем полученный вариант VH или

VL тестировали на аффинность связывания. В некоторых вариантах осуществления созревания аффинности вносят разнообразие в переменные гены, выбранные для созревания, любым из различных способов (например, PCR пониженной точности, перетасовки цепей или олигонуклеотид-направленного мутагенеза). Затем создавали вторичную библиотеку. После этого библиотеку подвергали скринингу для выявления вариантов антитела с желательной аффинностью. Другой способ введения разнообразия включает CDR-направленные способы, в которых рандомизировали несколько остатков CDR (например, 4-6 остатков одновременно). Остатки CDR, участвующие в связывании антигена, могут быть специфически идентифицированы, например, с помощью аланинового сканирующего мутагенеза или моделирования. В частности, HCDR3 и LCDR3 часто являются мишенями.

В некоторых вариантах реализации изобретения замены, вставки или делеции могут возникать в одном или более CDR при условии, что такие изменения по существу не снижают способность антитела к связыванию антигена. Например, могут быть сделаны консервативные изменения в CDR (например, консервативные замены, представленные в настоящем документе), которые существенно не снижают аффинность связывания. Такие изменения не происходят в остатках, контактирующих с антигеном. В некоторых вариантах осуществления вариантов последовательностей VH и VL, представленных выше, каждая CDR является неизменной или содержит не более 1, 2 или 3 аминокислотных замен.

Подходящий способ идентификации остатков или областей антитела, которые могут быть использованы в качестве мишеней для мутагенеза, называется «аланин-сканирующим мутагенезом». В данном способе выявляют остаток или группу остатков (например, заряженных остатков, например, Arg, Asp, His, Lys и Glu) идентифицировали и замещали нейтральными или отрицательно заряженными аминокислотами (например, Ala или полиаланином) с целью определить, влияет ли это на взаимодействие антитела с антигеном. В аминокислотные положения, демонстрирующие функциональную чувствительность к первоначальной замене, можно ввести дальнейшие замены. Кроме того, может быть изучена кристаллическая структура комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Эти контактные остатки и соседние остатки могут быть нацелены или удалены в качестве кандидатов на замещение. Варианты можно подвергать скринингу с целью определения наличия у них желательных свойств.

Вставки аминокислотной последовательности включают: амино- и/или карбоксиконцевые слияния с 1 остатком или полипептидами длиной 100 или более остатков и вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым остатком метионина. Другие



вставочные варианты молекулы антитела включают присоединение к N- или C-концу антитела, слитого с ферментом (или полипептида, который увеличивает период полувыведения антитела из сыворотки).

#### Конструирование Fab

В одном аспекте в антигенсвязывающей молекуле по настоящему изобретению антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с HGFR, представляет собой Fab, и антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с EGFR, представляет собой замещенный Fab, содержащий переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи, цепь титина и цепь обскурина. В замещенном Fab исходные CH1 и CL Fab замещены цепью титина и цепью обскурина.

В другом аспекте в антигенсвязывающей молекуле по настоящему изобретению антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с EGFR, представляет собой Fab, и антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающийся с HGFR, представляет собой замещенный Fab, содержащий переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи, цепь титина и цепь обскурина. В замещенном Fab исходные CH1 и CL Fab замещены цепью титина и цепью обскурина.

#### Конструирование Fc-области

В одном аспекте Fc-область антигенсвязывающей молекулы согласно настоящему изобретению содержит одну или более аминокислотных замен, которые уменьшают ее связывание с Fc-рецептором, например, ее связывание с Fc $\gamma$ -рецептором, и уменьшают или устраняют эффекторные функции. Естественная область Fc IgG, в частности, область Fc IgG<sub>1</sub> или область Fc IgG<sub>4</sub>, может вызывать нацеливание антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению на клетки-мишени, экспрессирующие рецептор Fc, а не на клетки, экспрессирующие антиген. Сконструированная область Fc согласно настоящему изобретению демонстрирует сниженную аффинность связывания с рецептором Fc и/или сниженные эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления сконструированная область Fc демонстрирует 50%, 80%, 90% или 95% снижения аффинности связывания с рецептором Fc по сравнению с нативной областью Fc. В некоторых вариантах осуществления рецептор Fc представляет собой рецептор Fc $\gamma$ . В некоторых вариантах осуществления рецептор Fc представляет собой рецептор Fc $\gamma$  человека, например, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIB или Fc $\gamma$ RIIIa. В некоторых вариантах осуществления сконструированная область Fc имеет сниженную аффинность связывания с комплементом (например, C1q) по сравнению с нативной областью Fc. В некоторых вариантах осуществления сконструированная область Fc не имеет сниженной аффинности связывания с неонатальным рецептором Fc (FcRn) по сравнению с нативной областью Fc. В

некоторых вариантах осуществления сконструированная область Fc имеет сниженные эффекторные функции, которые могут включать, но не ограничиваются, одно или более из следующего: сниженная комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), сниженная антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), сниженный антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), сниженная секреция цитокинов, сниженный иммунокомплексный захват антигена антигенпрезентирующими клетками, сниженное связывание с НК-клетками, сниженное связывание с макрофагами, сниженное связывание с моноцитами, сниженное связывание с полиморфнонуклеарными клетками, сниженный апоптоз, индуцированный прямой сигнализацией, сниженное созревание дендритных клеток и сниженное праймирование Т-клеток. Для области Fc IgG<sub>1</sub> замены аминокислотных остатков в положениях, таких как положения 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329, могут снижать эффекторные функции.

В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc IgG<sub>1</sub> человека, и аминокислотные остатки в положениях 234 и 235 представляют собой А, как пронумеровано в соответствии с EU-индексом. Для области Fc IgG<sub>4</sub> замены аминокислотных остатков в положениях, таких как положение 228, могут снижать эффекторные функции.

Антигенсвязывающая молекула может содержать различные антигенсвязывающие фрагменты, слитые с двумя субъединицами области Fc, и может привести к нежелательной гомодимеризации. Для повышения выхода и чистоты предпочтительно вводить модификации, которые способствуют гетеродимеризации в области Fc антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления Fc-область по настоящему изобретению содержит модификации в соответствии с механизмом «выступ-во-впадину» (KH), которая включает введение структуры выступа (выступа) области контакта первой субъединицы и структуры отверстия (отверстия) области контакта второй субъединицы; или структуры выступа (выступа) области контакта второй субъединицы и структуры отверстия (отверстия) области контакта первой субъединицы. Таким образом, выступающая структура может быть расположена в поровой структуре, тем самым способствуя образованию гетеродимеров и ингибируя продукцию гомодимеров. Структуру выступа конструировали путем замены малой аминокислотной боковой цепи на границе раздела первой субъединицы более крупной боковой цепью (например, тирозином или триптофаном). Структуру впадины создавали на границе раздела второй субъединицы путем замены большой аминокислотной боковой цепи меньшей аминокислотной боковой цепью (например, аланином или треонином). Структуры выступа и впадины получали путем изменения нуклеиновой кислоты, кодирующей

полипептид. В некоторых вариантах осуществления необязательные аминокислотные замены показаны в таблице ниже:

Таблица 3. Комбинации мутаций КИН

Первая субъединица	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y F405A	T366W F405W	F405W Y407A
Вторая субъединица	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S L368A Y407V	T394W Y407T	T394W Y407A	T366W T394S

В дополнение к механизму «выступ-во-впадину» в данной области техники также известны другие методики модификации домена СНЗ тяжелой цепи для достижения гетеродимеризации, например, WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 и WO 013/096291.

Антигенсвязывающая молекула может дополнительно содержать сконструированную дисульфидную связь. Например, первая субъединица Fc-области содержит мутацию 354С, а вторая субъединица содержит мутацию 349С, так что между первой и второй субъединицами Fc-области образуется сконструированная дисульфидная связь, способствующая образованию гетеродимеризации первой и второй субъединиц Fc-области.

Fc-область антигенсвязывающей молекулы может дополнительно вводить другие аминокислотные модификации, такие как мутации аллогенных аминокислотных остатков, которые снижают иммуногенность. В некоторых вариантах осуществления мутации 356Е и 358М вводили в Fc IgG<sub>1</sub>.

С-конец области Fc может представлять собой интактный С-конец, заканчивающийся аминокислотными остатками PGK, или усеченный С-конец, например, усеченный С-конец, в котором удалены один или два С-концевых аминокислотных остатка. В предпочтительном аспекте С-конец тяжелой цепи представляет собой усеченный С-конец, заканчивающийся PG. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления композиция интактных антител может содержать популяции антител со всеми удаленными остатками K447 и/или G446 + K447. В некоторых вариантах осуществления композиция интактных антител может содержать популяции антител без удаления остатка K447 и/или остатков G446 + K447. В некоторых вариантах осуществления композиция интактных антител содержит популяции антител, содержащие смесь антител с остатком K447 или G446 + K447

и без них.

#### Способ рекомбинации

Антигенсвязывающая молекула могут быть получены с использованием способов рекомбинации. Для этих способов предложены одна или более выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих антигенсвязывающую молекулу.

В случае нативного антитела, фрагмента нативного антитела или биспецифического антитела с гомодимерными тяжелыми цепями требуются две нуклеиновые кислоты, одна для легкой цепи или ее фрагмента, а другая для тяжелой цепи или ее фрагмента. Такие нуклеиновые кислоты кодируют аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). Данные нуклеиновые кислоты могут находиться на одном и том же векторе экспрессии или на разных векторах экспрессии.

В случае биспецифического антитела с гетеродимерными тяжелыми цепями требуются четыре нуклеиновые кислоты, одна для первой легкой цепи, одна для первой тяжелой цепи, содержащей первый полипептид Fc-области, одна для второй легкой цепи и одна для второй тяжелой цепи, содержащей второй полипептид Fc-области. Четыре нуклеиновые кислоты могут содержаться в одной или более молекулах нуклеиновых кислот или экспрессионных векторах. Как правило, эти нуклеиновые кислоты расположены на двух или трех векторах экспрессии, то есть один вектор может содержать более одной из этих нуклеиновых кислот.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело, как описано выше. Такая нуклеиновая кислота может независимо кодировать любую из полипептидных цепей, описанных выше. В другом аспекте настоящее изобретение относится к одному или более векторам (например, векторам экспрессии), содержащим такие нуклеиновые кислоты. В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей такие нуклеиновые кислоты. В одном варианте осуществления предложен способ получения антигенсвязывающей молекулы, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как предложено выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и необязательно сбор антитела из клетки-хозяина (или среды клетки-хозяина).

Для рекомбинантной продукции антигенсвязывающей молекулы нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, выделяли и встраивали в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такие нуклеиновые кислоты могут быть легко выделены и секвенированы с использованием обычных способов

(например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела) или получены рекомбинантными способами или получены химическим синтезом.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии вектора, кодирующего антитело, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем документе. Например, антитело может быть получено у бактерий, в частности, когда антитело не требует гликозилирования и эффекторных функций Fc. После экспрессии антитело может быть выделено из бактериальной клеточной пасты в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

В дополнение к прокариотам эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, являются подходящими клонирующими или экспрессирующими хозяевами для векторов, кодирующих антитела, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы», так что получали антитело с частично или полностью человеческим паттерном гликозилирования. Подходящие клетки-хозяева для экспрессии (гликозилированных) антител также могут быть получены из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных); примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Был идентифицирован ряд штаммов бакуловирусов, которые могут быть использованы в комбинации с клетками насекомых, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*; культуры растительных клеток также могут быть использованы в качестве хозяев, см., например, US 5959177, US 6040498, US 6420548, US 7125978 и US 6417429; клетки позвоночных также могут быть использованы в качестве хозяев, например, клеточные линии млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другие примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию почки обезьяны CV1, трансформированную SV40 (COS-7); линию эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293T); клетки почки детеныша хомяка (ВНК); клетки сертоли мыши (клетки ТМ4); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой обезьяны (VERO-76); клетки рака шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени крысы-буффало (BRL3A); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI; клетки MRC5 и клетки FS4. Другие подходящие линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO; и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, пригодных для продукции антител, см., например, в Yazaki, P. and Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (eds.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

### Диагностические и терапевтические композиции

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула, предложенная в настоящем изобретении, может быть использована для обнаружения присутствия HGFR или EGFR в биологическом образце. Как используется в настоящем документе термин «обнаружение» охватывает количественное или качественное обнаружение. В некоторых вариантах осуществления биологический образец включает клетку или ткань, такую как опухолевая ткань.

В одном варианте осуществления предложена антигенсвязывающая молекула для применения в способе диагностики или обнаружения. В еще одном аспекте обеспечен способ обнаружения наличия/уровня HGFR или EGFR в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение в контакт биологического образца с антигенсвязывающей молекулой в подходящих условиях и обнаружение образования комплекса между детектирующим агентом и антигеном. Такие способы могут представлять собой способы *in vitro* или *in vivo*. В одном варианте осуществления антигенсвязывающую молекулу применяли для выбора субъекта, подходящего для лечения; например, HGFR или EGFR представляет собой биомаркер для выбора субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложена меченая антигенсвязывающая молекула. Метки включают, но не ограничиваются ими, метки или модули, которые детектируются напрямую (такие как флуоресцентные, хромофорные, электронно-плотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), и модули, которые детектируются косвенно (например, модули, которые детектируются косвенно посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия, такие как ферменты или лиганды).

В дополнительном аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу, например, для применения в любом из следующих способов лечения. В одном аспекте фармацевтическая композиция содержит любое из антител, предложенных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом аспекте фармацевтическая композиция содержит любое из антител, предложенных в настоящем документе, и по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

Фармацевтическую композицию антигенсвязывающей молекулы, описанную в настоящем описании, получали путем смешивания антитела желаемой чистоты с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями. Фармацевтическая композиция находится в форме лиофилизированной композиции или водного раствора. Препараты для введения *in vivo* обычно являются стерильными.

Стерильность может быть легко достигнута, например, путем фильтрации через стерильную фильтрующую мембрану.

Способ лечения и способ введения

Любая из антигенсвязывающих молекул, предложенных в настоящем документе, может быть использована в способе лечения.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению антигенсвязывающей молекулы при изготовлении или получении лекарственного средства. В одном варианте осуществления лекарственное средство применяется для лечения заболеваний, связанных с HGFR и/или EGFR, например, опухолей, таких как опухоли, высоко экспрессирующие HGFR и/или EGFR, например, рак легкого, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак головы и шеи, рак желудка или глиобластома. И лекарственное средство присутствует в количестве, эффективном для заболеваний, описанных выше.

В некоторых вариантах осуществление эффективное количество представляет собой однократную суточную дозу или однократную еженедельную дозу. В одном из таких вариантов осуществления, применение дополнительно включает введение субъекту эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента (например, одного, двух, трех, четырех, пяти или шести дополнительных терапевтических агентов).

«Субъект» в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления может представлять собой человека. Когда лекарственное средство применяется в терапевтических целях, субъект представляет собой индивидуума, который имеет или подозревается в наличии представляющего интерес заболевания. Когда лекарственное средство применяется в профилактических целях, субъект представляет собой индивидуума, восприимчивого к интересующему заболеванию.

В еще одном аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу, например, для любого из вышеуказанных фармацевтических применений или способов лечения. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент.

Антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению может быть использована отдельно или в комбинации с другими агентами для лечения. Например, антитело по настоящему изобретению можно вводить (одновременно или последовательно) в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом.

Антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению (и любые

дополнительные терапевтические агенты) может быть введена любым подходящим способом, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение, и, если требуется при местном лечении, внутриочаговое введение. Парентеральная инфузия включает внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Введение может быть осуществлено любым подходящим способом, например, путем инъекции, такой как внутривенная или подкожная инъекция, в зависимости от того, является ли введение краткосрочным или долгосрочным. В настоящем документе рассматриваются различные схемы введения, включая, но не ограничиваясь, однократное введение или многократное введение в несколько моментов времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

Антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению будет составлена, введена и применена в соответствии с надлежащей медицинской практикой, такой как Руководство по Надлежащей Медицинской Практике (GMP). Факторы, рассматриваемые в этом контексте, включают конкретное расстройство, подлежащее лечению, конкретное заболевание, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного субъекта, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, время введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Антигенсвязывающие молекулы необязательно должны содержать один или более агентов, используемых в настоящее время для предотвращения или лечения заболевания, но необязательно. Эффективное количество таких дополнительных агентов зависит от количества антигенсвязывающей молекулы, присутствующей в фармацевтической композиции, типа расстройства или лечения и других факторов, обсуждавшихся выше. Как правило их применяют в такой же дозировке и посредством таких же способов введения, как описано в настоящем документе, или в дозировке, составляющей от около 1 до 99% доз, описанных в настоящем документе, или в любой дозировке и посредством любого способа введения, эмпирически/клинически считающихся подходящими.

Для предотвращения или лечения заболевания подходящая дозировка антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению (при использовании отдельно или в комбинации с одним или более другими дополнительными терапевтическими агентами) будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа терапевтической молекулы, тяжести и течения заболевания, от того, вводится ли терапевтическая молекула в профилактических или терапевтических целях, от предшествующей терапии, от клинического анамнеза субъекта и ответа на терапевтическую молекулу, а также от усмотрения лечащего врача. Терапевтическую молекулу подходящим образом вводили субъекту в ходе одной или серии процедур. Примерная единичная суточная доза составляет



от 50 мкг до 5 г в зависимости от типа и тяжести заболевания.

#### Готовое изделие

В другом аспекте настоящего изобретения предложено изделие, которое содержит материалы, пригодные для лечения, предотвращения и/или диагностики вышеуказанных расстройств. Изделие включает контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку, вложенный или связанный с контейнером. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты с раствором для в/в (внутривенного) введения и тому подобное. Контейнер может быть изготовлен из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, эффективную при лечении, предотвращении и/или диагностике заболевания, отдельно или в комбинации с другой композицией, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного введения раствора или флакон с пробкой). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению. На этикетке или вкладыше в упаковку указано, что композиция используется для лечения выбранного состояния.

Кроме того, изделие может содержать:

(a) первый контейнер с композицией, содержащейся в нем, где композиция содержит антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению и

(b) второй контейнер с композицией, содержащейся в нем, где композиция содержит цитотоксический или иной терапевтический агент.

Альтернативно или дополнительно, изделие может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер. С коммерческой и пользовательской точки зрения оно может дополнительно содержать другие материалы по мере необходимости, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы. В конкретном варианте осуществления изделие представляет собой набор.

#### Примеры и тестовые примеры

Настоящее изобретение дополнительно описано ниже со ссылкой на следующие примеры и тестовые примеры, которые, однако, не ограничивают настоящее изобретение. Экспериментальные способы в примерах и тестовых примерах по настоящему изобретению, в которых конкретные условия не указаны, обычно выполняют в обычных условиях, таких как *Antibodies: A Laboratory Manual* и *Molecular Cloning: A Laboratory Manual by Cold Spring Harbor Laboratory*, или в условиях, рекомендованных производителями исходных материалов или коммерческих продуктов. Реагенты без указания конкретного происхождения являются коммерчески доступными общепринятыми

реагентами.

### Примеры

Пример 1. Антигенсвязывающие молекулы, содержащие цепь титина/цепь обскурина

Цепь титина/цепь обскурина по настоящему изобретению может быть получена из любого подходящего полипептида, включая полипептиды, полученные из PCT/CN2021/070832 и его публикации WO2021139758A1 (включенной в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме) и CN202110527339.7 и патентов, которые ссылаются на него в качестве приоритетного документа. Были сконструированы биспецифические антитела, в которых CL представлял собой константную область легкой цепи каппа в PCT/CN2021/070832. Аминокислотные последовательности цепи титина и цепи обскурина показаны в таблицах 4-1 и 4-2; линкерные последовательности включают GGGGS (SEQ ID NO: 106), ASTKG (SEQ ID NO: 109) или RTVAS (SEQ ID NO: 110), а аминокислотные последовательности Fc1, Fc2 и CH1 в этом примере показаны ниже.

Таблица 4-1. Аминокислотные последовательности цепи титина

№	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
T.0	45	GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVACAFTGEPTPEVTWSCGGRKIHSQEQG RFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.1	46	GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG RFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.2	47	GIPPKIEALPSDISIDEGKCLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG RFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.3	48	GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVASCFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG RFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.4	49	GIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG RFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.5	50	KAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHS QEQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIHI RSI
T.6	51	KAGIRGIPPKIEALPSDISIDEGKVLTVACAFTGEPTPEVTWSCGGRKIH SQEQGRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGGLYTLSLGNEFGSDSATVNIH IRSI

T.7	52	GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG RFHIENTDDLTTLIISDVQKQDGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.8	53	GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG RFHIENTDDLTTLIHKDVQRQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI
T.9	54	GIWPKIECLPIDLSIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQ GRFHIENTDDLTTLIIMDVQKQDGGLYTLSLGMEFGSDSATVNIHIRSI
T.10	55	GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGR FHIENTDDLTTLIHKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI
T.11	56	GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTSGKKISSEEGGR FHIESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLSLGNDLGSDSATVNIHIRSI
T.12	57	GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG RFHIESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.13	58	GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG RFHIESTEDLTTLIIMDVQKQDGGVYTLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.14	59	GIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQG RFHIESTEDLTTLIISDVQKQDGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIRSI
T.15	60	KAGIRGIPPKIECLPSDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHS QEQGRFHIESTEDLTTLIISDVQKQDGGLYSLSLGNEFGSDSATVNIHIR SI
T.16	61	GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGR FHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI
T.17	62	GIPPKIECLPIDISIDEGKCLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGR FHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI
T.18	63	GIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASCFTGEPTPEVTWSTGGRKIHSQEQGR FHIENTDDSTTLTIKDVQKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSI

Таблица 4-2. Аминокислотные последовательности цепи обскурина

№	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
O.0	64	SGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAVGLQV DAEA

OL.0	65	QGSPPCFLRFPRPVRVVS GAEAEKCVVLGEP PPVVVWEKGGQQLA ASERLSFPADGAEH GLLLTAALPTDAGV YVCRARNAAGEAYA AAAV TVLEPP
O.1	66	SGAPRFLTRPKAFVVS VGKDATLSCQIVGN PTPQVSWEKDQQP VAAG ARFRLAQDGDLYRL TILDLALGDSGQYV CRARNAIGEAFACV GLQV DAEA
O.2	67	SGCPRFLTRPKAFVVS VGKDATLSCQIVGN PTPQVSWEKDQQP VAAG ARFRLAQDGDLYRL TILDLALGDSGQYV CRARNAIGEAFAAV GLQV DAEA
O.3	68	SGAPRFLTCPKAFVVS VGKDATLSCQIVGN PTPQVSWEKDQQP VAAG ARFRLAQDGDLYRL TILDLALGDSGQYV CRARNAIGEAFAAV GLQV DAEA
O.4	69	SGAPRFLTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGN PTPQVSWEKDQQP VAAG ARFRLAQDGDLYRL TILDLALGDSGQYV SRARNAIGEAFACV GLQV DAEA
O.5	70	SGCPRFLTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGN PTPQVSWEKDQQP VAAG ARFRLAQDGDLYRL TILDLALGDSGQYV SRARNAIGEAFAAV GLQV DAEA
O.6	71	SGAPRFLTCPKAFVVS VGKDATLSSQIVGN PTPQVSWEKDQQP VAAG ARFRLAQDGDLYRL TILDLALGDSGQYV SRARNAIGEAFAAV GLQV DAEA
O.7	72	SGAPRFKTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGN PTPQVSWEKDQQP VAA GARFRLAQDGDLYR LKILDLALGDSGQYV SRARNAIGEAFACV GLQ VDAEA
O.8	73	SGAPRFKTRPKAFVVS VGKDATLSSQIVGN PTPQVSWEKDQQP VAA GARFRLAQDGDLYR LHILDLALGDSGQYV SRARNAIGEAFACV GLQ VDAEA
O.9	74	SGAPRFLTRPLAFVVS VGKDATLSSQIVGN PTPQVSWEKDQQP VAAG ARFRLAQDGDLYRL KILDLALGDSGQYV SRARNAIGEAFACV GLQV DAEA
O.10	75	SGAPRFLTRPLAFVVS VGKDATLSSQIVGN PTPQVSWEKDQQP VAAG ARFRLAQDGDLYRL HILDLALGDSGQYV SRARNAIGEAFACV GLQV DAEA

O.11	76	DQPQFSGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQ PVAAGARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACV GLQVDAEA
O.12	77	DQPQFSGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQ PVAAGARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFAC VGLQVDAEA
O.13	78	DQPQFSGAPRFKTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQ PVAAGARFRLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFAC VGLQVDAEA
O.14	79	DQPQFSGAPRFTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQ PVAAGARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFAC VGLQVDAEA
O.15	80	DQPQFSGAPRFTRPKAFVVSVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQ PVAAGARFRLAQDGDLYRLHILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFAC VGLQVDAEA
O.16	81	DQPQFSGAPRFLTRPKAFVVSVGKDATLSCQIVGNPTPQVSWEKDQQ PVAAGARFRLAQDGDLYRLTILDLALGDSGQYVCRARNAIGEAFAAV GLQVDAEA
OL.1	82	QGSPEFLRFPRPVRVVSAGAEELKCVVLGEPVPPVVVWEKGGQQLA ASERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGCYVCRARNAAGEAYAAA TVLEPP
OL.2	83	QGSPEFLRFPRPVRVVSAGAEELKCVVLGEPVPPVVVWEKGGQQLA ASERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAACEAYAAA TVLEPP
OL.3	84	QGSPEFLRFPRPVRVVSAGAEELKCVVLGEPVPPVVVWEKGGQQLA ASERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVCRARNAAGECYAAA TVLEPP
OL.4	85	QGSPEFLRFPRPVRVVSAGAEELKSVVLGEPVPPVVVWEKGGQQLA ASERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGCYVSRARNAAGEAYAAA TVLEPP
OL.5	86	QGSPEFLRFPRPVRVVSAGAEELKSVVLGEPVPPVVVWEKGGQQLA ASERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVSRARNAACEAYAAA TVLEPP

OL.6	87	QGSPEFLRFPRPVRVVSAGAEELKSVVLGEPVPPVVVWEKGGQQLA ASERLSFPADGAEHGLLLTAALPTDAGVYVSRARNAAGECYAAAV TVLEPP
O.17	88	SGAPRFLTRPKSYTVSVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQV DAEA
O.18	89	SEAPRFLTRPLAFVVSSEGKDATLSSQIVGDPPPEVTWEKDQQPITAGA RFRLAQDGDVYRLEILDQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQVD AEG
O.19	90	SGAPRFLTRPLAFVVS SVGKLAMLSSQIVGNPTPQVSWEKDQQPVAAG ARFRLAQDGDLYRLKILDLALGDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLQV DAEA
O.20	91	SGAPRFLTRPLAFVVS SVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDKQPVTAG ARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVD AEA
O.21	92	SGAPRFLTRPLAFVVS SVGKDATLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTAG ARFRLAQDGDLYRLKILDLTLSGQYVSRARNAIGEAFACVGLEVG AEA
O.22	93	SGAPRFLTRPLSYVVS SVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQLPVTAG ARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACVGLEVG AEA
O.23	94	DQPQFSGAPRFLTRPLSYVVS SVGKDASLSSQIVGNPTPQVSWEKDQL PVTAGARFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACV GLEVGAEA
O.24	95	SGAPRFLTRPKAFVVS SVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAIGEAFACLGLQVD AEA
O.25	96	SGAPRFLTRPKASVVS SVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQV DAEA
O.26	97	SGCPRFLTRPKASVVS SVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDLQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQV DAEA

O.27	98	SGAPRFLTCPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQV DAEA
O.28	99	SGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQV DAEA
O.29	100	SGCPRFLTRPKASVVSVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQV DAEA
O.30	101	SGAPRFLTCPKASVVSVGKDATLSCQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDQLSDSGQYVCRARNAHGEAFACLGLQV DAEA
O.31	102	SGAPRFLTRPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDCQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQC DAEA
O.32	103	SGCPRFLTRPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDCQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQC DAEA
O.33	104	SGAPRFLTCPKASVVSVGKDATLSSQIVGNPFPQVSWEKDKQPVTAG VRFRLAQDGDLYRLKILDCQLSDSGQYVSRARNAHGEAFACLGLQC DAEA

> Fc1 (выступ, SEQ ID NO: 111)

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> Fc2 (отверстие, SEQ ID NO: 112)

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  
TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK;

> CH1 (SEQ ID NO: 113)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHSTFPAV  
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC.

## 1.1 Биспецифические антитела DI

Конструирование биспецифических антител DI к hNGF и hRANKL: от DI-2 до DI-20, содержащих первую тяжелую цепь, вторую тяжелую цепь, первую легкую цепь и вторую легкую цепь, как описано ниже со ссылкой на пример 5 в PCT/CN2021./070832:

первая тяжелая цепь содержит [VH1-I]-[линкер 1]-[цепь обскурина]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1-I]-[линкер 2]-[цепь титина] в порядке от N-конца к C-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2-D]-[CH1]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу,  
и

вторая легкая цепь содержит [VL2-D]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу;

где VH1-I и VL1-I представляли собой переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи I0 в PCT/CN2021/070832, соответственно, и VH2-D и VL2-D представляли собой переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи D0 в PCT/CN2021/070832, соответственно. Структуры цепи обскурина, цепи титина, линкера 1 и линкера 2 в биспецифических антителах DI по этому примеру показаны в следующей таблице.

Таблица 5. Цепь обскурина/цепь титина и линкеры в биспецифических антителах DI

№	Первая тяжелая цепь		Первая легкая цепь	
	Цепь обскурина	Линкер 1	Цепь титина	Линкер 2
DI-2	O.20	GGGGS	T.10	GGGGS
DI-3	O.25	GGGGS	T.16	GGGGS
DI-4	O.26	GGGGS	T.17	GGGGS
DI-5	O.27	GGGGS	T.18	GGGGS
DI-6	O.28	GGGGS	T.16	GGGGS
DI-7	O.29	GGGGS	T.17	GGGGS
DI-8	O.30	GGGGS	T.18	GGGGS
DI-9	O.31	GGGGS	T.16	GGGGS
DI-10	O.32	GGGGS	T.17	GGGGS
DI-11	O.33	GGGGS	T.18	GGGGS
DI-12	O.25	ASTKG	T.16	RTVAS
DI-13	O.26	ASTKG	T.17	RTVAS



DI-14	0.27	ASTKG	T.18	RTVAS
DI-15	0.28	ASTKG	T.16	RTVAS
DI-16	0.29	ASTKG	T.17	RTVAS
DI-17	0.30	ASTKG	T.18	RTVAS
DI-18	0.31	ASTKG	T.16	RTVAS
DI-19	0.32	ASTKG	T.17	RTVAS
DI-20	0.33	ASTKG	T.18	RTVAS

Примечание: № цепи титина и цепи обскурина в таблицах приведены в таблицах 4-1 и 4-2.

Активность связывания биспецифических антител DI-2 с DI-20 против их антигенов анализировали с помощью способа, описанного в тестовом примере 4 в PCT/CN2021/070832. Антитела подвергали исследованию термической стабильности. Метод исследования был следующим: антитела разбавляли до концентрации 5 мг/мл PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) и тестировали на термическую стабильность с использованием высокопроизводительного дифференциального сканирующего флуориметра (UNCHAINED, Спецификация: Unit).

Экспериментальные результаты показали, что активность связывания модифицированных биспецифических антител в отношении антигена существенно не изменилась; между тем, от DI-4 до DI-8, от DI-10 до DI-16 и DI-20 имели значительно улучшенную  $T_m1$  (°C) и  $T_{onset}$  (°C) по сравнению с DI-2, и, следовательно, биспецифические антитела имели лучшую термическую стабильность.

Таблица 6. Анализ активности связывания на биспецифических антителах DI

№	RANKL (рецептор-активатор лиганда ядерного фактора каппа-B)	NGF (фактор роста нервов)	№	RANKL	NGF
	EC50 (полуМаксимальная эффективная концентрация) (нМ)			EC50 (нМ)	
DI-2	0,3832	6,633	DI-12	0,4125	6,5156
DI-3	0,3613	5,7730	DI-13	0,4440	5,5420
DI-4	0,3959	6,2930	DI-14	0,4182	3,2610
DI-5	0,3290	6,1890	DI-15	0,2206	5,2800
DI-6	0,2509	5,6720	DI-16	0,1474	5,5140

DI-7	0,2557	6,6430	DI-17	0,2329	6,7270
DI-8	0,3643	7,6250	DI-18	0,2662	5,9080
DI-9	0,2944	8,4950	DI-19	0,1843	5,9280
DI-10	0,3460	7,1660	DI-20	0,3184	6,4250
DI-11	0,3721	10,9600			

Таблица 7. Результаты испытания термической стабильности для биспецифических антител DI

№	Tm1 (температура плавления) (°C)	Tonset (температура начала) (°C)	№	Tm1 (°C)	Tonset (°C)
DI-2	55,6	48,3	DI-11	57,35	-
DI-4	60,1	52,493	DI-12	59,9	51,726
DI-5	61	51,967	DI-13	61	50,988
DI-6	60,8	53,012	DI-14	61,2	52,191
DI-7	60,34	52,003	DI-15	60,41	50,558
DI-8	60,61	50,425	DI-16	61,5	50,691
DI-10	60,2	52,766	DI-20	60,7	51,859

Растворы биспецифических антител DI составляли с буфером, содержащим 10 мМ уксусной кислоты при pH 5,5 и 9% сахарозу, и растворы инкубировали в инкубаторе при 40 °C в течение четырех недель. После окончания инкубации антитела концентрировали до концентрации в начале инкубации и наблюдали осаждение растворов. Экспериментальные результаты показали, что в растворе группы биспецифических антител DI-2 имело место осаждение, и, следовательно, от DI-3 до DI-7 имели лучшую стабильность, чем DI-2.

Таблица 8. Осаждение растворов биспецифических антител DI

№	Исходная концентрация	Концентрация должна быть достигнута на неделе 4	Осаждение растворов
DI-2	20 мг/мл	20 мг/мл	Произошло выпадение осадка

DI-3	20 мг/мл	20 мг/мл	Без осадка
DI-4	60 мг/мл	60 мг/мл	Без осадка
DI-5	25 мг/мл	25 мг/мл	Без осадка
DI-6	60 мг/мл	60 мг/мл	Без осадка
DI-7	16 мг/мл	16 мг/мл	Без осадка

## 1.2 Биспецифические антитела PL

Конструирование биспецифических антител PL в отношении hPDL1 и hCTLA4: от PL-1 до PL-19, содержащих первую тяжелую цепь, вторую тяжелую цепь, первую легкую цепь и вторую легкую цепь, как описано ниже:

первая тяжелая цепь содержит [VH1-P]-[линкер 1]-[цепь обскурина]-[Fc1] в порядке от N-конца к C-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1-P]-[линкер 2]-[цепь титина] в порядке от N-конца к C-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2-L]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к C-концу,

и

вторая легкая цепь содержит [VL2-L]-[CL] в порядке от N-конца к C-концу;

где VH1-P и VL1-P представляли собой вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела h1831K в WO2020177733A1, соответственно. Аминокислотные последовательности VH1-L и VL1-L показаны ниже.

> VH2-L (SEQ ID NO: 114)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYD  
GNNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGT  
LVTVSS

> VL2-L (SEQ ID NO: 115)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRA  
TGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK.

Структуры цепи обскурина, цепи титина, линкера 1 и линкера 2 в биспецифических антителах PL по этому примеру показаны в следующей таблице.

Таблица 9. Цепь обскурина/цепь титина и линкеры в биспецифических антителах PL

№	Первая тяжелая цепь		Первая легкая цепь	
	Цепь обскурина	Линкер 1	Цепь титина	Линкер 2

PL-1	0.20	GGGGS	T.10	GGGGS
PL-2	0.25	GGGGS	T.16	GGGGS
PL-3	0.26	GGGGS	T.17	GGGGS
PL-4	0.27	GGGGS	T.18	GGGGS
PL-5	0.28	GGGGS	T.16	GGGGS
PL-6	0.29	GGGGS	T.17	GGGGS
PL-7	0.30	GGGGS	T.18	GGGGS
PL-8	0.31	GGGGS	T.16	GGGGS
PL-9	0.32	GGGGS	T.17	GGGGS
PL-10	0.33	GGGGS	T.18	GGGGS
PL-11	0.25	ASTKG	T.16	RTVAS
PL-12	0.26	ASTKG	T.17	RTVAS
PL-13	0.27	ASTKG	T.18	RTVAS
PL-14	0.28	ASTKG	T.16	RTVAS
PL-15	0.29	ASTKG	T.17	RTVAS
PL-16	0.30	ASTKG	T.18	RTVAS
PL-17	0.31	ASTKG	T.16	RTVAS
PL-18	0.32	ASTKG	T.17	RTVAS
PL-19	0.33	ASTKG	T.18	RTVAS

Примечание: № цепи титина и цепи обскурина в таблицах приведены в таблицах 4-1 и 4-2.

Связывающую активность биспецифических антител PL тестировали с помощью анализа ELISA (иммуноферментный анализ) со ссылкой на тестовый пример 4 в PCT/CN2021/070832, где антигены hPDL1 и hCTLA4 были приобретены у Sino biology. Антитела подвергали исследованию термической стабильности. Метод был следующим: антитела разбавляли до концентрации 1,4-3 мг/мл PBS и тестировали на термическую стабильность с использованием высокопроизводительного дифференциального сканирующего флуориметра (UNCHAINED, Спецификация: Unit). Экспериментальные результаты показали, что биспецифические антитела PL все еще обладают хорошей активностью связывания с антигеном; между тем, от PL-2 до PL-19 имели значительно улучшенную Tm1 (°C), Tagg 266 (температура агрегации) (°C) и Tonset (°C) по сравнению с PL-1, и, следовательно, биспецифические антитела имели лучшую термическую стабильность.

Таблица 10. Анализ активности связывания на биспецифических антителах PL

№	hPDL1	hCTLA4	№	hPDL1	hCTLA4
	EC50 (нМ)			EC50 (нМ)	
PL-1	1,6	16,5	PL-11	0,6	5,6
PL-2	0,5	8,0	PL-12	0,5	8,0
PL-3	0,6	7,9	PL-13	0,5	4,4
PL-4	0,7	6,5	PL-14	1,3	6,0
PL-5	0,7	6,7	PL-15	1,4	3,2
PL-6	0,8	5,3	PL-16	1,7	34,9
PL-7	0,5	7,3	PL-17	1,4	6,2
PL-8	1,4	14,5	PL-18	1,6	6,7
PL-9	0,6	5,5	PL-19	1,6	6,5
PL-10	0,6	6,9			

Таблица 11. Результаты испытания термической стабильности для биспецифических антител PL

№	Tm1 (°C)	Tagg 266 (°C)	Tonset (°C)	№	Tm1 (°C)	Tagg 266 (°C)	Tonset (°C)
PL-1	61,64	64,82	52,566	PL-11	65,88	-	57,976
PL-2	66,20	66,55	58,317	PL-12	65,54	67,94	-
PL-3	64,07	68,28	57,661	PL-13	71,85	68,17	58,581
PL-4	70,71	67,29	56,246	PL-14	74,18	69,42	58,589
PL-5	74,56	68,11	58,407	PL-15	70,96	69,91	58,622
PL-6	70,43	70,12	61,069	PL-16	63,48	68,98	58,702
PL-7	68,46	67,41	63,031	PL-17	70,15	69,86	56,193
PL-8	65,00	-	-	PL-18	-	69,43	-
PL-9	69,24	67,83	58,597	PL-19	-	69,52	57,766
PL-10	69,63	68,12	56,788				

### 1.3 Биспецифические антитела HJ

Конструирование биспецифических антител HJ в отношении hIL5 и hTSLP: от HJ-3 до HJ11, содержащих первую тяжелую цепь, вторую тяжелую цепь, первую легкую цепь и вторую легкую цепь, как описано ниже:

первая тяжелая цепь содержит [VH1-H]-[линкер 1]-[цепь титина]-[Fc1] в порядке от

N-конца к С-концу,

первая легкая цепь содержит [VL1-H]-[линкер 2]-[цепь обскурина] в порядке от N-конца к С-концу,

вторая тяжелая цепь содержит [VH2-J]-[CH1]-[Fc2] в порядке от N-конца к С-концу,

и

вторая легкая цепь содержит [VL2-J]-[CL] в порядке от N-конца к С-концу;

где VH1-H и VL1-H представляли собой переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи H0 в PCT/CN2021/070832, соответственно, и VH2-J и VL2-J представляли собой переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи J1 в PCT/CN2021/070832, соответственно. Структуры цепи обскурина, цепи титина, линкера 1 и линкера 2 в биспецифических антителах HJ по этому примеру показаны в следующей таблице.

Таблица 12. Цепь обскурина/цепь титина и линкеры в биспецифических антителах HJ

№	Первая тяжелая цепь		Первая легкая цепь	
	Цепь титина	Линкер 1	Цепь обскурина	Линкер 2
HJ-3	T.10	GGGGS	O.20	GGGGS
HJ-5	T.16	GGGGS	O.25	GGGGS
HJ-6	T.16	GGGGS	O.27	GGGGS
HJ-7	T.16	GGGGS	O.28	GGGGS
HJ-8	T.16	ASTKG	O.25	RTVAS
HJ-9	T.16	ASTKG	O.27	RTVAS
HJ-10	T.16	ASTKG	O.28	RTVAS
HJ-11	T.16	ASTKG	O.29	RTVAS

Антигенсвязывающую активность биспецифических антител HJ тестировали способом со ссылкой на тестовый пример 4 в PCT/CN2021/070832. Испытание на термическую стабильность проводили на антителах следующим способом: разбавления биспецифических антител HJ составляли с помощью буфера, содержащего 10 мМ уксусной кислоты при pH 5,5 и 9% сахарозы; биспецифические антитела концентрировали путем ультрафильтрации и концентрирования с получением различных концентраций растворов (концентрации биспецифических антител HJ показаны в Таблице 19) биспецифических антител HJ; концентрированные растворы инкубировали в инкубаторе при 40 °C, и образцы тестировали на чистоту SEC (эксклюзионная хроматография) на день 0 (т.е. перед началом

инкубации при 40 °С, D0), день 7 (7-й день инкубации при 40 °С, D7), день 14 (14-й день инкубации при 40 °С, D14), день 21 (21-й день инкубации при 40 °С, D21) и день 28 (28-й день инкубации при 40 °С, D28); после 28 дней инкубации при 40 °С образцы немедленно отбирали для определения чистоты CE-SDS (капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия). Экспериментальные результаты показали, что связывающая активность биспецифических антител HJ, сконструированных в настоящем изобретении, в отношении антигена существенно не изменилась; между тем, биспецифические антитела HJ-5-HJ-11 имели лучшую термическую стабильность, чем HJ-3.

Таблица № 13-1 Анализ активности связывания на биспецифических антителах HJ

№	hIL5	hTSLP	№	hIL5	hTSLP
	EC50 (нМ)			EC50 (нМ)	
HJ-3	17,38	3,234	HJ-8	18,74	3,332
HJ-5	15,96	2,639	HJ-9	10,86	3,184
HJ-6	37,05	2,884	HJ-10	20,81	3,173
HJ-7	17,69	2,182	HJ-11	9,464	3,005

Таблица 13-2 Результаты испытания стабильности в условиях ускоренного старения биспецифических антител HJ

№	Концентрация D0 (мг/мл)	D0 Чистота SEC (%)	D28 Чистота по SEC (%)	D28Δ Чистота по SEC (%)	D28 чистота по невосстановленному CE-SDS (%)
HJ-3	50	98	84	14	67
HJ-5	60,8	98,09	93,86	4,23	82,93
HJ-6	54	98,14	89,68	8,46	80,76
HJ-7	56,8	97,7	92,72	4,98	85,47
HJ-8	62,6	93,39	84,28	9,11	73,03
HJ-9	53,5	90,01	85,93	4,08	80,32
HJ-10	69,8	90,9	88,31	2,59	80,4
HJ-11	50,4	92,55	90,89	1,66	82,96

## Пример 2. Получение антигенных белков и антител

### 1.1 Структура антигенного белка

С белком EGFR человека (рецептор эпидермального фактора роста UniProt, номер Uniprot: P00533), используемым в качестве матрицы EGFR, His tag был слит на основе белка EGFR, и был разработан внеклеточный домен белка EGFR человека с His tag (сокращенно EGFR-His) для обнаружения настоящего изобретения. Аминокислотная последовательность является следующей.

Аминокислотная последовательность EGFR-His:

LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSF  
LKTIQEVAGYVLIANTVERIPLNLQIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMR  
NLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLSGSCQKCDPSCPNGS  
CWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDE  
ATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADS  
YEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAF  
RGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSL  
AVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSC  
KATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQC  
HPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHV  
CHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSHHHHHH

SEQ ID NO: 42

Примечание: подчеркнутая часть указывает на внеклеточный домен белка EGFR; выделенная курсивом часть указывает на метку His.

С белком HGFR человека (рецептор фактора роста гепатоцитов UniProt, номер Uniprot: P08581), используемым в качестве матрицы HGFR, метку His или Fc сливали на основе белка HGFR, и для обнаружения настоящего изобретения был разработан внеклеточный домен белка HGFR с меткой His (сокращенно HGFR-His) или внеклеточный домен белка HGFR с меткой Fc (сокращенно HGFR-Fc). Аминокислотная последовательность является следующей.

Аминокислотная последовательность HGFR-His:



ECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQ  
KVAEYKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANLSGGVWKDNNMALVVDTYYDDQLISCGSVN  
RGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVG  
NTINSSYFPDHPHLSISVRRLKETKDGFMFLTDQSYIDVLPFRDSYPIKYVHAFESNNFIY  
FLTVQRETLDAQTFHTRIIRFCSINSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAY  
VSKPGAQLARQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPIKYVNDFFNKIVNK  
NNVRCLQHFYGPNHEHCFNRLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLL  
TSISTFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDShpvsPEVIVEHTLNQNG  
YTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLSGTWTQQI  
CLPAIYKVFPNsAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTlSESTMN  
TLKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAGGTLTLTGNY  
LNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTIStEFAVKLKIDLANRETSIFSyREDPIV  
YEIHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINVHEAGRNFtVACQHRSNSEIICCTTPSL  
QQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNpVFKPFKpVMISMGNENVLEIKGNDID  
PEAVKGEVLKVGnkSCENIHLHSEAVLCTVPNDLLKLNSelNIEWKQAISSTVLGKVIVO  
PDQNFtHHHHHH

SEQ ID NO: 43

Примечание: подчеркнутая часть указывает на внеклеточный домен белка HGFR; выделенная курсивом часть указывает на метку His.

С белком HGF человека (фактор роста гепатоцитов UniProt, номер Uniprot: P14210), используемым в качестве матрицы HGF, был разработан белок HGF с His-меткой (сокращенно HGF-His) для обнаружения настоящего изобретения. Аминокислотная последовательность является следующей.

Аминокислотная последовательность HGF-His:

QRKRRNTIHEFKKSAKTTLIKIDPALKIKTKKVNTADQCANRCTRNKGLPFTCKA  
FVFDKARKQCLWFPFNSMSSGVKKEFGHEFDLYENKDYIRNCIIGKGRSYKGTVSITKSG  
IKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGKDLQENYCRNPRGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDIQC  
SEVECMTCSNGESYRGLMDHTESGKICQRWDHQTPHRHKFLPERYPDKGFDDNYCRNPD  
GQPRPWCYTLDPHTRWEYCAIKTCADNTMNDTDVPLETTECIQGQEGYRGTVNTIWN  
GIPCQRWDSQYPHEHDMTPENFKCKDLRENYCRNPDGSESPWCFTTDPNIRVGYCSQIP  
NCDMSHGQDCYRGNKGYMGNLSQTRSGLTCSMWDKNMEDLHRHIFWEPDASKLNE  
NYCRNPDDDAHGPPWCYTGNPLIPWDYCPISRCEGDTTPTIVNLDHPVISCAKTKQLRVV  
NGIPTRTNIGWMVSLRYRNKHICGGLIKESWVLTARQCFPSRDLKDYEAWLGIHDVHG  
RGDEKCKQVLNVSQLVYGPEGSDLVLMKLARPAVLDDFVSTIDLPNYGCTIPEKTSCSV  
YGWGYTGLINYDGLLRVAHLYIMGNEKCSQHHRGKVTLNESEICAGAEEKIGSGPCEGD  
YGGPLVCEQHMKRMVLGVIVPGRGCAIPNRPGFVVRVAYYAKWIHKIILTYKVPQSHHH  
*HHH*

SEQ ID NO: 44

Примечание: подчеркнутая часть указывает на белок HGF; выделенная курсивом часть указывает на метку His.

## 1.2 Очистка белков

### 1.2.1 Стадии очистки рекомбинантного белка:

Образец супернатанта клеточной экспрессии центрифугировали на высокой скорости для удаления примесей и заменяли буфером с PBS с последующим добавлением имидазола для получения конечной концентрации 5 мМ. Колонку никеля уравнивали раствором PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), содержащим 5 мМ имидазола, и промывали 2-5 объемами колонки. Образец клеточного супернатанта после замены буфера загружали в колонку Ni Sepharose excel (GE, 17-3712-02). Колонку промывали раствором PBS, содержащим 5 мМ имидазола, до тех пор, пока значение A280 не упадет до исходного уровня. Затем хроматографическую колонку промывали смесью PBS и 10 мМ имидазола для удаления неспецифически связанных примесных белков, и собирали элюат. Белок-мишень элюировали раствором PBS, содержащим 300 мМ имидазола, и собирали пики элюирования. Собранный элюат концентрировали и дополнительно очищали с использованием колоночной хроматографией с гелем Superdex200 (GE, 28-9893-35) с PBS в качестве подвижной фазы. Пики полимера удаляли и собирали пик элюирования. Полученный белок идентифицировали с помощью электрофореза, пептидного картирования и LC-MS (жидкостная хроматография с масс-спектрометрией), а затем аликвотировали для последующего использования, если было установлено, что он является правильным.

### 1.2.2 Стадии очистки антитела:

Образец супернатанта клеточной экспрессии центрифугировали на высокой скорости для удаления примесей, и супернатант подвергали аффинной хроматографии MabSelect Sure (GE, 17-5438-01). Хроматографическую колонку MabSelect Sure сначала регенерировали с 0,2 М NaOH, затем промывали чистой водой и уравнивали PBS. После связывания надосадочной жидкости колонку промывали PBS до тех пор, пока значение A280 не упадет до исходного уровня. Белок-мишень элюировали 0,1 М ацетатным буфером при pH 3,5 и нейтрализовали 1 М Tris-HCl. Образец элюирования надлежащим образом концентрировали и дополнительно очищали с использованием колоночной хроматографии с гелем Superdex200 (GE, 28-9893-35), уравновешенной PBS, и белок-мишень концентрировали до соответствующей концентрации в приемной пробирке, где собирали белок-мишень. Этот способ применяли для очистки антител, участвующих в настоящем изобретении.

Пример 3. Получение и идентификация биспецифических антител, специфически связывающихся с HGFR и EGFR

Антитела, специфически связывающиеся с HGFR и EGFR, конструировали с использованием молекулы, специфически связывающейся с HGFR, и молекулы, специфически связывающейся с EGFR.

#### 1. Молекула, специфически связывающаяся с EGFR

Молекулы, специфически связывающиеся с EGFR, могут быть получены из любого подходящего антитела, такого как залутумумаб (сокращенно Zal) или его варианта (например, Zal.1, который был получен путем мутации первого аминокислотного остатка легкой цепи Zal от A до D), где:

> аминокислотная последовательность тяжелой цепи Zal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWD  
DGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKD  
YFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCD  
KTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

SEQ ID NO: 1

> аминокислотная последовательность легкой цепи Zal:

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESG  
VPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNYSYPLTFGGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL  
TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 2

> аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи Zal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWD  
 DGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKD  
 YFDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 3

> аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи Zal:

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESG  
 VPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNYSYPLTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 4

> аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи Zal.1:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESG  
VPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNYSYPLTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 5

> аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи Zal.1, представленной в SEQ ID NO: 3.

Последовательности CDR Zal и Zal.1 показаны в таблице 14:

Таблица 14. CDR молекул, специфически связывающихся с EGFR

Антитело	Тяжелая цепь		Легкая цепь	
Zal.1, Zal	HCDR1	TYGMH (SEQ ID NO: 6)	LCDR1	RASQDISSALV (SEQ ID NO: 9)
	HCDR2	VIWDDGSYKYYGDSVKG (SEQ ID NO: 7)	LCDR2	DASSLES (SEQ ID NO: 10)
	HCDR3	DGITMVRGVMKDYFDY (SEQ ID NO: 8)	LCDR3	QQFNYSYPLT (SEQ ID NO: 11)

Примечание: вышеуказанные CDR определяются по схеме нумерации по Кабату.

2. Молекула, специфически связывающаяся с HGFR

Молекулы, специфически связывающиеся с HGFR, могут быть получены из любого

подходящего антитела, включая антитела, такие как онартузумаб (сокращенно Omab), описанные в международной публикации № WO2013003680A1 (полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки), антитела, такие как Ab10, описанные в международной публикации № WO2016165580A1 (полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки) и мутантные антитела вышеуказанных антител. Среди них аминокислотные последовательности переменных областей Omab и Ab10 являются следующими:

> аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи Omab:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDP  
SNSDTRFNP~~NFK~~DRTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQG  
TLVTVSS

SEQ ID NO: 12

> аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи Omab:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPKAPKLLIY  
WASTRESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYYAYPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 13

> аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи Ab10:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLSNYGVHWVRQAPGKGLEWLAVIWS  
GGSTNYAAAFVSRLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARNH~~DN~~PNYAMDYW  
QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 14

> аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи Ab10:

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRADKSVSTSTYNYLHWYQQKPGQPPKLLIYLAS  
NLASGVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQH~~SR~~DLPPTFGQGTKLEIKR

SEQ ID NO: 15

Мутантное антитело Ab10.1 было получено путем мутации CDR Ab10; константные области Ab10.1 были идентичны константным областям Ab10. Аминокислотные последовательности переменных областей Ab10.1 являются следующими:

> аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи Ab10.1:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLSDYGVHWVRQAPGKGLEWLAVIWS  
GGSTNYADAFVSRLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARNH~~DN~~PNYAMDYWG  
QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 16

> аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи Ab10.1:

**DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRADKSVSTSTYNYLHWYQQKPGQPPKLLIYRGS**  
**FLATGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRDLPPFTFGQGTKLEIK**

SEQ ID NO: 17

Примечание: в приведенных выше последовательностях молекул, специфически связывающихся с HGFR, подчеркнутые части представляют собой части области CDR, определенные в соответствии со схемой нумерации по Кабату, а выделенные курсивом и полужирным части представляют собой мутированные аминокислотные остатки.

CDR молекул, специфически связывающихся с HGFR, показаны в таблице 15:

Таблица 15. CDR молекул, специфически связывающихся с HGFR

Антитело	Тяжелая цепь		Легкая цепь	
Omab	HCDR1	SYWLH (SEQ ID NO: 18)	LCDR1	KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID NO: 21)
	HCDR2	MIDPSNSDTRFNPFKD (SEQ ID NO: 19)	LCDR2	WASTRES (SEQ ID NO: 22)
	HCDR3	YRSYVTPLDY (SEQ ID NO: 20)	LCDR3	QQYYAYPWT (SEQ ID NO: 23)
Ab10	HCDR1	NYGVH (SEQ ID NO: 24)	LCDR1	RADKSVSTSTYNYLH (SEQ ID NO: 27)
	HCDR2	VIWGGSTNYAAAFVS (SEQ ID NO: 25)	LCDR2	LASNLAS (SEQ ID NO: 28)
	HCDR3	NHDNPYNYAMDY (SEQ ID NO: 26)	LCDR3	QHSRDLPPT (SEQ ID NO: 29)
Ab10.1	HCDR1	DYGVH (SEQ ID NO: 30)	LCDR1	RADKSVSTSTYNYLH (SEQ ID NO: 27)
	HCDR2	VIWGGSTNYADAFVS (SEQ ID NO: 31)	LCDR2	RGSFLAT (SEQ ID NO: 33)
	HCDR3	NHDNPYIYAMDY (SEQ ID NO: 32)	LCDR3	QHSRDLPPT (SEQ ID NO: 29)

Примечание: вышеуказанные CDR определяются по схеме нумерации по Кабату.

### 3. Биспецифические антитела, специфически связывающиеся с HGFR и EGFR

Биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, специфически связывающуюся с HGFR и EGFR и имеющую структуру формата 1 или формата 2, конструировали с использованием молекулы, специфически связывающейся с HGFR, и молекулы,

специфически связывающейся с EGFR. Структурная схема формата 1 показана на фиг. 1, а структурная схема формата 2 показана на фиг. 2, где

Формат 1 содержит 4 цепи со следующими структурами, где:

цепь 1 представляет собой

VH (антитело к EGFR)-линкер 1-VH (антитело к HGFR 1)-IgG<sub>1</sub> (CH1)-IgG<sub>1</sub>Fc (выступ);

цепь 2 представляет собой VL (антитело к EGFR)-линкер 1-VL (антитело к HGFR 1)-CL;

цепь 3 представляет собой VH (антитело 2 к HGFR)-линкер 2-цепь титина-IgG<sub>1</sub>Fc (впадина);

цепь 4 представляет собой VL (антитело 2 к HGFR)-линкер 2-цепь обскурина.

Формат 2 содержит 4 цепи со следующими структурами, где:

цепь 1 представляет собой VH (антитело к HGFR)-IgG<sub>1</sub> (CH1)-IgG<sub>1</sub>Fc (выступ);

цепь 2 представляет собой VL (антитело к HGFR)-CL;

цепь 3 представляет собой VH (антитело к EGFR)-линкер 2-цепь титина-IgG<sub>1</sub>Fc (впадина) и

цепь 4 представляет собой VL (антитело к EGFR)-линкер 2-цепь обскурина.

В качестве примера, EM1, имеющее структуру формата 1, и EM2, имеющее структуру формата 2, были сконструированы с использованием Ab10.1 (антитело к HGFR 1), Omab (антитело к HGFR 2), Zal.1 (антитело к EGFR), константной области тяжелой цепи IgG<sub>1</sub> человека/константной области легкой цепи каппа и T.16 (цепь титина)/O.28 (цепь обскурина).

Аминокислотные последовательности 4 цепей EM1 являются следующими.

Аминокислотная последовательность цепи 1 EM1:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWD  
DGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKD  
YFDYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLSYGV  
HWVRQAPGKLEWLAVIWSGGSTNYADAFVSRLTISKDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAV  
YYCARNHDNPIYIYAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF  
PEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV  
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
ITPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность цепи 2 EM1:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLES  
GVPSRFGSGESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKGGGGSGGGG  
DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRADKSVSTSTYNYLHWYQQKPGQPPKLLIYRGSFLAT  
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRDLPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI  
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSL  
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 35

Аминокислотная последовательность цепи 3 EM1:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDP  
SNSDTRFNPFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQ  
GTLVTVSSGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTGGGRKIHSQEQ  
GRFHIENTDDSTLTIKDVOKQDGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSIDKTHTCPPCPAP  
ELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC  
TLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSK  
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

SEQ ID NO: 36

Аминокислотная последовательность цепи 4 EM1:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIY  
WASTRESGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYAYPWTFGQGTKVEIKG  
GGGSSGAPRFLTRPKASVSVGKDATLSCOIVGNPFPOVSWEKDKOPVTAGVRFRLAQ  
DGDLYRLKILDLOLSDSGOYVCRARNAHGEAFACLGLOVDAEA

SEQ ID NO: 37

Аминокислотные последовательности 4 цепей EM2 являются следующими.

Аминокислотная последовательность цепи 1 EM2:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDP  
SNSDTRFNPFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQ  
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC  
REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

SEQ ID NO: 38



Аминокислотная последовательность цепи 2 EM2:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQOKPGKAPKLLIY  
WASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYAYPWTFGGGTKVEIKRT  
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 39

Аминокислотная последовательность цепи 3 EM2:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAIVW  
DDGSYKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMK  
DYFDYWGQGLVTVSSGGGGSGIPPKIECLPIDISIDEGKVLTVASAFTGEPTPEVTWSTG  
GRKIHSEEQGRFHIENTDDSTTLTIKDVOKODGGLYTLTLRNEFGSDSATVNIHIRSIDKT  
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
GOPREPOVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD  
SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 40

Аминокислотная последовательность цепи 4 EM2:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSALVWYQOKPGKAPKLLIYDASSLES  
GVPSRFSGSESGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIKGGGGSSGAPR  
FLTRPKASVSVGKDATLSCOIVGNPFPOVSWEKDKOPVTAGVRFRLAODGDLYRLKIL  
DLQLSDSGOYVCRARNAHGEAFACLGLOVDAEA

SEQ ID NO: 41

Примечание: в вышеуказанных последовательностях одинарная подчеркнутая часть указывает на переменную область, пунктирная подчеркнутая часть указывает на CL, пунктирная подчеркнутая часть указывает на Fc-область, выделенная курсивом часть указывает на CH1, двойная подчеркнутая часть указывает на линкер, а волнистая часть линии указывает на цепь обскурина/цепь титина-Т.

Аминокислотная последовательность линкера 1: GGGGSGGGG (SEQ ID NO: 105);

Аминокислотная последовательность линкера 2: GGGGS (SEQ ID NO: 106);

Аминокислотная последовательность IgG<sub>1</sub>Fc (выступ):

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPOVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 107)

Аминокислотная последовательность IgG<sub>1</sub>Fc (отверстие):

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAAGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  
TPPVLDSDGSFFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 108)

CL:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
VTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 120).

Тестовые примеры

Тестовый пример 1: Эксперимент с аффинностью и кинетикой связывания *in vitro* с помощью анализа Biacore

Аффинность тестируемой молекулы к EGFR человека (SEQ ID NO: 42) или белку HGFR человека (SEQ ID NO: 43) определяли с помощью Biacore T200 (GE) следующим образом:

Молекулы антител захватывали с аффинностью на биосенсорном чипе белка А, антигены которого протекали через поверхность в течение 180 с, а затем молекулы антител диссоциировали в течение 600 с. Сигналы реакции детектировали в режиме реального времени с использованием прибора Biacore T200 для получения кривых ассоциации и диссоциации. После завершения диссоциации для каждого цикла биосенсорный чип промывали 10 mM Gly-HCl (pH 1,5) для восстановления. Данные подгоняли с использованием модели 1:1 и получали значения аффинности тестируемых молекул. В этом примере положительный контроль MCLA представлял собой биспецифическое антитело, специфически связывающееся с HGFR и EGFR (конкретные последовательности см. в PB8532 в WO2019031965).

Результаты эксперимента приведены в таблице 16. Экспериментальные результаты показали, что все мутантные антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы, сконструированные в настоящем изобретении, имеют очень сильную аффинность, где аффинность Ab10.1 была по меньшей мере в 4 раза выше, чем аффинность исходного антитела Ab10.

Таблица 16. Аффинность *in vitro* антител согласно настоящему изобретению к EGFR или HGFR человека

Антитело	Антиген	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (M)
EM1	EGFR-His	1,42E+05	1,03E-03	7,29E-09
	HGFR-His	5,48E+04	1,24E-04	2,26E-09
EM2	EGFR-His	1,16E+05	9,48E-04	8,17E-09
	HGFR-His	5,05E+04	1,53E-04	3,04E-09
MCLA	EGFR-His	6,85E+04	4,73E-03	6,91E-08
	HGFR-His	2,95E+04	3,03E-04	1,03E-08
Zal	EGFR-His	7,16E+04	1,44E-03	2,01E-08
Ab10.1	HGFR-His	4,08E+04	3,09E-04	7,56E-09
Ab10	HGFR-His	2,64E+04	8,70E-04	3,30E-08

### Тестовый пример 2: Эксперимент по связыванию антител с клетками *in vitro*

Активность связывания антигенсвязывающих молекул, специфически связывающихся с HGFR и EGFR, с клетками определяли с помощью проточного цитометра. Стабильно трансфицированный штамм клеток EGFR CHO-S, стабильно трансфицированный штамм клеток HGFR CHO-S и штамм опухолевых клеток H1975-HGF или MKN-45 при  $1 \times 10^6$  клеток/мл блокировали 1% буфером BSA (бычий сывороточный альбумин) PBS с последующим добавлением разбавленных образцов антител в различных концентрациях (C25 представлял собой отрицательный контроль, который представлял собой белок антитела IgG<sub>1</sub> нерелевантных мишеней, то же самое применяется в дальнейшем), и смеси инкубировали в течение 1 часа. После того, как смеси дважды промывали, добавляли R-PE-козье антитело к человеческого (H + L) (Invitrogen, Кат. № H10104) и инкубировали смеси в течение 0,5 ч. После того, как планшет дважды промывали, считывали сигналы флуоресценции с помощью проточного цитометра.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 3-6. Экспериментальные результаты показали, что антигенсвязывающие молекулы, специфически связывающиеся с HGFR и EGFR по настоящему изобретению, обладают более сильной способностью связывания с опухолевыми клетками, чем у положительного антитела MCLA.

### Тестовый пример 3: Эксперимент по блокированию антител, противодействующих связыванию EGFR с EGF

Способность антител блокировать EGF/EGFR проверяли с помощью ELISA. 1 мкг/мл антитела кролика к His (GenScript, A01857) покрывали в течение ночи при 4 °C, а затем блокировали. После промывки планшета добавляли 2 мкг/мл EGFR-His (SEQ ID NO: 42) и планшет инкубировали в течение 1 часа. После промывки планшета добавляли 2

мкг/мл EGF-mFc (Acro, EGF-H525b) и разбавленные антитела в различных концентрациях, и планшет инкубировали в течение 1 часа. После промывки планшета добавляли пероксидазу хрена антитело козы к IgG мыши к (Jackson, 115-035-062) и планшет инкубировали в течение 1 часа. После промывки планшета добавляли раствор тетраметилбензидина для проявления цвета. Наконец, добавляли стоп-раствор. Значения OD450 (оптическая плотность при 450 нм) измеряли на микропланшетном ридере. В этом примере положительный контроль JNJ представлял собой биспецифическое антитело, специфически связывающееся с HGFR и EGFR (JNJ, также известный как амивантамаб, см. WHO Drug Information, 33 (2): 237-239 для конкретных последовательностей).

Результаты эксперимента приведены в таблице 17. Экспериментальные результаты показали, что антигенсвязывающие молекулы, специфически связывающиеся с HGFR и EGFR по настоящему изобретению, могут эффективно блокировать связывание EGF с EGFR.

Таблица 17. Экспериментальные результаты биспецифических антигенсвязывающих молекул, блокирующих связывание EGF с EGFR

Антитело	IC <sub>50</sub> (мкг/мл)	Макс (%)
EM1	2,37	93,5
EM2	2,60	94,5
JNJ	3,66	90,5

Тестовый пример 4: Эксперимент по блокированию антител, противодействующих связыванию HGFR с HGF

Способность антител блокировать HGF/HGFR проверяли с помощью ELISA. 5 мкг/мл HGFR-His (последовательность см. в SEQ ID NO: 43) покрывали в течение ночи при 4 °C, а затем блокировали. После промывки планшета добавляли 2 мкг/мл био-HGF-His (последовательность см. в SEQ ID NO: 44) и разбавленные антитела в различных концентрациях, и планшет инкубировали в течение 1 часа. После промывки планшета добавляли пероксидазу хрена-стрептавидин (Jackson, 016-030-084) и планшет инкубировали в течение 1 часа. После промывки планшета добавляли раствор тетраметилбензидина для проявления цвета. Наконец, добавляли стоп-раствор. Значения OD450 измеряли на микропланшетном ридере.

Результаты эксперимента приведены в таблице 18. Экспериментальные результаты показали, что антигенсвязывающая молекула, специфически связывающаяся с HGFR и EGFR по настоящему изобретению, блокирует связывание HGFR с HGF с большей

максимальной блокирующей силой, чем у положительного контроля антитела JNJ.

Таблица 18. Экспериментальные результаты биспецифических антигенсвязывающих молекул, блокирующих связывание HGF с HGFR

Антитело	IC <sub>50</sub> (мкг/мл)	Макс (%)
EM1	0,25	95,5
JNJ	0,27	82,3
MCLA	1,36	94,1

Тестовый пример 5: Эксперимент по ингибированию клеточного фосфорилирования EGFR с помощью антител

Клетки H292 (также известные как NCI-H292, клетки рака легкого человека (метастазы в лимфатические узлы) в Банке клеток Китайской академии наук, применяемые в дальнейшем) высевали в 96-луночный планшет (Corning, 3599) при 12000 клеток/лунку в среде RPMI1640 (среда Мемориального института Розуэлл-Парк 1640) + 10% FBS, а затем 96-луночный планшет инкубировали в инкубаторе при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. На следующий день среду отбрасывали и заменяли бессывороточной средой (RPMI640 + 25 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) + 0,1 мМ NEAA (заменимая аминокислота) + 1 мМ раствор пирувата натрия), и клетки подвергали голоданию в течение 16-20 часов. На третий день каждое антитело получали в первой концентрации 6 мкМ и подвергали 5-кратному градиентному разбавлению, и заменяли среду для голодания. Клетки инкубировали в инкубаторе при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 часа, и в течение этого периода добавляли 50 мкл 100 нг/мл rEGF (R&D, 236-EG-200). Клетки инкубировали в инкубаторе при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в течение еще 15 мин. Наконец, фосфорилированный EGFR был обнаружен в соответствии с инструкциями набора PHOSPHO-EGFR (TYR1068) KITS (Cisbio, 64EG1PEG).

Экспериментальные результаты показаны на фиг. 7. Экспериментальные результаты показали, что антигенсвязывающие молекулы, специфически связывающиеся с HGFR и EGFR по настоящему изобретению, способны эффективно ингибировать клеточное фосфорилирование EGFR.

Тестовый пример 6: Эксперимент по ингибированию клеточного фосфорилирования HGFR с помощью антител

Клетки H292 высевали в 96-луночный планшет (Corning, 3599) при 12000 клеток/лунку в среде RPMI1640 + 10% FBS, а затем 96-луночный планшет инкубировали в

инкубаторе при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. На следующий день среду отбрасывали и заменяли бессывороточной средой (RPMI640 + 25 mM HEPES + 0,1 mM NEAA + 1 mM раствор пирувата натрия), и клетки подвергали голоданию в течение 16-20 часов. На третий день каждое антитело получали в первой концентрации 1 мкМ и подвергали 10-кратному градиентному разбавлению, и заменяли среду для голодания. Клетки инкубировали в инкубаторе при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 часа, и в течение этого периода добавляли 50 мкл 200 нг/мл rHGF (R&D, 294-HG-005). Клетки инкубировали в инкубаторе при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в течение еще 30 мин. Наконец, фосфорилированный HGFR определяли в соответствии с инструкциями набора для анализа p-c-Met (Tyr1234/1235) (PerkinElmer, ALSU-PCMET-A50).

Экспериментальные результаты показаны на фиг. 8. Экспериментальные результаты показали, что антигенсвязывающие молекулы, специфически связывающиеся с HGFR и EGFR по настоящему изобретению, способны эффективно ингибировать клеточное фосфорилирование HGFR с более сильной ингибирующей способностью, чем у Ab10.1.

Тестовый пример 7: Эксперимент по ингибированию клеточного фосфорилирования АКТ с помощью антител

Клетки H292 высевали в 96-луночный планшет (Corning, 3599) при 12000 клеток/луночку в среде RPMI640 + 10% FBS, а затем 96-луночный планшет инкубировали в инкубаторе при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. На следующий день среду отбрасывали и заменяли бессывороточной средой (RPMI640 + 25 mM HEPES + 0,1 mM NEAA + 1 mM раствор пирувата натрия), и клетки подвергали голоданию в течение 16-20 часов. На третий день каждое антитело получали в первой концентрации 4 мкМ и подвергали 5-кратному градиентному разбавлению, и заменяли среду для голодания. Клетки инкубировали в инкубаторе при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 часа, и в течение этого периода добавляли 50 мкл 200 нг/мл rHGF (R&D, 294-HG-005) и 50 нг/мл rEGF (R&D, 236-EG-200) и хорошо перемешивали. Клетки инкубировали в инкубаторе при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в течение еще 1 часа. Наконец, фосфорилированный АКТ обнаруживали в соответствии с инструкциями набора PHOSPHO-AKT (SER473) KITS (Cisbio, 64AKSPEG). Уровень внутриклеточного фосфорилирования АКТ отражали отношением значения сигнала флуоресценции при 665 нм к значению сигнала флуоресценции при 620 нм, то есть соотношение = значение сигнала флуоресценции при 665 нм/значение сигнала флуоресценции при 620 нм × 10<sup>4</sup>, в котором чем выше было отношение, тем выше был уровень внутриклеточного фосфорилирования АКТ.

Экспериментальные результаты показаны на фиг. 9. Экспериментальные результаты

показали, что антигенсвязывающие молекулы, специфически связывающиеся с HGFR и EGFR по настоящему изобретению, способны эффективно ингибировать клеточное фосфорилирование АКТ с более сильной ингибирующей способностью, чем у антитела положительного контроля.

Тестовый пример 8: Снижение экспрессии HGFR на клеточных поверхностях антителами

Клетки HCC827 (клетки немелкоклеточного рака легкого человека, полученные из АТСС) высевали в 6-луночный планшет при  $3 \times 10^5$  клеток/лунку в среде RPMI1640 + 10% FBS, а затем 6-луночный планшет инкубировали в инкубаторе при 37 °С с 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. Каждое антитело готовили с концентрацией 200 нМ, обрабатывали и реагировали в течение 18 часов. После обработки клетки промывали один раз PBS и добавляли 500 мкл бесферментного буфера для диссоциации клеток (Gibco, #13151) для сбора клеток. Клетки выделяли из бесферментного буфера для диссоциации клеток центрифугированием. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили с использованием козьего антитела к HGFR человека (R&D systems, AF276) при 4 °С в течение 1 часа. Затем клетки дважды промывали PBS, содержащим 2% FBS. Затем добавляли вторичное антитело осли против овцы ALEXA488 (Thermo Fisher, A-11055), и реакцию проводили при 4 °С в течение 1 часа. После двукратной промывки клетки фиксировали с помощью BD Cytotfix (BD, #554655). После повторной промывки клеток PBS значения сигнала флуоресценции считывали с помощью проточного цитометра.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 10. Экспериментальные результаты показали, что антигенсвязывающие молекулы, специфически связывающиеся с HGFR и EGFR по настоящему изобретению, способны более эффективно снижать HGFR на клеточных поверхностях, тем самым ингибируя сигнальные пути рецептора по сравнению с антителом положительного контроля.

Тестовый пример 9: Эксперимент по ингибированию пролиферации клеток SNU-5 (клетки рака желудка человека) с помощью антител

Клетки SNU-5 (клетки рака желудка человека, полученные из АТСС) высевали в 96-луночный планшет (Corning, 3903) при 4000 клеток/лунку в среде IMDM + 5% FBS, а затем 96-луночный планшет инкубировали в инкубаторе при 37 °С с 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. Каждое антитело готовили в концентрации 5 мкМ, подвергали 5-кратному градиентному разбавлению и добавляли в 96-луночный планшет, описанный выше. Затем клетки инкубировали в инкубаторе при 37 °С с 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 дней. Наконец,

люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® (Promega, G7573) был составлен в соответствии с инструкциями. В каждую лунку добавляли 50 мкл СТГ и инкубировали клетки при комнатной температуре в течение 10 мин. После герметизации планшета герметизирующей мембраной интенсивность люминесценции (сокращенно Lum) определяли с помощью многометочной системы обнаружения микропланшетов (PerkinElmer, victor3).

Формула расчета была следующей: Lum = значение анализа – показание среды;  
%ингибирования =  $(Lum_0 - Lum) / Lum_0 \times 100\%$ ,

где Lum<sub>0</sub> представляет собой интенсивность люминесценции лунки с антителом в концентрации 0, а Lum представляет собой интенсивность люминесценции лунки с антителом при каждой концентрации разведения.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 11. Экспериментальные результаты показали, что антигенсвязывающая молекула, специфически связывающаяся с HGFR и EGFR по настоящему изобретению, обладает более сильной способностью ингибировать пролиферацию клеток SNU-5, чем антитело положительного контроля.

Тестовый пример 10: Эксперимент ADCC-киллинга опухолевых клеток с помощью антитела

Антитела подготавливали в концентрации 200 нМ и подвергали 5-кратному градиентному разбавлению. Опухолевые клетки: собирали клетки Hs746T (клетки рака желудка человека, Nanjing Kebai Biotechnology Co., Ltd.) и клетки H292. После однократной промывки клеток PBS плотность клеток доводили до  $1 \times 10^6$  клеток/мл буфером (PBS + 10% FBS + 20 мМ HEPES), а затем к 2 мл клеток добавляли 3 мкл реагента BATDA (PerkinElmer, AD0116). Смесь инкубировали в инкубаторе при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 15 мин. После центрифугирования клетки трижды промывали промывочным буфером (PBS + 20 мМ HEPES) и подсчитывали, и плотность клеток доводили до  $1 \times 10^5$  клеток/мл. Клетки NK92-FCGR3A (176V) (клетки NK92, стабильно трансформированные FCGR3A (176V), приобретенные у Nanjing Kebai Biotechnology Co., Ltd.) собирали и промывали один раз PBS. Затем клетки ресуспендировали со средой и подсчитывали, и плотность клеток доводили до  $5 \times 10^5$  клеток/мл. Наконец, 100 мкл клеток NK92-FCGR3A (176V), 50 мкл разбавленных антител и 50 мкл меченых опухолевых клеток добавляли в 96-луночный планшет (Corning, 3788). Между тем, устанавливали лунку для спонтанного контроля высвобождения, которая не содержала клеток NK92-FCGR3A (176V), но содержала 100 мкл среды; устанавливали лунку для положительного контроля, которая содержала 10 мкл буфера для лизиса + 50 мкл меченых опухолевых клеток + 140 мкл среды; устанавливали



лунку для контроля фона, которая содержала 50 мкл меченого клеточного супернатанта + 150 мкл среды. 96-луночный планшет затем центрифугировали при 300 об/мин в течение 2 мин и инкубировали в инкубаторе при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 2 ч. 100 мкл супернатанта переносили в новый 96-луночный планшет (Corning, 3788). После центрифугирования планшета при 300 g в течение 5 мин 20 мкл супернатанта переносили в планшет для детектирования (PerkinElmer, AD0116), а затем добавляли 200 мкл раствора европия (PerkinElmer, AD0116). Планшет встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут, и, наконец, обнаруживали TRF, где EM1 (afuc) является дефукозилированным EM1, а EM2 (afuc) является дефукозилированным EM2.

Формула расчета была следующей: %удельного высвобождения = (экспериментальное высвобождение – спонтанное высвобождение)/(максимальное высвобождение – спонтанное высвобождение) × 100.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 12 и 13. Экспериментальные результаты показали, что антигенсвязывающие молекулы, специфически связывающиеся с HGFR и EGFR по настоящему изобретению, могут значительно улучшить способность ADCC уничтожать клетки после дефукозилирования.

Тестовый пример 11: Эксперимент по фармакодинамике антител *in vivo* на мышинной модели H1975-HGF

Клетки H1975-HGF (клетки H1975 (клетки аденокарциномы легкого человека, ATCC), стабильно трансформированные человеческим HGF) инокулировали подкожно в правый бок голых самок мышей CD1 (Vital River) в количестве  $5 \times 10^6$  клеток.

Когда размер опухоли составлял 189 мм<sup>3</sup>, животных случайным образом группировали по 10 мышей на группу в соответствии с размером опухоли, включая группу C25-3 мг/кг массы тела (отрицательный контроль, который представлял собой белок антитела IgG<sub>1</sub> нерелевантных мишеней, вводимый в дозе 3 мг/кг), группу JNJ-3 мг/кг массы тела (положительный контроль, вводимый в дозе 3 мг/кг) и группу EM1-3,5 мг/кг массы тела (испытуемая группа EM1, вводимая в дозе 3,5 мг/кг). Начиная со дня, когда животные были сгруппированы (день 0), мышам внутрибрюшинно вводили инъекцию два раза в неделю в течение 2-3 недель. Объемы опухоли и массу тела измеряли два раза в неделю, а результаты фиксировали. Данные были статистически проанализированы с помощью Т-критерия, где C25-3 мг/кг массы тела, JNJ-3 мг/кг массы тела и EM1-3.5 мг/кг массы тела были эквимоллярными.

Объем опухоли (Т) рассчитывали следующим образом:  $T = 1/2 \text{ длина} \times (\text{ширина})^2$ ;

Относительная скорость пролиферации опухоли  $T/C\% = (T - T_0)/(C - C_0) \times 100\%$ ;

Ингибирование роста опухоли (TGI%) =  $1 - T/C$  %;

где T и T<sub>0</sub> представляли собой объемы опухоли в группе введения, где T<sub>0</sub> представлял собой объем опухоли в начале эксперимента; c и C<sub>0</sub> представляли собой объемы опухоли в группе отрицательного контроля, где C<sub>0</sub> представлял собой объем опухоли в группе отрицательного контроля в начале эксперимента.

Результаты эксперимента приведены в таблице 19. Экспериментальные результаты показали, что антигенсвязывающая молекула, специфически связывающаяся с HGFR и EGFR по настоящему изобретению, может значительно ингибировать рост опухолевых клеток, и на 21 день средний объем опухоли эквимоллярной антигенсвязывающей молекулы, специфически связывающейся с HGFR и EGFR по настоящему изобретению, был меньше половины объема опухоли положительного контроля, что указывает на то, что эффективность ингибирования опухоли сильнее, чем у антитела JNJ положительного контроля.

Таблица 19. Эксперимент по фармакодинамике антител *in vivo* на мышинной модели H1975-HGF

Группа	Средний объем опухоли День 0	Средний объем опухоли День 21	Ингибирование роста опухоли (%) День 21
C25-3 мг/кг массы тела	189,46	2355,30	-
JNJ-3 мг/кг массы тела	190,07	551,37	83,32%
EM1-3,5 мг/кг массы тела	189,63	261,10	96,70%

Тестовый пример 12: Эксперимент по фармакодинамике антител *in vivo* на мышинной модели HCC827

Клетки HCC827 (клетки немелкоклеточного рака легкого человека, полученные из ATCC) инокулировали подкожно в правый бок самок мышей NUNU (Vital River) в количестве  $8,555 \times 10^6$  клеток.

Когда размер опухоли составлял 200 мм<sup>3</sup>, животных случайным образом группировали по 10 мышей на группу в зависимости от размера опухоли, включая группу C25-3 мг/кг массы тела (отрицательный контроль, где C25 представлял собой белок антитела IgG<sub>1</sub> нерелевантных мишеней и вводили в дозе 3 мг/кг), группу MCLA-3 мг/кг массы тела (положительный контроль, вводимый в дозе 3 мг/кг), группу EM1-3,5 мг/кг массы тела (испытуемая группа с высокой дозой EM1, вводимая в дозе 3,5 мг/кг), группу

EM1-1,17 мг/кг массы тела (испытуемая группа с низкой дозой EM1, вводимая в дозе 1,17 мг/кг) и группу EM2-3 мг/кг массы тела (испытуемая группа EM2, вводимая в дозе 3 мг/кг). Начиная со дня, когда животные были сгруппированы (день 0), мышам внутрибрюшинно вводили инъекцию два раза в неделю в течение 2-3 недель. Объемы опухоли и массу тела мышей измеряли два раза в неделю и фиксировали результаты. При этом C25-3 мг/кг массы тела, MCLA-3 мг/кг массы тела, EM1-3,5 мг/кг массы тела и EM2-3 мг/кг массы тела были эквимоллярными.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 14. Экспериментальные результаты показали, что антигенсвязывающие молекулы, специфически связывающиеся с HGFR и EGFR по настоящему изобретению, могут значительно ингибировать рост опухолевых клеток, и опухолеингибирующий эффект был сильнее, чем у антитела положительного контроля.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающая молекула, содержащая:

по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент 1, специфически связывающийся с HGFR (рецептор фактора роста гепатоцитов), и

по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR (рецептор эпидермального фактора роста);

где

антигенсвязывающий фрагмент 1 содержит переменную область тяжелой цепи M-VH (VH, специфически связывающаяся с HGFR) и переменную область легкой цепи M-VL, где M-VH содержит M-HCDR1 (определяющая комплементарность область тяжелой цепи 1, специфично связывающаяся с HGFR), M-HCDR2 и M-HCDR3, и M-VL содержит M-LCDR1 (определяющая комплементарность область легкой цепи 1, специфически связывающаяся с HGRF), M-LCDR2 и M-LCDR3, где:

(i) M-HCDR1, M-HCDR2 и M-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 16, соответственно, и

M-LCDR1, M-LCDR2 и M-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 17, соответственно, или

(ii) M-HCDR1, M-HCDR2 и M-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 12, соответственно, и

M-LCDR1, M-LCDR2 и M-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 13, соответственно, или

(iii) M-HCDR1, M-HCDR2 и M-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 14, соответственно, и

M-LCDR1, M-LCDR2 и M-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 15, соответственно;

антигенсвязывающий фрагмент 2 содержит переменную область тяжелой цепи E-VH (VH, специфически связывающаяся с EGFR) и переменную область легкой цепи E-VL, где E-VH содержит E-HCDR1 (HCDR1, специфически связывающаяся с EGFR), E-HCDR2 и E-HCDR3, и E-VL содержит E-LCDR1, E-LCDR2 и E-LCDR3,

где E-HCDR1, E-HCDR2 и E-HCDR3 содержат аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 3, соответственно, и

E-LCDR1, E-LCDR2 и E-LCDR3 содержат аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 5, соответственно;

предпочтительно,

E-HCDR1, E-HCDR2, E-HCDR3, E-LCDR1, E-LCDR2 и E-LCDR3 определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату, E-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, E-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, E-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, E-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, E-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и E-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; и

M-HCDR1, M-HCDR2, M-HCDR3, M-LCDR1, M-LCDR2 и M-LCDR3 определены в соответствии со схемой нумерации по Кабату, где

(i) M-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, M-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, M-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, M-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, M-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, и M-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, или

(ii) M-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, M-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, M-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, M-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, M-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, и M-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, или

(iii) M-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, M-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, M-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, M-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, M-LCDR2

содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, и M-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29.

2. Антигенсвязывающая молекула по п. 1, где:

(i) антигенсвязывающая молекула содержит два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающихся с HGFR;

в одном из антигенсвязывающих фрагментов 1 его M-VH имеет: M-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, M-HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, и M-HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и его M-VL имеет: M-LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, M-LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, и M-LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29;

в другом антигенсвязывающем фрагменте 1 его M-VH имеет: M-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, M-HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и M-HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и его M-VL имеет: M-LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, M-LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, и M-LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; и

в антигенсвязывающем фрагменте 2 его E-VH имеет: E-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, E-HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и E-HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и его E-VL имеет: E-LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, E-LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и E-LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11; или

(ii) в антигенсвязывающем фрагменте 1 его M-VH имеет: M-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, M-HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и M-HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и его M-VL имеет: M-LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, M-LCDR2, содержащую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, и M-LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; и

в антигенсвязывающем фрагменте 2 его E-VH имеет: E-HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, E-HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и E-HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и его E-VL имеет: E-LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, E-LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, и E-LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11.

3. Антигенсвязывающая молекула по п. 1 или 2, где:

(i) M-VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 16, и M-VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 17; или

M-VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 12, и M-VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 13; или

M-VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 14, и M-VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 15; и/или

(ii) E-VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 3, и E-VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 4;

предпочтительно,

(i) антигенсвязывающая молекула содержит два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающихся с HGFR;

M-VH одного из антигенсвязывающих фрагментов 1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, и M-VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17;

M-VH другого антигенсвязывающего фрагмента 1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и M-VL содержит аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; и

E-VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и E-VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5; или

(ii) E-VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и E-VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5; и

M-VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и M-VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

4. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-3, содержащая:

два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающихся с HGFR, антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR, и

Fc-область, содержащую первую субъединицу Fc1 и вторую субъединицу Fc2, способные связываться друг с другом;

предпочтительно, антигенсвязывающий фрагмент 2 представляет собой Fv, специфически связывающийся с EGFR;

один из двух антигенсвязывающих фрагментов 1 представляет собой первый Fab, специфически связывающийся с HGFR, а другой представляет собой замещенный Fab, специфически связывающийся с HGFR;

замещенный Fab содержит M-VH, M-VL, цепь титина и цепь обскурина, причем цепь титина и цепь обскурина способны образовывать димер, где С-конец M-VH замещенного Fab слит с N-концом цепи титина напрямую или через линкер и С-конец M-VL замещенного Fab слит с N-концом цепи обскурина напрямую или через линкер, или С-конец M-VH замещенного Fab слит с N-концом цепи обскурина напрямую или через линкер и С-конец M-VL замещенного Fab слит с N-концом цепи титина напрямую или через линкер;

более предпочтительно, С-конец E-VH Fv, специфически связывающегося с EGFR, слит с N-концом тяжелой цепи первого Fab напрямую или через линкер, и С-конец E-VL Fv, специфически связывающегося с EGFR, слит с N-концом легкой цепи первого Fab напрямую или через линкер,

С-конец тяжелой цепи первого Fab слит с N-концом Fc1 напрямую или через линкер, и С-конец цепи титина или С-конец цепи обскурина слит с N-концом Fc2 напрямую или через линкер.

5. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-3, содержащая:

антигенсвязывающий фрагмент 1, специфически связывающийся с HGFR,



антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR, и Fc-область, содержащую первую субъединицу Fc1 и вторую субъединицу Fc2, способные связываться друг с другом;

предпочтительно,

антигенсвязывающий фрагмент 1 представляет собой Fab; антигенсвязывающий фрагмент 2 представляет собой замещенный Fab, содержащий E-VH, E-VL, цепь титина и цепь обскурина, причем цепь титина и цепь обскурина способны образовывать димер; C-конец E-VH слит с N-концом цепи титина напрямую или через линкер и C-конец E-VL слит с N-концом цепи обскурина напрямую или через линкер, или C-конец E-VH слит с N-концом цепи обскурина напрямую или через линкер и C-конец E-VL слит с N-концом цепи титина напрямую или через линкер;

более предпочтительно,

C-конец тяжелой цепи Fab, специфически связывающегося с HGFR, слит с N-концом Fc1 напрямую или через линкер; C-конец цепи титина или C-конец цепи обскурина слит с N-концом Fc2 напрямую или через линкер.

6. Антигенсвязывающая молекула по п. 4 или 5, где

цепь титина содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, или ее вариант, где вариант SEQ ID NO: 45 имеет одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 3W, 8C, 11I, 13L, 20C, 22M/22C, 25S, 26C, 39T, 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 60S, 64T, 66S/66K, 70R, 75V, 77S, 79T, 81R, 82M, 83D и 84L, по сравнению с SEQ ID NO: 45; и

цепь обскурина содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, или ее вариант, или аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, или ее вариант,

где вариант SEQ ID NO: 64 имеет одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 2E, 3C, 7K/7R, 9C, 11L, 12S, 13Y/13S, 14T, 17E, 20L, 22M/22S, 25S, 30D, 32P/32F, 34E, 36T, 41K, 42L, 44I, 45T, 48V, 53L, 58V, 62E/62K/62H, 66C, 67Q/67T, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L, 92E, 93C, 94G и 97G, по сравнению с SEQ ID NO: 64;

вариант SEQ ID NO: 65 имеет одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 6E, 26S, 74C, 77S, 84C и 86C, по сравнению с SEQ ID NO: 65;

предпочтительно,

цепь титина содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45 - SEQ ID NO: 63, и

цепь обскурина содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 64 - SEQ ID NO: 104;

более предпочтительно,

цепь титина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 и цепь обскурина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99.

7. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-6, содержащая Fc-область, содержащую первую субъединицу Fc1 и вторую субъединицу Fc2, способные связываться друг с другом, и каждый из Fc1 и Fc2 независимо имеет одну или более аминокислотных замен, которые снижают гомодимеризацию Fc-области;

предпочтительно,

(i) Fc1 имеет структуру выступа в соответствии с механизмом "выступ-во-впадину", и Fc2 имеет структуру впадины в соответствии с механизмом "выступ-во-впадину", или Fc2 имеет структуру выступа в соответствии с механизмом "выступ-во-впадину", и Fc1 имеет структуру впадины в соответствии с механизмом "выступ-во-впадину"; предпочтительно Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой W, и Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой S, аминокислотный остаток в положении 368, представляющий собой A, и аминокислотный остаток в положении 407, представляющий собой V; положения аминокислотных остатков пронумерованы в соответствии с EU-индексом; и/или

(ii) между первой субъединицей Fc1 и второй субъединицей Fc2 присутствует сконструированная дисульфидная связь; предпочтительно, Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 354, представляющем собой C, и Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 349, представляющем собой C; положения аминокислотных остатков пронумерованы в соответствии с EU-индексом;

более предпочтительно,

Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 354, представляющий собой C, аминокислотный остаток в положении 356, представляющий собой E, аминокислотный остаток в положении 358, представляющий собой M, и аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой W, и Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 349, представляющий собой C, аминокислотный остаток в положении 356, представляющий собой E, аминокислотный остаток в положении 358, представляющий собой M, аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой S, аминокислотный остаток в положении 368, представляющий собой A, и аминокислотный остаток в положении 407, представляющий собой V; положения аминокислотных остатков

пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

8. Антигенсвязывающая молекула по п. 7, содержащая:

первую цепь, имеющую структуру формулы (a),  
вторую цепь, имеющую структуру формулы (b),  
третью цепь, имеющую структуру формулы (c), и  
четвертую цепь, имеющую структуру формулы (d),  
где:

формула (a) представляет собой [E-VH]-[линкер 1]-[M-VH]-[CH1]-[Fc1],

формула (b) представляет собой [E-VL]-[линкер 2]-[M-VL]-[CL],

формула (c) представляет собой [M-VH]-[линкер 3]-[цепь титина]-[Fc2] и

формула (d) представляет собой [M-VL]-[линкер 4]-[цепь обскурина];

предпочтительно, линкеры в формуле (a), формуле (b), формуле (c) и формуле (d) представляют собой идентичные или различные пептидные линкеры;

более предпочтительно, линкеры в формуле (a), формуле (b), формуле (c) и формуле (d) содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105 или SEQ ID NO: 106;

в частности, антигенсвязывающая молекула имеет: первую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34, вторую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, третью цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, и четвертую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37.

9. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-3 и 5-7, содержащая:

первую цепь, имеющую структуру формулы (e),  
вторую цепь, имеющую структуру формулы (f),  
третью цепь, имеющую структуру формулы (g), и  
четвертую цепь, имеющую структуру формулы (h),  
где:

формула (e) представляет собой [M-VH]-[CH1]-[Fc1],

формула (f) представляет собой [M-VL]-[CL],

формула (g) представляет собой [E-VH]-[линкер 1]-[цепь титина]-[Fc2] и

формула (h) представляет собой [E-VL]-[линкер 2]-[цепь обскурина];

предпочтительно, линкеры в формуле (g) и формуле (h) представляют собой идентичные или различные пептидные линкеры;

более предпочтительно, линкеры в формуле (h) и формуле (g) содержат

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 106;

в частности,

антигенсвязывающая молекула имеет: первую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, вторую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, третью цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40, и четвертую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41.

10. Антигенсвязывающая молекула, содержащая:

Fv,

первый Fab,

замещенный Fab, и

Fc-область,

где

Fc-область содержит первую субъединицу Fc1 и вторую субъединицу Fc2, способные связываться друг с другом,

Fv содержит переменную область тяжелой цепи Fv-VH и переменную область легкой цепи Fv-VL,

первый Fab содержит переменную область тяжелой цепи Fab1-VH и переменную область легкой цепи Fab1-VL и

замещенный Fab содержит переменную область тяжелой цепи Fab-S-VH, переменную область легкой цепи Fab-S-VL, цепь титина и цепь обскурина, причем цепь титина и цепь обскурина способны образовывать димер, где:

C-конец Fab-S-VH слит с N-концом цепи титина напрямую или через линкер и C-конец Fab-S-VL слит с N-концом цепи обскурина напрямую или через линкер, или C-конец Fab-S-VH слит с N-концом цепи обскурина напрямую или через линкер и C-конец Fab-S-VL слит с N-концом цепи титина напрямую или через линкер, и

C-конец тяжелой цепи первого Fab слит с N-концом Fc1 напрямую или через линкер; C-конец Fv-VH Fv слит с N-концом тяжелой цепи первого Fab напрямую или через линкер, C-конец цепи титина или C-конец цепи обскурина слит с N-концом Fc2 напрямую или через линкер и Fab-S-VH находится на той же цепи, что и Fc2;

предпочтительно, каждый из первого Fab и замещенного Fab независимо связываются с первым антигеном, и Fv связывается со вторым антигеном; более предпочтительно, первый антиген представляет собой HGFR и второй антиген представляет собой EGFR.

11. Антигенсвязывающая молекула по п. 10, где:

цепь титина содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, или ее вариант, где вариант SEQ ID NO: 45 имеет одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 3W, 8C, 11I, 13L, 20C, 22M/22C, 25S, 26C, 39T, 40S, 42K, 45S, 47E, 49G, 56S, 58E, 60S, 64T, 66S/66K, 70R, 75V, 77S, 79T, 81R, 82M, 83D и 84L, по сравнению с SEQ ID NO: 45; и

цепь обскурина содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, или ее вариант, или аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, или ее вариант, где вариант SEQ ID NO: 64 имеет одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 2E, 3C, 7K/7R, 9C, 11L, 12S, 13Y/13S, 14T, 17E, 20L, 22M/22S, 25S, 30D, 32P/32F, 34E, 36T, 41K, 42L, 44I, 45T, 48V, 53L, 58V, 62E/62K/62H, 66C, 67Q/67T, 69S, 76S, 82H, 88C, 89L, 92E, 93C, 94G и 97G по сравнению с SEQ ID NO: 64; вариант SEQ ID NO: 65 имеет одну или более замен аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из 6E, 26S, 74C, 77S, 84C и 86C по сравнению с SEQ ID NO: 65;

предпочтительно,

цепь титина содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 45 - SEQ ID NO: 63, и цепь обскурина содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 64 - SEQ ID NO: 104;

более предпочтительно,

цепь титина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 и цепь обскурина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99.

12. Антигенсвязывающая молекула по п. 10 или п. 11, где каждый из Fc1 и Fc2 независимо имеет одну или более аминокислотных замен, которые снижают гомодимеризацию Fc-области;

предпочтительно,

(i) Fc1 имеет структуру выступа в соответствии с механизмом "выступ-во-впадину", и Fc2 имеет структуру впадины в соответствии с механизмом "выступ-во-впадину", или Fc2 имеет структуру выступа в соответствии с механизмом "выступ-во-впадину", и Fc1 имеет структуру впадины в соответствии с механизмом "выступ-во-впадину"; предпочтительно Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой W, и Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой S, аминокислотный остаток в положении 368, представляющий собой A, и аминокислотный

остаток в положении 407, представляющий собой V; положения аминокислотных остатков пронумерованы в соответствии с EU-индексом; и/или

(ii) между первой субъединицей Fc1 и второй субъединицей Fc2 присутствует сконструированная дисульфидная связь; предпочтительно, Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 354, представляющем собой C, и Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 349, представляющем собой C; положения аминокислотных остатков пронумерованы в соответствии с EU-индексом;

более предпочтительно,

Fc1 имеет аминокислотный остаток в положении 354, представляющий собой C, аминокислотный остаток в положении 356, представляющий собой E, аминокислотный остаток в положении 358, представляющий собой M, и аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой W, и Fc2 имеет аминокислотный остаток в положении 349, представляющий собой C, аминокислотный остаток в положении 356, представляющий собой E, аминокислотный остаток в положении 358, представляющий собой M, аминокислотный остаток в положении 366, представляющий собой S, аминокислотный остаток в положении 368, представляющий собой A, и аминокислотный остаток в положении 407, представляющий собой V; положения аминокислотных остатков пронумерованы в соответствии с EU-индексом.

13. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 10-12, содержащая:

первую цепь, имеющую структуру формулы (k),

вторую цепь, имеющую структуру формулы (l),

третью цепь, имеющую структуру формулы (m), и

четвертую цепь, имеющую структуру формулы (n),

где:

формула (k) представляет собой [Fv-VH]-[линкер 1]-[Fab1-VH]-[CH1]-[Fc1],

формула (l) представляет собой [Fv-VL]-[линкер 2]-[Fab1-VL]-[CL],

формула (m) представляет собой [Fab-S-VH]-[линкер 3]-[титиновую цепь]-[Fc2], и

формула (n) представляет собой [Fab-S-VL]-[линкер 4]-[обскуриновую цепь];

предпочтительно, линкеры в формуле (k), формуле (l), формуле (m) и формуле (n) представляют собой идентичные или различные пептидные линкеры;

более предпочтительно, линкеры в формуле (k), формуле (l), формуле (m) и формуле (n) содержат аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 105 или SEQ ID NO: 106.

14. Антигенсвязывающая молекула, содержащая:

антигенсвязывающий фрагмент 2, специфически связывающийся с EGFR, и

два антигенсвязывающих фрагмента 1, специфически связывающихся с HGFR, причем антигенсвязывающие фрагменты 1 связываются с различными эпитопами HGFR;

где предпочтительно, один из антигенсвязывающих фрагментов 1 конкурирует с антителом к HGFR, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 16, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 17, за связывание с HGFR человека; другой антигенсвязывающий фрагмент 1 конкурирует с антителом к HGFR, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 13, за связывание с HGFR человека.

15. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 1-14, представляющая собой низкофукозилированную антигенсвязывающую молекулу;

предпочтительно, по меньшей мере 80% антигенсвязывающей молекулы не модифицировано фукозилированием;

более предпочтительно, модификации фукозилированием в антигенсвязывающей молекуле не обнаруживается.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая:

терапевтически эффективное количество антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1-15, и

один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей, буферов или эксципиентов;

где предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере один второй терапевтический агент.

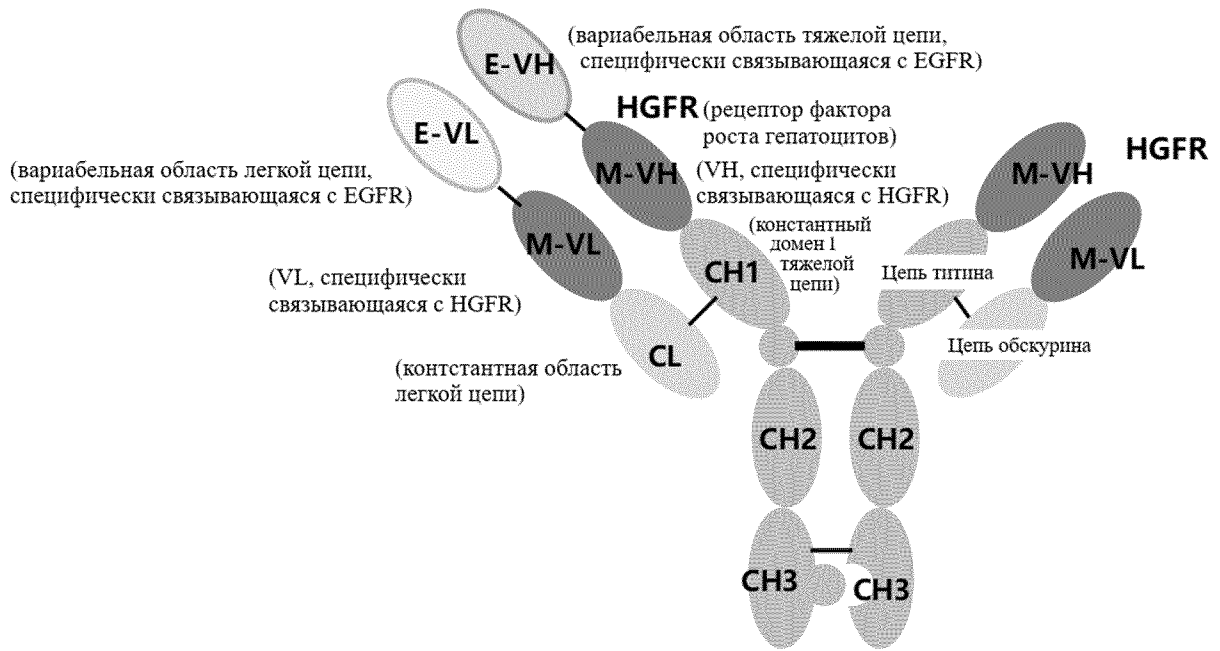
17. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 1-15.

18. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п. 17.

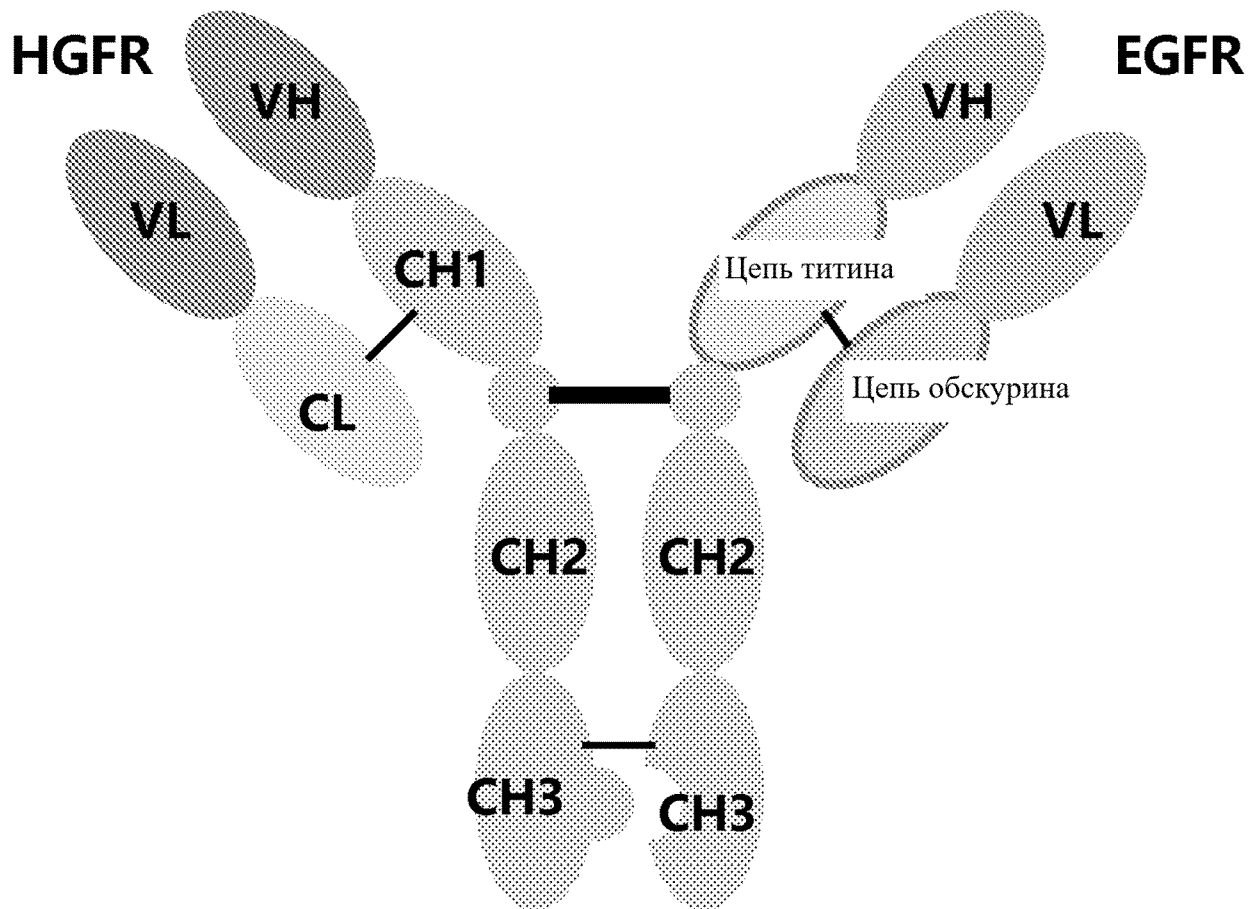
19. Способ лечения заболевания, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества антигенсвязывающей молекулы по любому из пп. 1-15 или фармацевтической композиции по п. 16;

предпочтительно, заболевание представляет собой опухоль; более предпочтительно, опухоль выбрана из группы, состоящей из рака легкого, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, колоректального рака, саркомы, почечно-клеточной карциномы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака желудка, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи и глиобластомы.

АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩАЯ  
МОЛЕКУЛА, СПЕЦИФИЧНО СВЯЗЫВАЮЩАЯСЯ С  
HGFR И EGFR, И ЕЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ  
EGFR (рецептор эпидермального фактора роста)

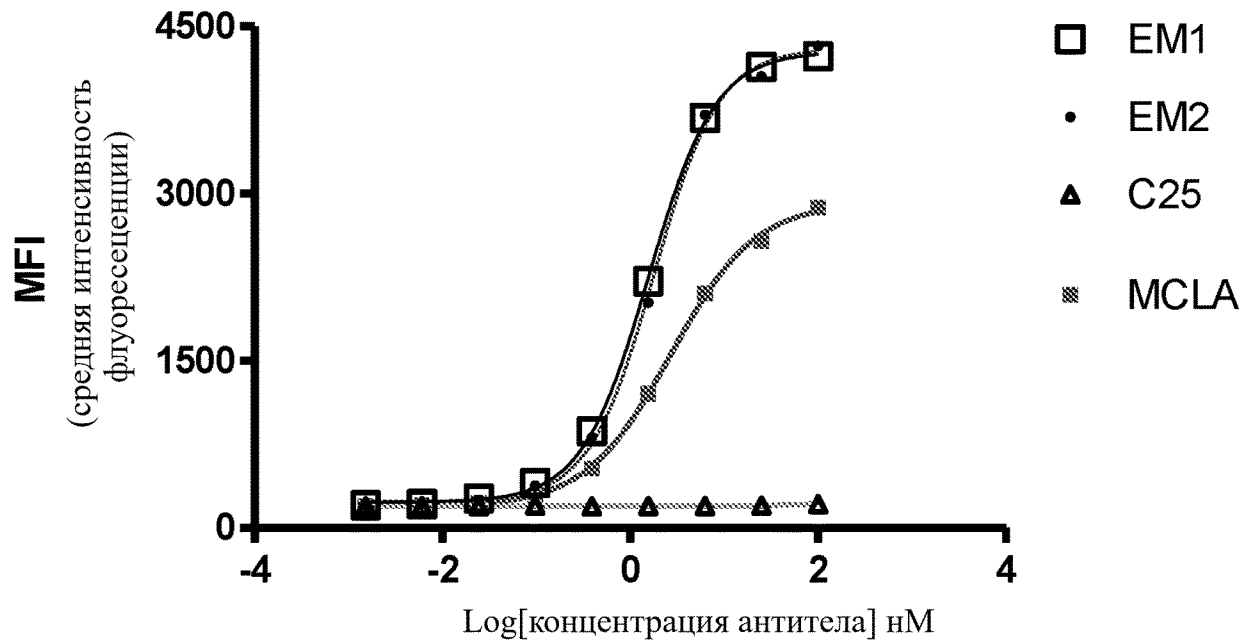


Фиг. 1

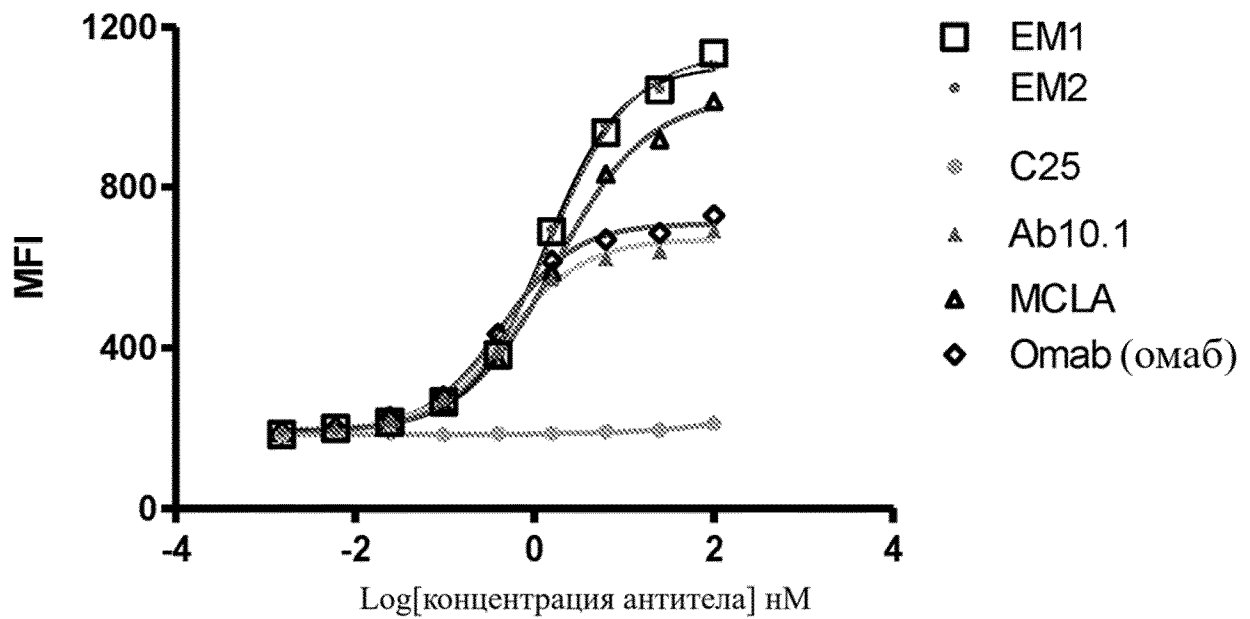


Фиг. 2

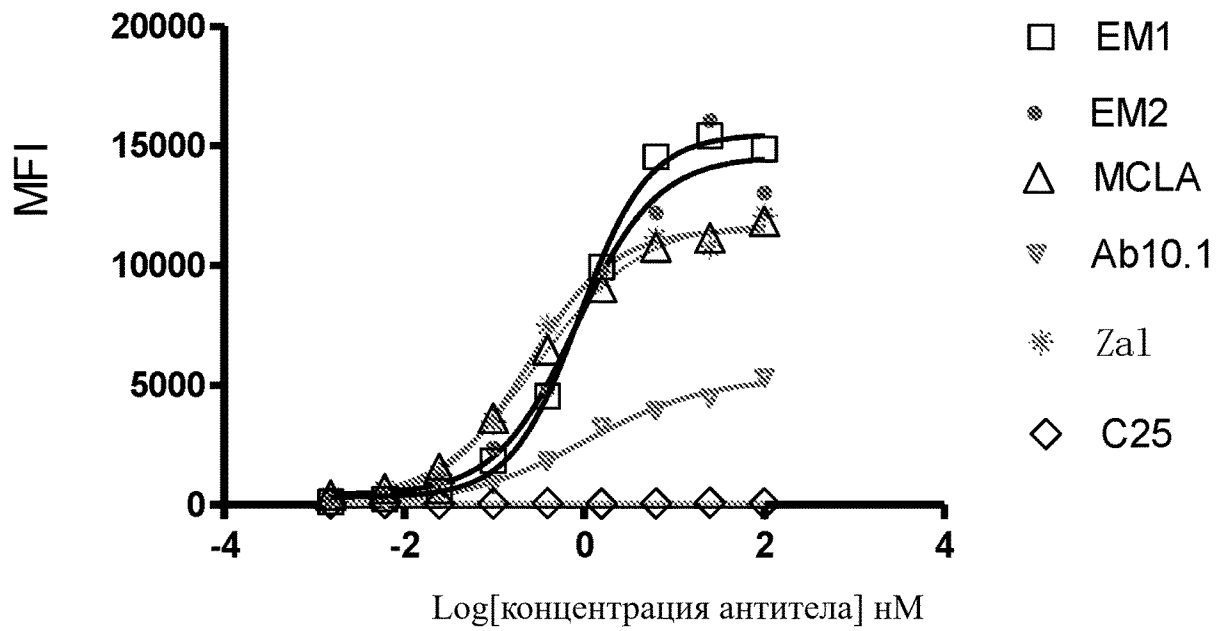




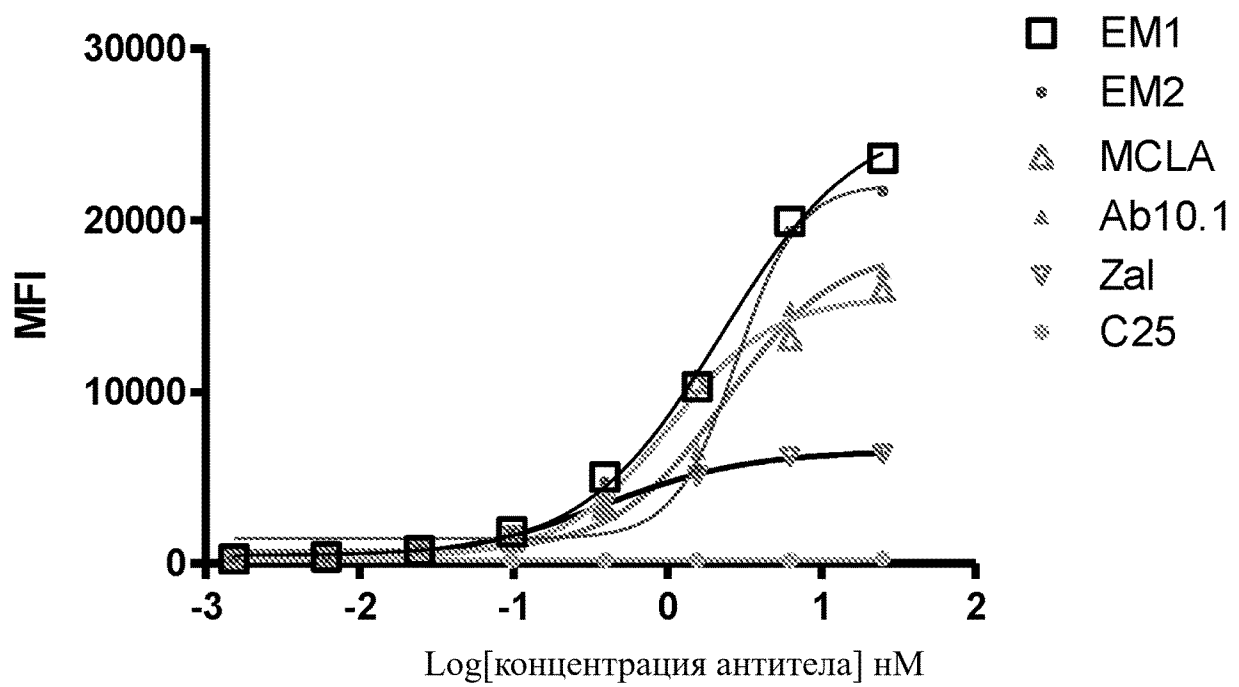
Фиг. 3



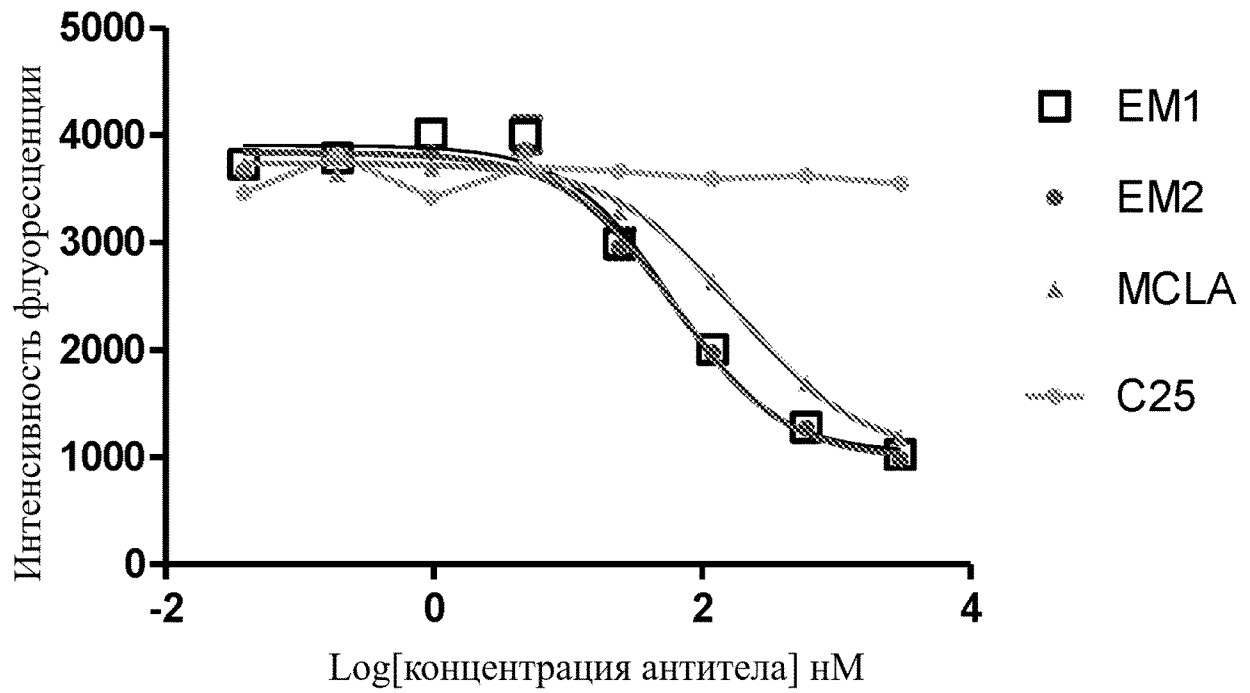
Фиг. 4



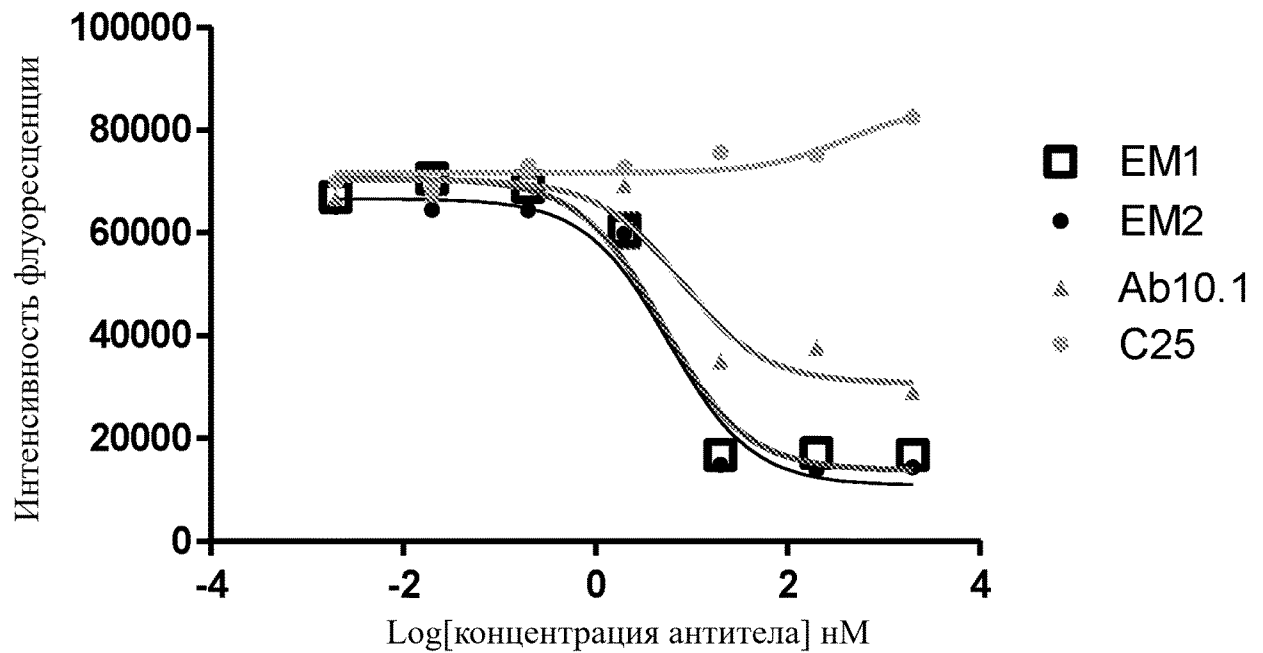
Фиг. 5



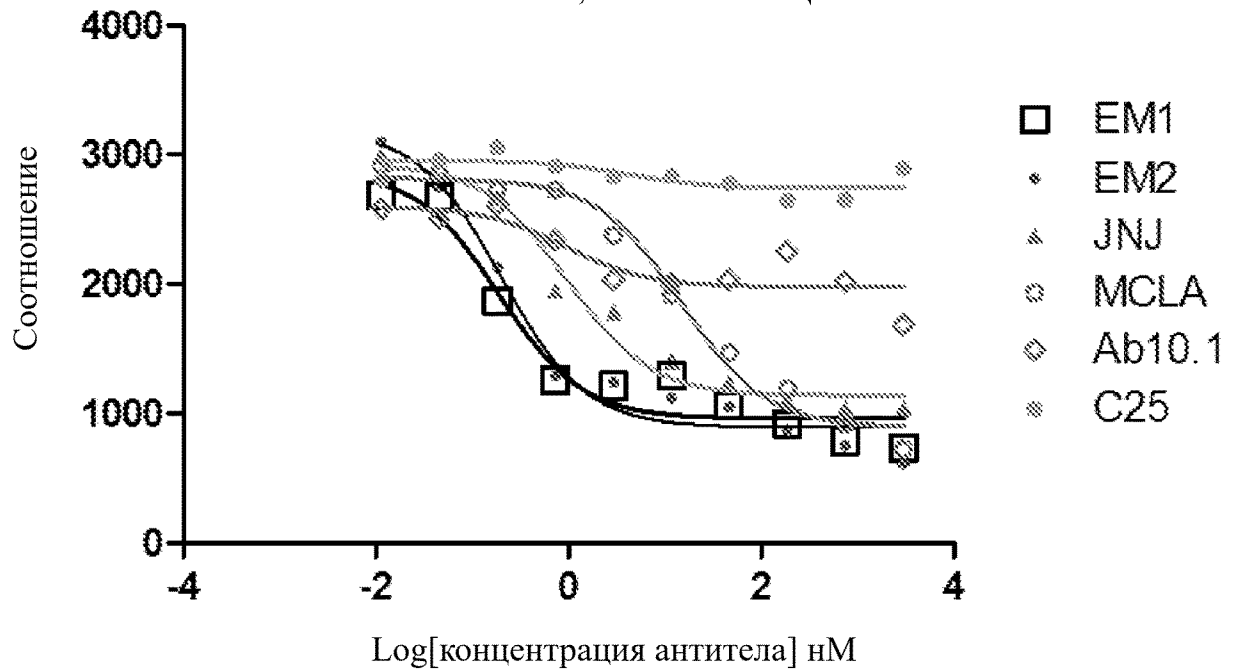
Фиг. 6



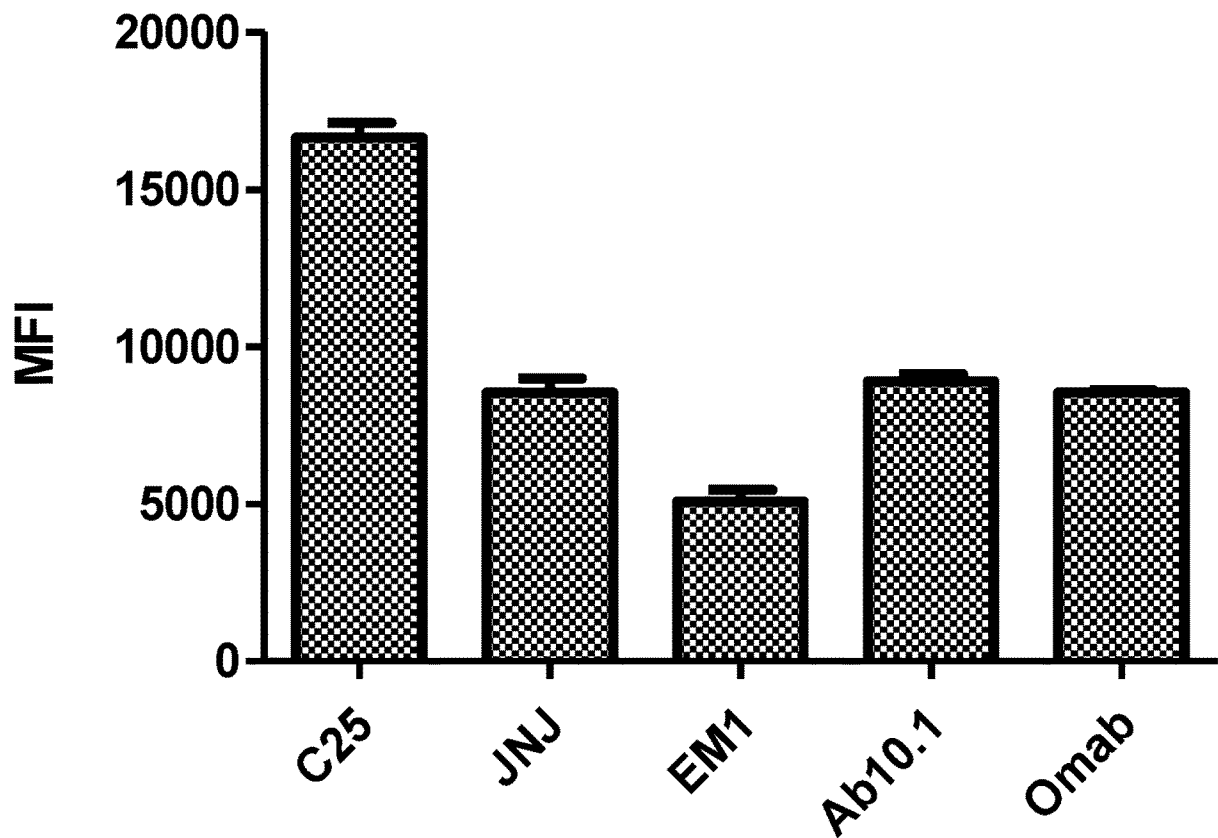
Фиг. 7



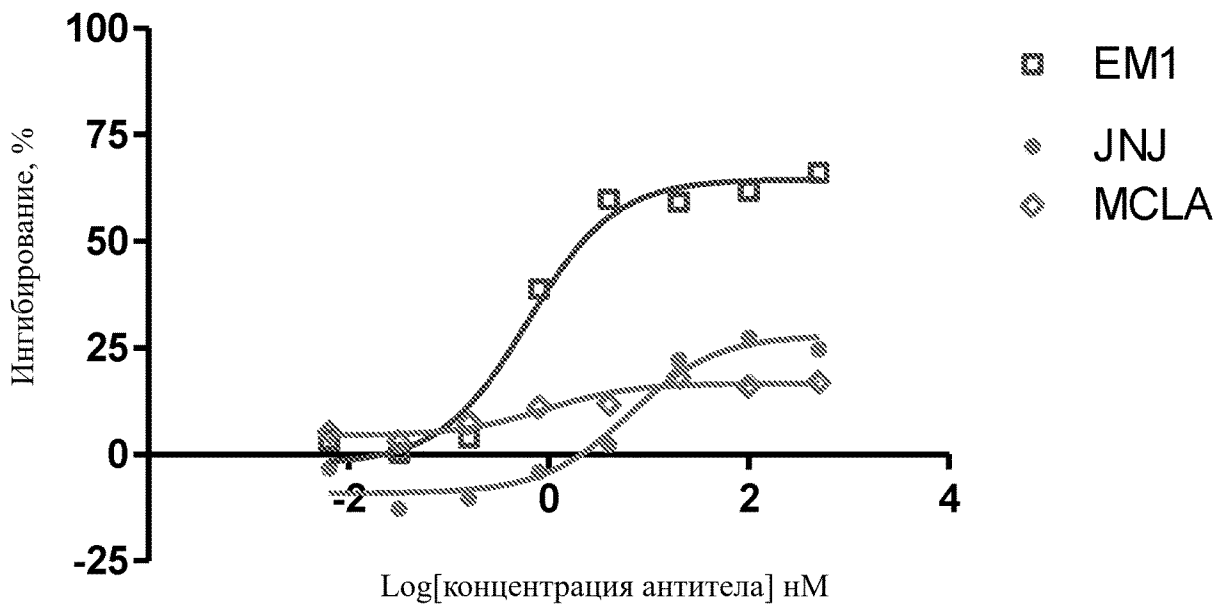
Фиг. 8



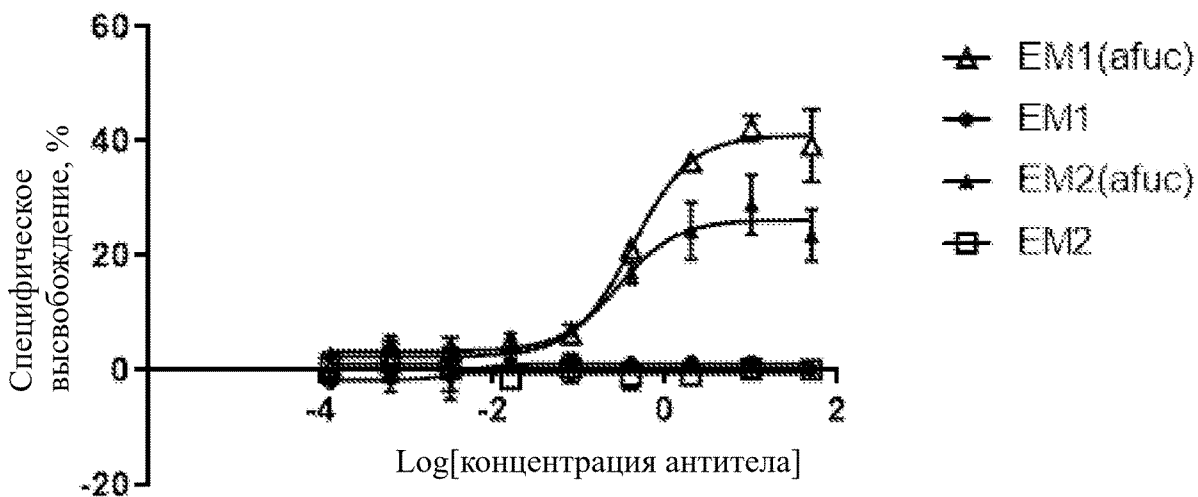
Фиг. 9



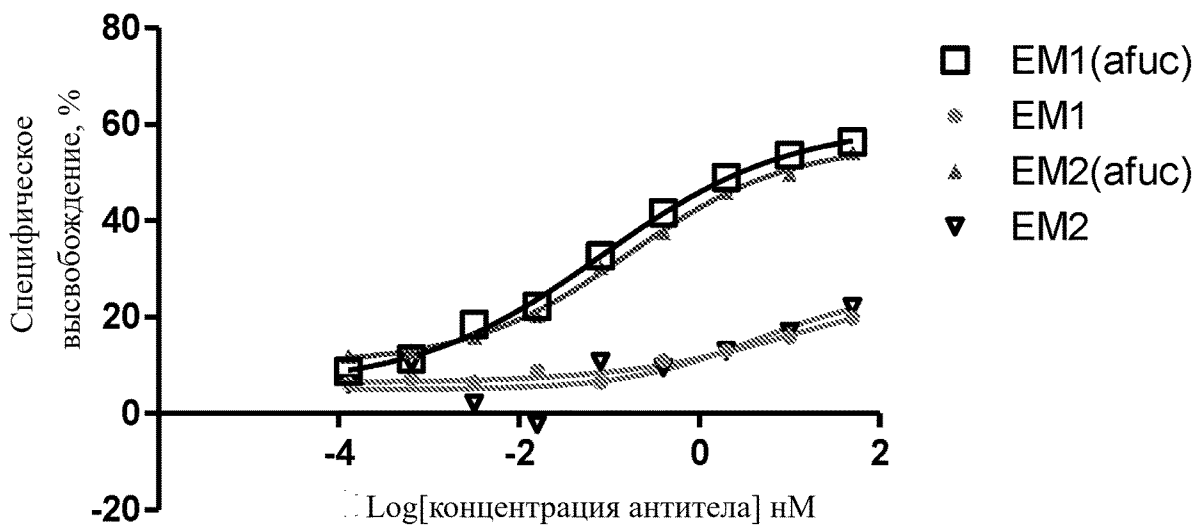
Фиг. 10



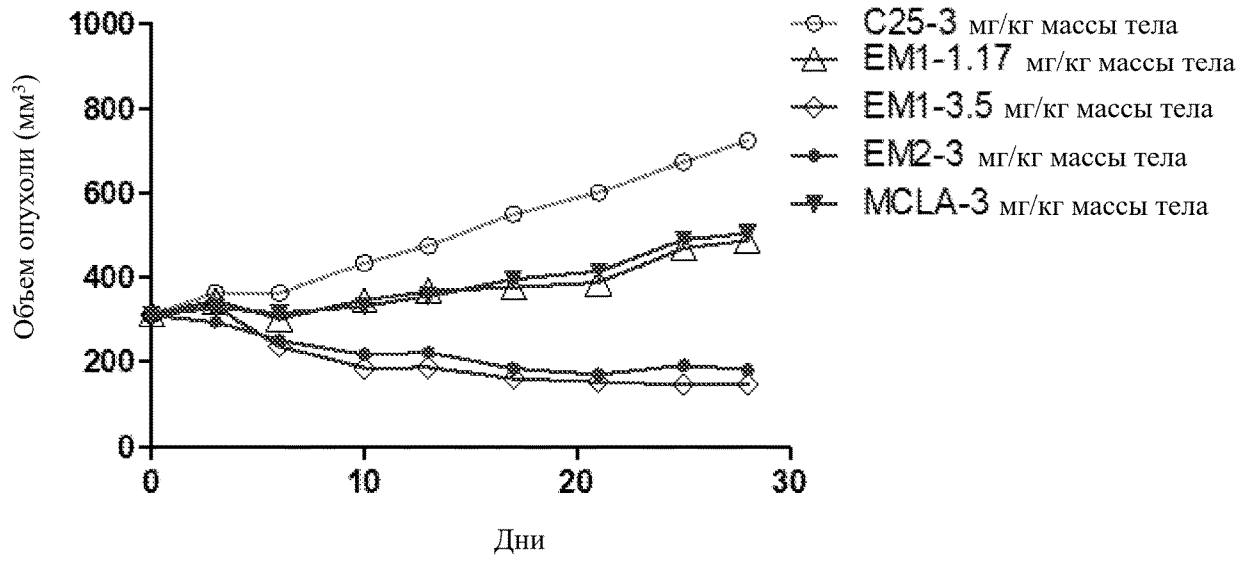
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14