

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490827

(13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.04

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.09.28

(54) ИНДУЦИРУЮЩИЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ АГЕНТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ РАКА

(31) РСТ/JP2021/035917

(32) 2021.09.29

(33) JP

(86) РСТ/JP2022/036060

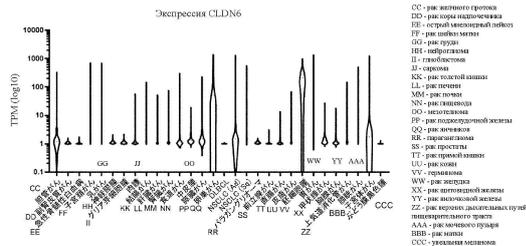
(87) WO 2023/054421 2023.04.06

(71) Заявитель:
ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ
КАЙСЯ (JP)

(72) Изобретатель:
Исии Синя, Камикава Такаюки,
Кимура Наоки, Кодама Тацуси (JP)

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

(57) Настоящее изобретение относится к противоопухолевым агентам, содержащим мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая способна эффективно и специфично привлекать Т-клетки к раковым клеткам-мишеням, особенно к раковым клеткам, экспрессирующим CLDN6, и к подобным клеткам, и способна лечить рак посредством цитотоксической активности Т-клеток против целевых раковых тканей, содержащих клетки, экспрессирующие CLDN6, к комбинированной терапии с использованием противоопухолевого агента и по меньшей мере еще одного другого противоопухолевого агента, и к фармацевтическим композициям для применения в комбинированной терапии.



A1

202490827

202490827

A1

ИНДУЦИРУЮЩИЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ АГЕНТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ РАКА

5

Область техники

Настоящее описание относится к противоопухолевым агентам, включающим мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, направленную на клаудин 6, и к комбинированной терапии с использованием по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента.

10

Предпосылки создания настоящего изобретения

Семейство клаудинов представляет собой семейство клеточных мембранных белков с молекулярной массой приблизительно 23 кДа, содержащих четыре трансмембранных домена и образующих жесткие соединения. Семейство клаудинов у человека и животных включает 24 члена, при этом известно, что каждый член семейства клаудинов характеризуется чрезвычайно уникальной характеристикой экспрессии в зависимости от каждого типа эпителиальных клеток (NPL 1–NLP 4). В слое эпителиальных клеток используется механизм, предотвращающий утечку (диффузию) веществ в межклеточные пространства, и как было установлено, системы межклеточной адгезии, называемые жесткими соединениями, действительно играют центральную роль в качестве «барьера» в механизме предотвращения утечки.

15

20

25

Молекула жесткого соединения клаудина 6 (CLDN6), член семейства белков клаудина, характеризуется транскрипционно молчащей экспрессией в нормальных тканях взрослых (NPL 5 и NPL 6), и в то же время характеризуется регуляцией с повышением активности при некоторых видах рака, таких как рак яичников, NSCLC, и рак желудка (NPL 7-NPL 9).

30

Что касается антител анти-CLDN6, сообщалось, что моноспецифичные антитела против CLDN6 обладают ADCC-активностью или активностью интернализации в отношении CLDN6-положительных опухолевых линий (PTL1-PTL5). На данный момент известно, что были созданы биспецифичные антитела, направленные на CLDN6, перенаправляющие Т-клетки, называемые bPHU3, с использованием биспецифичного формата sc(Fv)₂ со специфичностью CD3/анти-CLDN6 (PTL6 - PTL7). Сообщалось, что по данным доклинических

исследований бРНУ3 характеризовался эффективным уничтожением опухолевых клеток in vitro и in vivo (NPL10).

Список цитированной литературы

- [PTL 1] WO2009/087978
 5 [PTL 2] WO2011/057788
 [PTL 3] WO2012/003956
 [PTL 4] WO2012/156018
 [PTL 5] WO2015/069794
 [PTL 6] WO2014/075697
 10 [PTL 7] WO2014/075788

Список непатентной литературы

- [NPL 1] Furuse and Tsukita, TRENDS in Cell Biology, 16: 181 (2006)
 [NPL 2] Wilcox, и др., Cell, 104: 165 (2001)
 [NPL 3] Rahner, и др., GASTROENTEROLOGY, 120: 411 (2001)
 15 [NPL 4] Morita, и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 511 (1999)
 [NPL 5] Dev Dyn.;231(2):425-31 (2004 Oct)
 [NPL 6] Am J Physiol Renal Physiol.;291(6):F1132-41 (2006 Dec)
 [NPL 7] Int J Cancer. 1;135(9):2206-14 (2014 Nov)
 [NPL 8] Histopathology.;61(6):1043-56 (2012 Dec)
 20 [NPL 9] J Gastrointest Cancer.;41(1):52-9 (2010 Mar)
 [NPL 10] Oncoimmunology. 29;5(3):e1091555 (2015 Oct).

Краткое описание настоящего изобретения

Область техники

Цель настоящего изобретения заключалась в создании проитвоопухолевых
 25 агентов, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную
 антигенсвязывающую молекулу, которая может эффективно и специфично
 перенаправлять Т-клетки к опухолевым клеткам-мишеням, прежде всего к
 экспрессирующим CLDN6 опухолевым клеткам с использованием
 цитотоксичной активности Т-клеток в отношении опухолевых тканей,
 30 содержащих CLDN6 экспрессирующие клетки. Кроме того, дополнительная цель
 заключалась в разработке комбинированной терапии с использованием
 мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и другого
 фармацевтического агента.

Достижение целей настоящего изобретения

В настоящем изобретении предлагаются мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые включают первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 (4-1BB), и связываются либо с CD3 либо с CD137 (то есть обладают двойной аффинностью к CD3 и CD137, но не связывается с обоими белками одновременно), и второй антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с молекулой, которая экспрессируется специфично в опухолевых тканях, прежде всего с клаудином 6 (CLDN6). Авторами настоящего изобретения было неожиданно установлено, что мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению уничтожают опухолевые клетки, включающие CLDN6-экспрессирующие опухолевые клетки. В настоящем изобретении предлагаются противоопухолевые агенты, включающие мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу в качестве активного ингредиента, комбинированные способы лечения, в которых используют мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, с использованием, по меньшей мере, одного другого противоопухолевого агента, и фармацевтические композиции, включающие комбинацию мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и противоопухолевого агента.

20 Более подробно, в настоящем изобретении предлагаются следующие агенты:

(A-1) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, причем мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, включающая 25 (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который способен связываться либо с CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(A-2) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу по любому из 30 указанных ниже пунктов (1)–(6),

(1) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, включающая первую переменную область антитела, включающую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 11,

CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 17, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 23, а также вторую вариабельную область антитела, включающую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40; третью вариабельную область антитела, включающую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19; а также четвертую вариабельную область антитела, включающую CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, и CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37,

(2) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, включающая первую вариабельную область антитела, включающую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 9, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 15, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 21, вторую вариабельную область антитела, включающую CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 35, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 39; третью вариабельную область антитела, включающую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 14, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 20; а также четвертую вариабельную область антитела, включающую CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 30, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 38;

(3) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, включающая первую вариабельную область антитела, включающую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 10, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 16, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 22; вторую вариабельную область антитела, включающую CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 35, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 39; третью вариабельную область антитела, включающую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 14, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 20; и четвертую вариабельную область антитела, включающую CDR 1 с последовательностью

SEQ ID NO: 30, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 38;

(4) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, включающая первую переменную область антитела, включающую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 12, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 18, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 24; вторую переменную область антитела, включающую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40; третью переменную область антитела, включающую (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19; а также четвертую переменную область антитела, включающую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37;

(5) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, включающая первую переменную область, включающую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 11, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 17, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 23; вторую переменную область антитела, включающую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40; третью переменную область антитела, включающую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37; и четвертую переменную область антитела, включающую CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19; и

(6) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, включающая первую переменную область антитела, включающую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 12, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 18, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 24; вторую переменную область антитела, включающую CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO:

36, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40; третью переменную область антитела, включающую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37; и четвертую переменную область антитела, включающую CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19;

(A-3) противоопухолевый агент (A-2), где по меньшей мере один выбранный из группы, состоящей из следующих областей: первая переменная область антитела, вторая переменная область антитела, третья переменная область антитела и четвертая переменная область антитела, включает каркас антитела человека или каркас гуманизированного антитела,

(A-4) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу по любому из указанных ниже пунктов (I)–(VI):

(I) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая включает первую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, вторую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, третью переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и четвертую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25,

(II) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая включает первую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, вторую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, третью переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и четвертую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26,

(III) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая включает первую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, вторую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, третью переменную область антитела, включающую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 2, и четвертую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26,

(IV) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая включает первую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, вторую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, третью переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и четвертую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25,

(V) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая включает первую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, вторую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, третью переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и четвертую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

и

(VI) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая включает первую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, вторую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, третью переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и четвертую переменную область антитела, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

(A-5) противоопухолевый агент по любому из пунктов (A-2)-(A-4), где первая переменная область антитела и вторая переменная область антитела состоят из первого антигенсвязывающего фрагмента, который способен связываться с CD3 и CD137, и который способен связываться либо с CD3, либо с CD137, и третья переменная область антитела и четвертая переменная область антитела состоят из второго антигенсвязывающего фрагмента, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(A-6) противоопухолевый агент по любому из пунктов (A-2)-(A-4), где первая переменная область антитела и вторая переменная область антитела состоят из первого антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с

CD3, и третья переменная область антитела и четвертая переменная область антитела состоят из второго антигенсвязывающего фрагмента, который способен связываться с CLDN6,

5 (A-7) противоопухолевый агент по любому из пунктов (A-2)-(A-4), где первая переменная область антитела и вторая переменная область антитела состоят из первого антигенсвязывающего фрагмента, который связывается с CD137, и третья переменная область антитела и четвертая переменная область антитела состоят из второго антигенсвязывающего фрагмента, который способен связываться с CLDN6,

10 (A-8) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD3, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с клаудином 6 (CLDN6), где первый антигенсвязывающий фрагмент включает
15 любой агент по любому из указанных ниже пунктов (a1)-(a4),

(a1) первая переменная область антитела, включающая определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 9, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 15, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 21, и вторая переменная область антитела, включающая
20 определяющую комплементарную область CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 35, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 39;

(a2) первая переменная область антитела, включающая определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 10, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 16, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 22, и вторая переменная область антитела, включающая
25 определяющую комплементарную область CDR 1 с последовательностью CDR1 CDR1 of SEQ ID NO: 31, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 35, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 39;

30 (a3) первая переменная область антитела, включающая определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 11, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 17, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 23, и вторая переменная область антитела, включающая CDR 1 с

последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40; и

(a4) первая переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 12, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 18, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 24, и вторая переменная область антитела, включающая CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40;

(A-9) противоопухолевый агент по пункту (A-8), где второй антигенсвязывающий фрагмент включает агент по любому из указанных ниже пунктов (b1)-(b3):

(b1) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 14, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 20, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 30, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 38;

(b2) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37; и

(b3) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37, и четвертая переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19;

(A-10) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD3, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с

клаудином 6 (CLDN6), где второй антигенсвязывающий фрагмент включает любой агент по любому из указанных ниже пунктов (b1)–(b3),

(b1) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 14, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 20, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 30, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34, CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 38;

(b2) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37; и

(b3) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19,

(A-11) противоопухолевый агент по любому из пунктов (A-8)-(A-10), который по меньшей мере один выбранный из группы, состоящей из следующих областей: первая переменная область антитела, вторая переменная область антитела, третья переменная область антитела и четвертая переменная область антитела, включает каркас антитела человека или каркас гуманизированного антитела,

(A-12) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD3, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с клаудином 6 (CLDN6), где первый антигенсвязывающий фрагмент включает любой фрагмент по любому из указанных ниже пунктов (c1)–(c4),

(c1) первая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вторая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27,

5 (c2) первая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и вторая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27,

(c3) первая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и вторая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28,

10 (c4) первая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и вторая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28,

(A-13) противоопухолевый агент (A-12), где второй антигенсвязывающий фрагмент включает агент по любому из указанных ниже пунктов (d1)–(d3):

15 (d1) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26,

(d2) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25,

(d3) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

25 (A-14) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD3, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с клаудином 6 (CLDN6), где второй антигенсвязывающий фрагмент включает любой фрагмент по любому из указанных ниже пунктов (d1)–(d3):

30 (d1) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26,

(d2) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25,

5 (d3) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

(A-15) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD3, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с клаудином 6 (CLDN6), где первый антигенсвязывающий фрагмент включает фрагмент по любому из указанных ниже пунктов (a1)–(a4):

(a1) первая переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 9, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 15, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 21, и вторая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 35, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 39;

20 (a2) первая переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 10, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 16, и CDR3 of SEQ ID NO: 22, и вторая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 35, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 39;

25 (a3) первая переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 11, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 17, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 23, и вторая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40; и

30 (a4) первая переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 12, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 18, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 24, и вторая переменная область антитела, включающая CDR 1 с

последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40;

(A-16) противоопухолевый агент A-15, где второй антигенсвязывающий фрагмент включает любой фрагмент по любому из указанных ниже пунктов

5 (b1)–(b3):

(b1) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 14, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 20, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1
10 с последовательностью SEQ ID NO: 30, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 38; и

(b2) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью
15 SEQ ID NO: 19, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37; и

(b3) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью
20 SEQ ID NO: 37, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19;

(A-17) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного
25 ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с клаудином 6 (CLDN6), где второй антигенсвязывающий фрагмент включает любой фрагмент по любому из указанных ниже пунктов (b1)–(b3):

30 (b1) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 14, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 20, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1

с последовательностью SEQ ID NO: 30, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 38; и

(b2) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37; и

(b3) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19;

(A-18) противоопухолевый агент по любому из пунктов (A-15)-(A-17), который по меньшей мере один выбранный из группы, состоящей из следующих областей: первая переменная область антитела, вторая переменная область антитела, третья переменная область антитела и четвертая переменная область антитела, включает каркас антитела человека или каркас гуманизированного антитела,

(A-19) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с клаудином 6 (CLDN6), где первый антигенсвязывающий фрагмент включает любой фрагмент по любому из указанных ниже пунктов (c1)-(c4):

(c1) первая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вторая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27,

(c2) первая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и вторая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27,

(с3) первая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и вторая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28,

5 (с4) первая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и вторая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28,

(A-20) противоопухолевый агент по п. (A-19), где второй антигенсвязывающий фрагмент включает любой агент по любому из указанных ниже пунктов

10 (d1)–(d3):

(d1) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26,

15 (d2) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и

(d3) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

20 (A-21) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с клаудином 6 (CLDN6), где второй антигенсвязывающий фрагмент включает
25 любой фрагмент по любому из указанных ниже пунктов (d1)–(d3):

(d1) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26,

30 (d2) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25,

(d3) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

(A-22) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает фрагмент по любому из указанных ниже пунктов

(c1)–(c4):

5 (c1) первая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и вторая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27,

10 (c2) первая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и вторая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27,

(c3) первая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 и вторая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и

15 (c4) первая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и вторая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28,

(A-23) противоопухолевый агент по п. (A-22), где второй антигенсвязывающий фрагмент включает фрагмент по любому из указанных ниже пунктов

20 (d1)–(d3):

(d1) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26,

25 (d2) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25,

(d3) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

30 (A-24) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает любой один агент по любому из указанных ниже пунктов

(d1)–(d3):

(d1) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26,

5 (d2) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25,

(d3) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

10 (A-25) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает фрагмент по любому из указанных ниже пунктов

(a1)–(a4):

(a1) первая переменная область антитела, включающая определяющую
15 комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 9, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 15, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 21; и вторая определяющая комплементарная область

CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 35 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 39;

20 (a2) первая переменная область антитела, включающая определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 10,

CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 16, и CDR3 с

последовательностью SEQ ID NO: 22, и вторая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2 с

25 последовательностью SEQ ID NO: 35, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 39;

(a3) первая переменная область антитела, включающая определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 11, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 17, и CDR3 с последовательностью
30 SEQ ID NO: 23, и вторая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40; и

(a4) первая переменная область антитела, включающая определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 12,

CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 18, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 24, и вторая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40;

5 (A-26) противоопухолевый агент (A-25), дополнительно включающий любой из указанных ниже фрагментов (b1)-(b3)

(b1) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 14, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 20, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 30, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 38;

(b2) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37; и

(b3) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19;

25 (A-27) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает любой из указанных ниже фрагментов (b1)-(b3):

(b1) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 14, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 20, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 30, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 38;

(b2) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37; и

(b3) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19;

(A-28) противоопухолевый агент любой из (A-1)-(A-27), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула дополнительно включает (iii) Fc домен, проявляющий пониженную связывающую аффинность в отношении Fcγ рецептора по сравнению с природным IgG1 Fc доменом человека,

(A-29) противоопухолевый агент (A-28), где Fc домен состоит из первой субъединицы Fc области и второй субъединицы Fc области,

(A-30) противоопухолевый агент (A-29), где домен Fc содержит (e1) или (e2) указанный ниже, а положения аминокислот пронумерованы в соответствии с индексом ЕС:

(e1) первая субъединица Fc области, содержащая Cys в положении 349, Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407, и вторая субъединица Fc области, содержащая Cys в положении 354 и Trp в положении 366;

(e2) первая субъединица Fc-области, содержащая Glu в положении 439, и вторая субъединица Fc-области, содержащая Lys в положении 356;

(A-31) противоопухолевый агент (A-29) или (A-30), где первая и/или вторая субъединицы Fc области содержат (f1) или (f2), указанные ниже, а положения аминокислот пронумерованы в соответствии с индексом EU:

(f1) Ala в положении 234 и Ala в положении 235;

(f2) Ala в положении 234, Ala в положении 235 и Ala в положении 297;

(A-32) противоопухолевый агент любой из (A-29)-(A-31), где Fc домен проявляет более высокую FcRn связывающую аффинность в отношении FcRn человека по сравнению с природным IgG1 Fc доменом человека,

5 (A-33) противоопухолевый агент (A-32), где субъединица первой и/или второй Fc области включает Leu в положении 428, Ala в положении 434, Arg в положении 438 и Glu в положении 440, а положения аминокислот пронумерованы согласно EU индексу;

10 (A-34) противоопухолевый агент любой из (A-1)-(A-27), где первая переменная область антитела первого антигенсвязывающего фрагмента присоединена к первой консервативной области тяжелой цепи, вторая переменная область антитела первого антигенсвязывающего фрагмента присоединена к первой консервативной области легкой цепи, третья переменная область антитела второго антигенсвязывающего фрагмента присоединена ко второй консервативной области тяжелой цепи, и четвертая переменная область антитела второго антигенсвязывающего фрагмента
15 присоединена ко второй консервативной области легкой цепи, и

консервативная область представляет собой любую из (g1)-(g7), указанных ниже:

20 (g1) первая консервативная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, первая консервативная область легкой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, вторая консервативная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и вторая консервативная область легкой цепи, включающая аминокислотную последовательность
25 SEQ ID NO: 88;

(g2) первая консервативная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, первая консервативная область легкой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, вторая консервативная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и вторая консервативная область легкой цепи, включающая аминокислотную последовательность
30 SEQ ID NO: 86;

(g3) первая консервативная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, первая консервативная

(A-35) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает любую одну комбинацию указанных ниже четырех пептидных цепей (h01)-(h18):

- 5 (h01) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42 (цепь 1) и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (цепь 4),
- 10 (h02) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 (цепь 1) и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (цепь 4),
- 15 (h03) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (цепь 4),
- 20 (h04) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (цепь 4),
- 25 (h05) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (цепь 4),
- 30 (h06) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (цепь 4),

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 (цепь 4),

(h14) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную

5 последовательность SEQ ID NO: 53 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 (цепь 4),

(h15) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную

10 последовательность SEQ ID NO: 53 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 (цепь 4),

(h16) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную

15 последовательность SEQ ID NO: 53 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 (цепь 4),

(h17) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную

20 последовательность SEQ ID NO: 52 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (цепь 4), и

(h18) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную

25 последовательность SEQ ID NO: 52 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (цепь 4),

(A-36) противоопухолевый агент (A-35), где

(i) переменная область антитела, включенная в цепь 3, и переменная область антитела, включенная в цепь 4, формируют первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3, либо CD137,

30

(ii) переменная область антитела, включенная в цепь 1, и переменная область антитела, включенная в цепь 2, формируют второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), и

(iii) субъединица Fc области антитела, включенная в цепь 1, и субъединица Fc области антитела, включенная в цепь 3, формируют Fc домен, (A-37) противоопухолевый агент (A-35), где

(i) переменная область антитела, включенная в цепь 3, и переменная область антитела, включенная в цепь 4, формируют первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD3,

(ii) переменная область антитела, включенная в цепь 1, и переменная область антитела, включенная в цепь 2, формируют второй антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с клаудином 6 (CLDN6), и

(iii) субъединица Fc области антитела, включенная в цепь 1, и субъединица Fc области антитела, включенная в цепь 3, формируют Fc домен,

(A-38) противоопухолевый агент (A-35), где

(i) переменная область антитела, включенная в цепь 3, и переменная область антитела, включенная в цепь 4, формируют первый антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD137,

(ii) переменная область антитела, включенная в цепь 1, и переменная область антитела, включенная в цепь 2, формируют второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), и

(iii) субъединица Fc области антитела, включенная в цепь 1, и субъединица Fc области антитела, включенная в цепь 3, формируют Fc домен,

(A-39) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с эпитопами, перекрывающимися и/или конкурирующими с эпитопами на каждом CLDN6 и CD3/CD137, связанными с мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулой любой из (A-5)-(A-7),

(A-40) противоопухолевый агент любой из (A-1)-(A-39), где исследуемый рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

(A-41) противоопухолевый агент любой из (A-1)-(A-40), где исследуемый рак представляет собой по меньшей мере один рак, выбранный из группы, включающей рак яичников немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак

печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

(A-42) противоопухолевый агент любой из (A-1)-(A-41), где исследуемый рак представляет собой рак, метастазирующий до брюшины,

5 (A-43) противоопухолевый агент любой из (A-1)-(A-42), где исследуемый рак представляет собой перитонеально диссеминированный рак,

(A-44) противоопухолевый агент любой из (A-1)-(A-43), который предназначен для лечения пациентов с диагнозом рак, неподдающихся лечению по меньшей мере одним другим противоопухолевым агентом или

10 противоопухолевым агентом, отличающимся по меньшей мере от одного другого противоопухолевого агента,

(A-45) противоопухолевый агент любой из (A-40)-(A-44), где CLDN6-положительный рак представляет собой рак, который предварительно лечили другими противоопухолевыми агентами,

15 (A-46) противоопухолевый агент любой из (A-40)-(A-45), где CLDN6-положительный рак представляет собой рак, при лечении которого нельзя достигнуть требуемого действия в ходе лечения при введении только одного противоопухолевого агента,

(A-47) противоопухолевый агент любой из (A-40)-(A-46), который

20 дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель,
(A-48) противоопухолевый агент любой из (A-40)-(A-47), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула индуцирует цитотоксичность, и

(A-49) противоопухолевый агент (A-48), где цитотоксичность представляет

25 собой Т-клеточно-опосредованную цитотоксичность.
Более того, в настоящем изобретении предлагаются следующие объекты:

(B-1) Фармацевтическая композиция для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противоопухолевым агентом, где фармацевтическая композиция включает в качестве активного ингредиента

30 мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, причем мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, включающая (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и которая связывается либо с CD3 или с CD137, и (ii) второй

антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(B-2) фармацевтическая композиция для применения в комбинации по меньшей мере с одним другим противоопухолевым агентом, где

5 фармацевтическая композиция включает в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, любую из (A-2)-(A-39),

(B-3) фармацевтическая композиция (B-1) или (B-2), где исследуемым раком является CLDN6-положительный рак,

10 (B-4) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-3), где исследуемым раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

15 (B-5) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-4), где исследуемым раком является рак, метастазирующий до брюшины,

(B-6) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-5), где исследуемым раком является перитонеально диссеминированный рак,

20 (B-7) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-6), предназначенная для лечения пациентов с диагнозом рак, неподдающихся лечению по меньшей мере одним другим противоопухолевым агентом или противоопухолевым агентом, отличающимся по меньшей мере от одного другого противоопухолевого агента,

25 (B-8) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-7), где исследуемым раком является рак, предварительно леченный по меньшей мере одним другим противоопухолевым агентом или противоопухолевым агентом, отличающимся по меньшей мере от одного другого противоопухолевого агента,

30 (B-9) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-8), где исследуемым раком является рак, при лечении которого нельзя достигнуть требуемого действия в ходе лечения при введении только одного другого противоопухолевого агента,

(B-10) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-9), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере другой противоопухолевый агент вводят отдельно или последовательно,

(B-11) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-10), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят перед, одновременно и/или после введения по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента.

5 (B-12) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-11), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят пациенту с диагнозом рака, при котором экспрессия CLDN6 повышена при введении по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента,

10 (B-13) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-12), отличающаяся тем, что мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят субъекту с диагнозом рака, при котором экспрессия TGF β повышена при введении по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента,

15 (B-14) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-13), отличающаяся тем, что мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят субъекту с диагнозом рака, при котором экспрессия TGF β повышена при введении по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента,

20 (B-15) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-14), где введение по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента повышает противоопухолевый эффект мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы,

25 (B-16) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-15), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой по меньшей мере один агент, выбранный из группы, состоящей из химиотерапевтического агента, ингибитора иммунных контрольных точек и ингибитора PARP,

(B-17) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-16), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который повышает экспрессию CLDN6 в клетке,

30 (B-18) фармацевтическая композиция любая из (B-1)-(B-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой фармацевтический агент, который проявляет эффект индукции TGF β ,

(B-19) фармацевтическая композиция любая из (B-16)-(B-18), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой препарат платины, алкалоид или антимаболит,

(B-20) фармацевтическая композиция любая из (B-16)-(B-19), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой препарат платины,

5 (B-21) фармацевтическая композиция любая из (B-16)-(B-20), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой алкалоид,

(B-22) фармацевтическая композиция любая из (B-16)-(B-19), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой ингибитор топоизомеразы,

10 (B-23) фармацевтическая композиция любая из (B-16)-(B-19), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антиметаболит,

(B-24) фармацевтическая композиция любая из (B-16)-(B-19), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой карбоплатин или цисплатин,

(B-25) фармацевтическая композиция любая из (B-16)-(B-19), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой иринотекан,

20 (B-26) фармацевтическая композиция любая из (B-16)-(B-19), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой гемцитабин,

(B-27) фармацевтическая композиция (B-16), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антитело анти-PD-L1,

25 (B-28) фармацевтическая композиция (B-16), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой олапариб,

(B-29) индуцирующий цитотоксичность агент, супрессор клеточного роста, блокатор клеточного роста, активатор иммунного ответа, агент для лечения рака или агент для предотвращения рака, включающий фармацевтическую композицию любую из (B-1)-(B-28),

30 (B2-1) фармацевтическая композиция для применения в комбинации по меньшей мере с одним способом лечения, который индуцирует TGF β , где фармацевтическая композиция включает в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, причем мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый

антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

5 (B2-2) фармацевтическая композиция (B2-1), где способ лечения, который индуцирует TGF β , представляет собой введение агента, который индуцирует TGF β ,

(B2-3) фармацевтическая композиция (B2-1) или (B2-2), где способ лечения, который индуцирует TGF β , представляет собой введение агента,
10 который индуцирует TGF β 1,

(B2-4) фармацевтическая композиция любая из (B2-1)-(B2-3), где исследуемым раком является CLDN6-положительный рак,

(B2-5) фармацевтическая композиция любая из (B2-1)-(B2-4), где исследуемым раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак
15 яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

(B2-6) фармацевтическая композиция любая из (B2-1)-(B2-5), где исследуемым раком является рак, метастазирующий до брюшины,

20 (B2-7) фармацевтическая композиция любая из (B2-1)-(B2-6), где исследуемым раком является перитонеально диссеминированный рак,

(B2-8) фармацевтическая композиция любая из (B2-1)-(B2-7), которая предназначена для лечения пациентов с диагнозом рака, который не поддается лечению с использованием способа, который индуцирует TGF β ,

25 (B2-9) фармацевтическая композиция любая из (B2-1)-(B2-8), где исследуемым раком является рак, который предварительно лечили способом лечения, который индуцирует TGF β , или раком, при лечении которого нельзя достигнуть требуемого действия способом лечения, который индуцирует TGF β ,

(B2-10) фармацевтическая композиция любая из (B2-1)-(B2-9), где
30 фармацевтическая композицию, включающую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которую вводят отдельно или последовательно с лечением, которое индуцирует TGF β ,

(B2-11) фармацевтическая композиция любая из (B2-2)-(B2-10), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которую вводят до, одновременно и/или после лечения, которое индуцирует TGF β ,

5 (B2-12) фармацевтическая композиция любая из (B2-1)-(B2-11), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят пациентам с диагнозом рак, при котором экспрессия CLDN6 повышается при лечении, которое индуцирует TGF β ,

10 (B2-13) фармацевтическая композиция любая из (B2-1)-(B2-12), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят пациентам с диагнозом рак, при котором экспрессия CLDN6 повышается при лечении, которое индуцирует TGF β ,

15 (B2-14) фармацевтическая композиция любая из (B2-1)-(B2-13), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят пациентам с диагнозом рак, при котором экспрессия TGF β 1 повышается при лечении, которое индуцирует TGF β ,

(B2-15) фармацевтическая композиция любая из (B2-1)-(B2-14), которая повышает противоопухолевый эффект мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы в ходе лечения, которое индуцирует TGF β , и

20 (B2-16) индуцирующий цитотоксичность агент, супрессор клеточного роста, блокатор клеточного роста, активатор иммунного ответа, агент для лечения рака или агент для предотвращения рака, включающий фармацевтическую композицию любую из (B2-1)-(B2-15).

25 (B3-1) Фармацевтическая композиция для применения в комбинации по меньшей мере с одним индуцирующим экспрессию CLDN6 агентом, которая включает в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу,

причем мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и (ii) второй
30 антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(B3-2) фармацевтическая композиция (B3-1), где исследуемым раком является CLDN6-положительный рак,

(B3-3) фармацевтическая композиция (B3-1) или (B3-2), где исследуемый рак представляет собой любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

(B3-4) фармацевтическая композиция любая из (B3-1)-(B3-3), где исследуемым раком является рак, метастазирующий до брюшины,

(B3-5) фармацевтическая композиция одна любая из (B3-1)-(B3-4), где исследуемым раком является перитонеально диссеминированный рак,

10 (B3-6) фармацевтическая композиция одна любая из (B3-1)-(B3-5), которая предназначена для лечения пациентов с диагнозом рака, который не поддается лечению с использованием агента, индуцирующего экспрессию CLDN6,

(B3-7) фармацевтическая композиция любая из (B3-1)-(B3-6), где исследуемым раком является рак, который предварительно лечили агентом, который индуцирует экспрессию CLDN6, или рак, при лечении которого нельзя достигнуть требуемого действия при лечении агентом, индуцирующим экспрессию CLDN6,

20 (B3-8) фармацевтическая композиция любая из (B3-1)-(B3-7), где фармацевтическую композицию, включающую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, вводят отдельно или последовательно с агентом, индуцирующим экспрессию CLDN6,

(B3-9) фармацевтическая композиция любая из (B3-1)-(B3-8), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения агента, индуцирующего экспрессию CLDN6,

25 (B3-10) фармацевтическая композиция любая из (B3-1)-(B3-9), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят пациентам с диагнозом рак, при котором повышается экспрессия CLDN6 при введении агента, индуцирующего экспрессию CLDN6,

30 (B3-11) фармацевтическая композиция любая из (B3-1)-(B3-10), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят пациентам с диагнозом рака, при котором экспрессия TGF β повышается при введении агента, индуцирующего экспрессию CLDN6,

(B3-12) фармацевтическая композиция любая из (B3-1)-(B3-11), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят пациентам с

диагнозом рака, при котором экспрессия TGF β 1 повышается при введении агента, индуцирующего экспрессию CLDN6,

(B3-13) фармацевтическая композиция любая из (B3-1)-(B3-12), которая повышает противоопухолевое действие мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы при введении агента, индуцирующего экспрессию CLDN6, и

(B3-14) индуцирующий цитотоксичность агент, супрессор клеточного роста, блокатор клеточного роста, активатор иммунного ответа, агент для лечения рака или агент для предотвращения рака, включающий фармацевтическую композицию любую из (B3-1)-(B3-13).

Более того, в настоящем изобретении предлагаются следующие объекты:

(C-1) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента

мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), и который проявляет более высокую цитотоксичную активность по сравнению с первым антигенсвязывающим фрагментом, который является антигенсвязывающим фрагментом, связывающимся только с CD3,

(C-2) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента

мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), и который проявляет сниженную токсичность по сравнению с первым антигенсвязывающим фрагментом, который является антигенсвязывающим фрагментом, связывающимся только с CD3,

(C-3) противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента

мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает (1) первый антигенсвязывающий домен, который способен связываться T-клеточным рецепторным комплексом, и (2) второй антигенсвязывающий

фрагмент, который способен связываться с CLDN6, и который проявляет Т клеточную цитотоксичную активность, которая равна или выше активности биспецифичного антитела (CS3348), включающего антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с Т-клеточным рецепторным комплексом, который представляет собой фрагмент, включающий тяжелую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194, и легкую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 192, и антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CLDN6, который представляет собой фрагмент, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193, и легкую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195.

(C-4) Противоопухолевый агент любой из (C-1)-(C-3), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула дополнительно включает (3) Fc домен, проявляющий сниженную связывающую активность в отношении Fc γ рецептора по сравнению с природным IgG1 Fc доменом,

(C-5) Противоопухолевый агент (C-1), (C-3) или (C-4), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула дополнительно проявляет пониженную токсичность по сравнению с мультиспецифичным антителом (CS3348),

(C-6) Противоопухолевый агент любой из (C-1)-(C-5), где первый антигенсвязывающий фрагмент включает комбинацию переменных областей антитела, выбранных из областей (a1) и (a2), указанных ниже, или комбинацию переменных областей антитела, функционально эквивалентных им:

(a1) первая переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 11, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 17, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 23, и вторая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40;

(a2) первая переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью (CDR) 1 SEQ ID NO: 10, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 16, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 22, и вторая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2 с

последовательностью SEQ ID NO: 35, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 39;

(C-7) Противоопухолевый агент любой из (C-1)-(C-6), где второй антигенсвязывающий фрагмент включает комбинацию переменных областей антитела, выбранных из областей (b1) и (b2), указанных ниже, или комбинацию переменных областей антитела, функционально эквивалентных им:

(b1) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37; и

(b2) третья переменная область антитела, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью (CDR) 1 SEQ ID NO: 8, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 14, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 20, и четвертая переменная область антитела, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 30, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34, и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 38;

(C-8) противоопухолевый агент любой из (C-1)-(C-7), где первый антигенсвязывающий фрагмент включает комбинацию переменных областей антитела, выбранных из областей (c1) и (c2), указанных ниже, или комбинацию переменных областей антитела, функционально эквивалентных им:

(c1) первая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и вторая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28,

(c2) первая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и вторая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27,

(C-9) противоопухолевый агент любой из (C-1)-(C-8), где второй антигенсвязывающий фрагмент включает комбинацию переменных областей антитела, выбранных из областей (d1) и (d2), указанных ниже, или комбинацию переменных областей антитела, функционально эквивалентных им:

(d1) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и

5 (d2) третья переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и четвертая переменная область антитела, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26,

(C-10) противоопухолевый агент любой один из (C-4)-(C-9), где Fc домен состоит из первой субъединицы Fc области и второй субъединицы Fc области,

10 (C-11) противоопухолевый агент любой из (C-4)-(C-10), где Fc домен состоит из области (e1) или (e2), указанных ниже, и положения аминокислот пронумерованы согласно EU индексу:

(e1) первая субъединица Fc области, включающая Cys в положении 349, Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407, и вторая субъединица Fc области, содержащая Cys в положении 354 и Trp в положении
15 366;

(e2) первая субъединица Fc-области, содержащая Glu в положении 439, и вторая субъединица Fc-области, содержащая Lys в положении 356;

(C-12) противоопухолевый агент (C-9) или (C-11), где первая и/или вторая субъединицы Fc области содержат (f1) или (f2), указанные ниже, а положения аминокислот пронумерованы в соответствии с индексом EU:
20

(f1) Ala в положении 234 и Ala в положении 235;

(f2) Ala в положении 234, Ala в положении 235, и Ala в положении 297;

(C-13) противоопухолевый агент любой из (C-4)-(C-12), где Fc домен проявляет более высокую FcRn связывающую активность в отношении FcRn человека по сравнению с природным IgG1 Fc доменом; и
25

(C-14) противоопухолевый агент любой из (C-1)-(C-13), который дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

Более того, в настоящем изобретении предлагаются следующие объекты:

(D-1) фармацевтическая композиция, которая включает в качестве
30 активного ингредиента по меньшей мере один другой противоопухолевый агент, и которая предназначена для применения в комбинации с мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулой, включающей (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который способен

связываться либо с CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(D-2) фармацевтическая композиция (D-1), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой любую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу (A-2)-(A-39)

(D-3) фармацевтическая композиция (D-1) или (D-2), где исследуемый рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

(D-4) фармацевтическая композиция любая из (D-1)-(D-3), где исследуемым раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

(D-5) фармацевтическая композиция любая из (D-1)-(D-4), где исследуемым раком является рак, метастазирующий до брюшины,

(D-6) фармацевтическая композиция любая из (D-1)-(D-5), где исследуемым раком является перитонеально диссеминированный рак,

(D-7) фармацевтическая композиция любая из (D-1)-(D-6), предназначенная для лечения пациентов, неподдающихся лечению по меньшей мере одним другим противоопухолевым агентом или противоопухолевым агентом, отличающимся по меньшей мере от одного другого противоопухолевого агента,

(D-8) фармацевтическая композиция любая из (D-1)-(D-7), где исследуемый рак представляет собой рак, который предварительно лечили по меньшей мере одним другим противоопухолевым агентом, или противоопухолевым агентом, отличающимся по меньшей мере от одного другого противоопухолевого агента,

(D-9) фармацевтическая композиция любая из (D-1)-(D-8), где исследуемый рак представляет собой рак, при лечении которого нельзя достигнуть требуемого действия в ходе лечения при введении по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента,

(D-10) фармацевтическая композиция любая из (D-1)-(D-9), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент и мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят отдельно или последовательно,

(D-11) фармацевтическая композиция любая из (D-1)-(D-10), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент вводят до, одновременно и/или после введения мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы,

(D-12) фармацевтическая композиция любая из (D-1)-(D-11), где введение мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы повышает противоопухолевое действие по меньшей мере одним другим противоопухолевым агентом,

5 (D-13) фармацевтическая композиция любая из (D-1)-(D-12), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент выбран из группы, состоящей из химиотерапевтического агента, ингибитора иммунных контрольных точек и ингибитора PARP,

10 (D-14) фармацевтическая композиция любая из (D-1)-(D-13), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который повышает экспрессию CLDN6 в клетке,

(D-15) фармацевтическая композиция любая из (D-1)-(D-14), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β в клетке,

15 (D-16) фармацевтическая композиция любая из (D-1)-(D-15), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β 1 в клетке,

20 (D-17) фармацевтическая композиция любая из (D-13)-(D-16), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой препарат платины, алкалоид или антимаболит,

(D-18) фармацевтическая композиция любая из (D-13)-(D-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой препарат платины,

25 (D-19) фармацевтическая композиция любая из (D-13)-(D-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой растительный алкалоид,

(D-20) фармацевтическая композиция любая из (D-3)-(D-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой ингибитор топоизомеразы,

30 (D-22) фармацевтическая композиция любая из (D-13)-(D-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антимаболит,

(D-23) фармацевтическая композиция любая из (D-13)-(D-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой карбоплатин или цисплатин,

5 (D-24) фармацевтическая композиция любая из (D-13)-(D-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой иринотекан,

(D-25) фармацевтическая композиция любая из (D-13)-(D-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой гемцитабин,

10 (D-26) фармацевтическая композиция (D-13), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антитело anti-PD-L1,

(D-27) фармацевтическая композиция (D-13), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой олапариб, и

15 (D-28) индуцирующий цитотоксичность агент, супрессор клеточного роста, блокатор клеточного роста, активатор иммунного ответа, агент для лечения рака или агент для предотвращения рака, включающий фармацевтическую композицию любую из (D-1)-(D-27).

Более того, в настоящем изобретении предлагаются следующие объекты:

20 (E-1) фармацевтическая композиция для лечения или предотвращения рака, сформированная при комбинировании мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента,

причем мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и (ii) второй
25 антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(E-2) фармацевтическая композиция (E-1), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу любую из (A-2)-(A-39),

30 (E-3) фармацевтическая композиция либо (E-1) либо (E-2), где рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

(E-4) фармацевтическая композиция любая из (E-1)-(E-3), где исследуемым раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия,

эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

(E-5) фармацевтическая композиция любая из (E-1)-(E-4), где рак представляет собой рак, метастазирующий до брюшины,

5 (E-6) фармацевтическая композиция одна любая из (E-1)-(E-5), где раком является перитонеально диссеминированный рак,

(E-7) фармацевтическая композиция любая из (E-1)-(E-6), которая предназначена для лечения пациентов с диагнозом рака, который не поддается лечению по меньшей мере одним другим противоопухолевым агентом или
10 противоопухолевым агентом, который отличается по меньшей мере от одного другого противоопухолевого агента,

(E-8) фармацевтическая композиция любая из (E-1)-(E-7), где рак представляет собой рак, который предварительно лечили по меньшей мере одним другим противоопухолевым агентом или
15 противоопухолевым агентом, который отличается по меньшей мере от одного другого противоопухолевого агента,

(E-9) фармацевтическая композиция любая из (E-1)-(E-8), где рак представляет собой рак, при лечении которого нельзя достигнуть требуемого действия в ходе лечения при введении только одного другого
20 противоопухолевого агента,

(E-10) фармацевтическая композиция любая из (E-1)-(E-9), где введение по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента повышает противоопухолевый эффект мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы,

25 (E-11) фармацевтическая композиция любая из (E-1)-(E-9), где введение мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы повышает противоопухолевый эффект по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента,

(E-12) фармацевтическая композиция любая из (E-1)-(E-11), где
30 фармацевтическая композиция представляет собой комбинированный препарат,

(E-13) фармацевтическая композиция любая из (E-1)-(E-12), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один другой противоопухолевый агент вводят отдельно или последовательно,

(E-14) фармацевтическая композиция (E-13), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента,

5 (E-15) фармацевтическая композиция любая из (E-1)-(E-14), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент выбран из группы, состоящей из химиотерапевтического агента, ингибитора иммунных контрольных точек и ингибитора PARP,

10 (E-16) фармацевтическая композиция любая из (E-1)-(E-15), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который повышает экспрессию CLDN6 в раковой клетке,

(E-17) фармацевтическая композиция любая из (E-1)-(E-16), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β в клетке,

15 (E-18) фармацевтическая композиция любая из (E-1)-(E-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β 1 в клетке,

(E-19) фармацевтическая композиция любая из (E-15)-(E-18), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой препарат платины, алкалоид или антимаболит,

20 (E-20) фармацевтическая композиция любая из (E-15)-(E-19), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой препарат платины,

25 (E-21) фармацевтическая композиция любая из (E-15)-(E-19), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой алкалоид,

(E-22) фармацевтическая композиция любая из (E-15)-(E-19), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой ингибитор топоизомеразы,

30 (E-23) фармацевтическая композиция любая из (E-15)-(E-19), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антимаболит,

(E-24) фармацевтическая композиция любая из (E-15)-(E-19), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой карбоплатин или цисплатин,

(E-25) фармацевтическая композиция любая из (E-15)-(E-19), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой иринотекан,

5 (E-26) фармацевтическая композиция любая из (E-15)-(E-19), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой гемцитабин,

(E-27) фармацевтическая композиция (E-15), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антитело anti-PD-L1,

10 (E-28) фармацевтическая композиция (E-15), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой олапариб, и

(E-29) индуцирующий цитотоксичность агент, супрессор клеточного роста, блокатор клеточного роста, активатор иммунного ответа, агент для лечения рака или агент для предотвращения рака, включающий фармацевтическую композицию любую из (E-1)-(E-28),

15 (E2-1) фармацевтическая композиция для лечения или предотвращения рака, сформированная при комбинировании мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента,

20 где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

25 (E2-2) фармацевтическая композиция (E2-1), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой любую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу (A-2)-(A-39),

(E2-3) фармацевтическая композиция или (E2-1) или (E2-2), где рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

30 (E2-4) фармацевтическая композиция любая из (E2-1)-(E2-3), где исследуемым раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

(E2-5) фармацевтическая композиция любая из (E2-1)-(E2-4), где рак представляет собой рак метастазирующий до брюшины,

(E2-6) фармацевтическая композиция любая из (E2-1)-(E2-5), где раком является перитонеально диссеминированный рак,

5 (E2-7) фармацевтическая композиция любая из (E2-1)-(E2-6), предназначенная для лечения пациентов с диагнозом рака, который не поддается лечению по меньшей мере одним индуцирующим TGF β агентом или индуцирующим TGF β агентом, отличающимся по меньшей мере от одного другого индуцирующего TGF β агента,

10 (E2-8) фармацевтическая композиция любая из (E2-1)-(E2-7), где раком является рак, который предварительно лечили по меньшей мере одним индуцирующим TGF β агентом или индуцирующим TGF β агентом, отличающимся по меньшей мере от одного индуцирующего TGF β агента,

15 (E2-9) фармацевтическая композиция любая из (E2-1)-(E2-8), где раком является рак, при лечении которого нельзя достигнуть требуемого действия в ходе лечения при введении по меньшей мере только одного индуцирующего TGF β агента,

20 (E2-10) фармацевтическая композиция любая из (E2-1)-(E2-9), где при введении по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента повышается противоопухолевый эффект мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы,

(E2-11) фармацевтическая композиция любая из (E2-1)-(E2-10), где фармацевтическая композиция представляет собой комбинированный препарат,

25 (E2-12) фармацевтическая композиция любая из (E2-1)-(E2-11), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один другой индуцирующий TGF β агент вводят отдельно или последовательно,

(E2-13) фармацевтическая композиция (E2-12), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента,

30 (E2-14) индуцирующий цитотоксичность агент, супрессор клеточного роста, блокатор клеточного роста, активатор иммунного ответа, агент для лечения рака или агент для предотвращения рака, включающий фармацевтическую композицию любую из (E2-1)-(E2-13),

(E3-1) фармацевтическая композиция для лечения или предотвращения рака, сформированная при комбинировании мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного агента, индуцирующего экспрессию CLDN6,

5 где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

10 (E3-2) фармацевтическая композиция (E3-1), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой любую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу (A-2)-(A-39),

(E3-3) фармацевтическая композиция либо (E3-1) либо (E3-2), где рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

15 (E3-4) фармацевтическая композиция любая из (E3-1)-(E3-3), где исследуемым раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

20 (E3-5) фармацевтическая композиция любая из (E3-1)-(E3-4), где рак представляет собой рак, метастазирующий до брюшины,

(E3-6) фармацевтическая композиция любая из (E3-1)-(E3-5), где раком является перитонеально диссеминированный рак,

25 (E3-7) фармацевтическая композиция любая из (E3-1)-(E3-6), предназначенная для лечения пациентов с диагнозом рака, неподдающихся лечению по меньшей мере одним индуцирующим CLDN6 агентом или индуцирующим экспрессию CLDN6 агентом, отличающимся по меньшей мере от одного другого индуцирующего CLDN6 агента,

30 (E3-8) фармацевтическая композиция любая из (E3-1)-(E3-7), где раком является рак, который предварительно лечили по меньшей мере одним индуцирующим экспрессию CLDN6 агентом или индуцирующим экспрессию CLDN6 агентом, отличающимся по меньшей мере от одного другого индуцирующего экспрессию CLDN6 агента,

(E3-9) фармацевтическая композиция любая из (E3-1)-(E3-8), где раком является рак, при лечении которого нельзя достигнуть требуемого действия в ходе лечения при введении только одного индуцирующего экспрессию CLDN6 агента,

5 (E3-10) фармацевтическая композиция любая из (E3-1)-(E3-9), где при введении по меньшей мере одного индуцирующего экспрессию CLDN6 агента повышается противоопухолевый эффект мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы.

10 (E3-11) фармацевтическая композиция любая из (E3-1)-(E3-10), где фармацевтическая композиция представляет собой комбинированный препарат,

(E3-12) фармацевтическая композиция любая из (E3-1)-(E3-11), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент вводят отдельно или последовательно,

15 (E3-13) фармацевтическая композиция (E3-12), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения по меньшей мере, одного индуцирующего экспрессию TGF β агента, и

20 (E3-14) индуцирующий цитотоксичность агент, супрессор клеточного роста, блокатор клеточного роста, активатор иммунного ответа, агент для лечения рака или агент для предотвращения рака, включающий фармацевтическую композицию любую из (E3-1)-(E3-13).

(F-1) комбинация мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента,

25 где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

30 (F-2) комбинация (F-1), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой любую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу (A-2)-(A-39),

(F-3) комбинация (F-1) или (F-2), где исследуемый рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

(F-4) комбинация любая из (F-1)-(F-3), где исследуемым раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников,

немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

5 (F-5) комбинация любая из (F-1)-(F-4), где рак представляет собой рак, метастазирующий до брюшины,

(F-6) комбинация любая из (F-1)-(F-5), где раком является перитонеально диссеминированный рак,

10 (F-7) комбинация любая из (F-1)-(F-6), предназначенная для лечения пациентов с диагнозом рака, неподдающихся лечению по меньшей мере одним другим противоопухолевым агентом или по меньшей мере другим противоопухолевым агентом, отличающимся по меньшей мере от одного другого противоопухолевого агента,

15 (F-8) комбинация любая из (F-1)-(F-7), где исследуемым раком является рак, который предварительно лечили по меньшей мере одним другим противоопухолевым агентом или противоопухолевым агентом, отличающимся по меньшей мере от одного другого противоопухолевого агента,

20 (F-9) комбинация любая из (F-1)-(F-8), где исследуемым раком является рак, при лечении которого нельзя достигнуть требуемого действия в ходе лечения при введении по меньшей мере только одного другого противоопухолевого агента,

(F-10) комбинация любая из (F-1)-(F-9), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент повышает противоопухолевый эффект мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы,

25 (F-11) комбинация любая из (F-1)-(F-9), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула повышает противоопухолевый эффект по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента,

(F-12) комбинация любая из (F-1)-(F-11), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере другой противоопухолевый агент вводят отдельно или последовательно,

30 (F-13) комбинация любая из (F-1)-(F-12), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения по меньшей мере одного противоопухолевого агента

(F-14) комбинация любая из (F-1)-(F-13), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой по меньшей мере один агент,

выбранный из группы, состоящей из химиотерапевтического агента, ингибитора иммунных контрольных точек и ингибитора PARP,

(F-15) комбинация любая из (F-1)- F-14), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который повышает экспрессию CLDN6 в клетке,

(F-16) комбинация любая из (F-1)-(F-15), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β в клетке,

(F-17) комбинация любая из (F-1)-(F-16), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β 1 в клетке,

(F-18) комбинация любая из (F-14)-(F-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой препарат платины, алкалоид или антимаетаболит,

(F-19) комбинация любая из (F-14)-(F-18), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой препарат платины,

(F-20) комбинация любая из (F-14)-(F-18), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой алкалоид,

(F-21) комбинация любая из (F-14)-(F-18), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой ингибитор топоизомеразы,

(F-22) комбинация любая из (F-14)-(F-18), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антимаетаболит,

(F-23) комбинация любая из (F-14)-(F-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой карбоплатин или цисплатин,

(F-24) комбинация любая из (F-14)-(F-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой иринотекан,

(F-25) комбинация любая из (F-14)-(F-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой гемцитабин,

(F-26) комбинация (F-14), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антитело анти-PD-L1,

(F-26) комбинация (F-14), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой олапариб,

(F-27) индуцирующий цитотоксичность агент, супрессор клеточного роста, блокатор клеточного роста, активатор иммунного ответа, агент для лечения рака или агент для предотвращения рака, включающий комбинацию любую из (F-1)-(F-26).

5 (F2-1) комбинация мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента,

где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй

10 антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(F2-2) комбинация (F2-1), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой любую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу (A-2)-(A-39),

15 (F2-3) комбинация (F2-1) или (F2-2), где исследуемый рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

(F2-4) комбинация (F2-1) или (F2-2), где раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную

20 тератоидно-рабдоидную опухоль,

(F2-5) комбинация любая из (F2-1)-(F2-4), где рак представляет собой рак, метастазирующий до брюшины,

(F2-6) фармацевтическая композиция любая из (F2-1)-(F2-5), где раком является перитонеально диссеминированный рак,

25 (F2-7) комбинация любая из (F2-1)-(F2-6), предназначенная для лечения пациентов с диагнозом рак, неподдающихся лечению по меньшей мере одним индуцирующим TGF β или по меньшей мере индуцирующим TGF β агентом, отличающимся по меньшей мере от одного другого индуцирующего TGF β агента,

30 (F2-8) комбинация любая из (F2-1)-(F2-7), где исследуемым раком является рак, который предварительно лечили по меньшей мере одним индуцирующим TGF β агентом или индуцирующим TGF β агентом, который отличается по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента,

(F2-9) комбинация любая из (F2-1)-(F2-8), где исследуемым раком является рак, при лечении которого нельзя достигнуть требуемого действия в ходе лечения при введении по меньшей мере только одного индуцирующего TGF β агента,

5 (F2-10) комбинация любая из (F2-1)-(F2-9), где при введении по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента повышается противоопухолевый эффект мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы,

(F2-11) комбинация любая из (F2-1)-(F2-10), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент вводят отдельно или последовательно,

10 (F2-12) комбинация любая из (F2-1)-(F2-11), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента,

(F2-13) комбинация любая из (F2-1)-(F2-12), где по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию CLDN6 в клетке,

(F2-14) комбинация любая из (F2-1)-(F2-13), где по меньшей мере один индуцирующий TGF β является агентом, который индуцирует экспрессию TGF β 1 в клетке,

20 (F2-15) индуцирующий цитотоксичность агент, супрессор клеточного роста, блокатор клеточного роста, активатор иммунного ответа, агент для лечения рака или агент для предотвращения рака, включающий фармацевтическую композицию любую из (F2-1)-(F2-14).

(F3-1) комбинация мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного индуцирующего экспрессию CLDN6 агента,

25 где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

30 (F3-2) комбинация (F3-1), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой любую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу (A-2)-(A-39),

(F3-3) комбинация (F3-1) или (F3-2), где исследуемый рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

(F3-4) комбинация (F3-1) или (F3-3), где раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

(F3-5) комбинация любая из (F3-1)-(F3-4), где рак представляет собой рак, метастазирующий до брюшины,

(F3-6) фармацевтическая композиция любая из (F3-1)-(F3-5), где раком является перитонеально диссеминированный рак,

(F3-7) комбинация любая из (F3-1)-(F3-6), предназначенная для лечения пациентов с диагнозом рака, неподдающихся лечению по меньшей мере одним индуцирующим экспрессию CLDN6 агентом или индуцирующим экспрессию CLDN6 агентом, отличающимся по меньшей мере от одного индуцирующего экспрессию CLDN6 агента,

(F3-8) комбинация любая из (F3-1)-(F3-7), где раком является рак, который предварительно лечили по меньшей мере одним индуцирующим экспрессию CLDN6 агентом или индуцирующим экспрессию CLDN6 агентом, отличающимся по меньшей мере от одного другого индуцирующего экспрессию CLDN6 агента,

(F3-9) комбинация любая из (F3-1)-(F3-8), где раком является рак, при лечении которого нельзя достигнуть требуемого действия в ходе лечения при введении только одного индуцирующего экспрессию CLDN6 агента,

(F3-10) комбинация любая из (F3-1)-(F3-9), где при введении по меньшей мере одного индуцирующего экспрессию CLDN6 агента повышается противоопухолевый эффект мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы,

(F3-11) комбинация любая из (F3-1)-(F3-10), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один индуцирующий CLDN6 агент вводят отдельно или последовательно,

(F3-12) комбинация любая из (F3-1)-(F3-11), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения по меньшей мере, одного индуцирующего экспрессию CLDN6 агента,

(F3-13) комбинация любая из (F3-1)-(F3-12), где по меньшей мере один индуцирующий экспрессию CLDN6 представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β в клетке,

5 (F3-14) комбинация любая из (F3-1)-(F3-13), где по меньшей мере один индуцирующий экспрессию CLDN6 представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β 1 в клетке,

10 (F3-15) индуцирующий цитотоксичность агент, супрессор клеточного роста, блокатор клеточного роста, активатор иммунного ответа, агент для лечения рака или агент для предотвращения рака, включающий фармацевтическую композицию любую из (F3-1)-(F3-14).

(G-1) Способ индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировки пролиферации клеток, активации иммунного ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума, включающий введение эффективного количества мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и эффективного количества по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента, где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

20 (G-2) Способ индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировки пролиферации клеток, активации иммунного ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума, при комбинированном применении мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающий введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента,

где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

30 (G-3) Способ повышения эффектов индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировки пролиферации клеток, активации иммунного

ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума, с использованием мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы,

где указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента,

5 где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

10 (G-4) Способ повышения эффектов индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировки пролиферации клеток, активации иммунного ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума, с использованием по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента,

15 где указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы,

20 где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(G-5) Способ любой из (G1-G4), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой любую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу (A-2)-(A-39),

25 (G-6) Способ, любой из (G-1) или (G-5), где исследуемый рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

30 (G-7) Способ, любой из (G-1) или (G-6), где раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

(G-8) Способ, любой из (G-1)-(G-7), где рак представляет собой рак, метастазирующий до брюшины,

(G-9) Способ, любой из (G-1)-(G-8), где раком является перитонеально диссеминированный рак,

(G-10) Способ, любой из (G-1)-(G-9), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один другой противоопухолевый агент вводят отдельно или последовательно,

5 (G-11) Способ, любой из (G-1)-(G-10), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента,

10 (G-12) Способ, любой из (G-1)-(G-11), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент по меньшей мере один выбран из группы, состоящей из химиотерапевтического агента, ингибитора иммунных контрольных точек и ингибитора PARP,

(G-13) Способ, любой из (G-1)-(G-12), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который повышает экспрессию CLDN6 в клетке,

15 (G-14) Способ, любой из (G-1)-(G-13), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β в клетке,

(G-15) Способ, любой из (G-1)-(G-14), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β 1 в клетке,

20 (G-16) Способ, любой из (G-12)-(G-15), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой препарат платины, алкалоид или антиметаболит,

(G-17) Способ, любой из (G-12)-(G-16), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой препарат платины,

25 (G-18) Способ, любой из (G-12)-(G-16), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой алкалоид,

(G-19) Способ, любой из (G-12)-(G-16), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой ингибитор топоизомеразы,

30 (G-20) Способ, любой из (G-12)-(G-16), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антиметаболит,

(G-21) Способ, любой из (G-12)-(G-16), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой карбоплатин или цисплатин,

(G-22) Способ, любой из (G-12)-(G-16), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой иринотекан,

(G-23) Способ, любой из (G-12)-(G-16), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой гемцитабин,

(G-24) Способ (G-12), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антитело анти-PD-L1,

5 (G-25) Способ (G-12), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой олапариб,

(G2-1) Способ индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировки пролиферации клеток, активации иммунного ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума, включающий введение эффективного количества мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и эффективного количества по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента,

10 где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(G2-2) Способ индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировки пролиферации клеток, активации иммунного ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума, при комбинированном применении мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающий введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента,

20 где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(G2-3) Способ индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировки пролиферации клеток, активации иммунного ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента,

30

где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(G2-4) Способ любой из (G2-1)-(G2-3), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой любую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу (A-2)-(A-39),

(G2-5) Способ, любой из (G2-1) или (G2-4), где исследуемый рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

(G2-6) Способ, любой из (G2-1) или (G2-5), где раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

(G2-7) Способ, любой из (G2-1)-(G2-6), где рак представляет собой рак, метастазирующий до брюшины,

(G2-8) Способ, любой из (G2-1)-(G2-7), где раком является перитонеально диссеминированный рак,

(G2-9) Способ, любой из (G2-1)-(G2-8), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент вводят отдельно или последовательно,

(G2-10) Способ, любой из (G2-1)-(G2-9), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения по меньшей мере индуцирующего TGF β агента,

(G2-11) Способ, любой из (G2-1)-(G2-10), где по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент представляет собой агент, который повышает экспрессию CLDN6 в клетке,

(G2-12) Способ, любой из (G2-1)-(G2-11), где по меньшей мере один индуцирующий экспрессию TGF β агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β 1 в опухолевой клетке,

(G3-1) Способ индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировки пролиферации клеток, активации иммунного ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума, где указанный способ включает

введение эффективного количества мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и эффективного количества по меньшей мере одного

индуцирующего экспрессию CLDN6 агента,

5 где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

10 (G3-2) Способ индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировки пролиферации клеток, активации иммунного ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума при комбинированном применении мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, где указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного индуцирующего экспрессию CLDN6 агента,

15 где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

20 (G3-3) Способ индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировки пролиферации клеток, активации иммунного ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума с использованием мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, где указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества, по меньшей мере

25 одного индуцирующего экспрессию CLDN6 агента,

где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6

30 (CLDN6),

(G3-4) Способ любой из (G3-1)-(G3-3), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой любую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу (A-2)-(A-39),

(G3-5) Способ либо (G3-1) либо (G3-4), где рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

(G2-6) Способ, любой из (G3-1)-(G5-5), где раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

(G3-7) Способ, любой из (G3-1)-(G3-6), где рак представляет собой рак, метастазирующий до брюшины,

(G3-8) Способ, любой из (G3-1)-(G3-7), где раком является перитонеально диссеминированный рак,

(G3-9) Способ, любой из (G3-1)-(G3-8), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент вводят отдельно или последовательно,

(G3-10) Способ, любой из (G3-1)-(G3-9), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента,

(G3-11) Способ, любой из (G3-1)-(G3-10), где по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент представляет собой агент, который повышает экспрессию CLDN6, и

(G3-12) Способ, любой из (G3-1)-(G3-11), где по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент представляет собой агент, который повышает экспрессию TGF β 1 в опухолевой клетке.

(H-1) Способ индукции повреждения раковой клетки или включающей раковые клетки опухолевой ткани, или способ супрессии пролиферации раковой клетки или роста включающей раковые клетки опухолевой ткани, при контактировании раковой клетки с мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулой или по меньшей мере с одним другим противоопухолевым агентом, где

мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(H-2) Способ оценки способности мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента индуцировать повреждение раковой клетки или включающей раковые клетки опухолевой ткани, или индуцировать супрессию пролиферации раковой клетки или роста включающей раковые клетки опухолевой ткани, при контактировании раковой клетки с мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулой или по меньшей мере с одним другим противоопухолевым агентом,

5
10 где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(H-3) Способ (H-1) или (H-2), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу любую из (A-2)-(A-39),

(H-4) Способ любой из (H-1)-(H-3), где раковая клетка представляет собой CLDN6-положительную раковую клетку,

(H-5) Способ, любой из (H-1)-(H-4), где раковая клетка представляет собой клетку, выбранную по меньшей мере из одного рака, выбранного из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

(H-6) Способ, любой из (H-1)-(H-5), где раковая клетка выбрана из перитонеально диссеминированного рака,

(H-7) Способ, любой из (H-1)-(H-11), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент по меньшей мере один выбран из группы, состоящей из химиотерапевтического агента, ингибитора иммунных контрольных точек и ингибитора PARP,

30 (H-8) Способ, любой из (H-1)-(H-7), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который повышает экспрессию CLDN6 в клетке,

(H-9) Способ, любой из (H-1)-(H-8), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β в клетке,

5 (H-10) Способ, любой из (H-1)-(H-9), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β 1 в клетке,

(H-11) Способ, любой из (H-7)-(H-10), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой препарат платины, алкалоид или антиметаболит,

10 (H-12) Способ, любой из (H-7)-(H-11), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой препарат платины,

(H-13) Способ, любой из (H-7)-(H-11), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой алкалоид,

15 (H-14) Способ, любой из (H-7)-(H-11), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой ингибитор топоизомеразы,

(H-15) Способ, любой из (H-7)-(H-11), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антиметаболит,

(H-16) Способ, любой из (H-7)-(H-11), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой карбоплатин или цисплатин,

20 (H-16) Способ, любой из (H-7)-(H-11), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой иринотекан,

(H-17) Способ, любой из (H-7)-(H-11), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой гемцитабин,

25 (H-18) Способ (H-11), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антитело анти-PD-L1,

(H-19) Способ (H-11), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой олапариб.

(I-1) Набор, включающий следующие объекты:

30 (A) фармацевтическая композиция, включающая мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который проявляет связывающую активность в отношении клаудина 6 (CLDN6),

(B) контейнер, и

(В) инструкция или этикетка, на которых указано, что мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один тип по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента вводят в комбинации индивидууму для лечения или предотвращения рака у индивидуума,

5 (I-2) Набор, включающий

(А) по меньшей мере один другой противоопухолевый агент,

(Б) контейнер и

(В) инструкцию или этикетку, на которых указано, что по меньшей мере один другой противоопухолевый агент и фармацевтическую композицию,

10 которая включает мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который проявляет связывающую активность в отношении клаудина 6 (CLDN6), вводят в комбинации индивидууму для лечения
15 или предотвращения рака у индивидуума,

(I-3) Набор (I-1) или (I-2), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу или по меньшей мере один другой противоопухолевый агент засыпают в контейнер,

(I-4) Набор, включающий

20 (А) фармацевтическую композицию, которая включает

мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который проявляет связывающую активность в отношении клаудина 6
25 (CLDN6),

(Б) контейнер и

(В) по меньшей мере один противоопухолевый агент,

(I-5) Набор (I-4), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один другой противоопухолевый агент засыпают в единый
30 контейнер или в отдельные контейнеры, соответственно,

(I-6) Набор любой из (I-1)-(I-5), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу любую из (A-2)-(A-39),

(I-7) Набор любой из (I-1)-(I-6), где исследуемый рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

5 (I-8) Набор, любой из (I-1)-(I-7), где исследуемым раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

(I-9) Набор, любой из (I-1)-(I-8), где рак представляет собой рак, метастазирующий до брюшины,

10 (I-10) Набор, любой из (I-1)-(I-9), где раком является перитонеально диссеминированный рак,

(I-11) Набор, любой из (I-1)-(I-10), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один другой противоопухолевый агент вводят отдельно или последовательно,

15 (I-12) Набор, любой из (I-1)-(I-11), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента,

(I-13) Набор, любой из (I-1)-(I-12), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент по меньшей мере один выбран из группы, состоящей
20 из химиотерапевтического агента, ингибитора иммунных контрольных точек и ингибитора PARP,

(I-14) Набор, любой из (I-1)-(I-13), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который повышает экспрессию CLDN6 в клетке,

25 (I-15) Набор, любой из (I-1)-(I-14), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β в клетке,

(I-16) Набор, любой из (I-1)-(I-15), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой агент, который индуцирует
30 экспрессию TGF β 1 в клетке,

(I-17) Набор, любой из (I-1)-(I-16), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой препарат платины, алкалоид или антиметаболит,

(I-18) Набор, любой из (I-1)-(I-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой препарат платины,

(I-19) Набор, любой из (I-1)-(I-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой алкалоид,

5 (I-20) Набор, любой из (I-1)-(I-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой ингибитор топоизомеразы,

(I-21) Набор, любой из (I-1)-(I-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антиметаболит,

10 (I-22) Набор, любой из (I-1)-(I-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой карбоплатин или цисплатин,

(I-22) Набор, любой из (I-1)-(I-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой иринотекан,

(I-23) Набор, любой из (I-1)-(I-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой гемцитабин,

15 (I-24) Набор, любой из (I-1)-(I-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антитело анти-PD-L1, и

(I-25) Набор, любой из (I-1)-(I-17), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой олапариб.

(I2-1) Набор, включающий

20 (А) по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент,

(Б) контейнер и

(В) инструкцию или этикетку, на которых указано, что по меньшей мере один противоопухолевый агент и фармацевтическую композицию, которая включает мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая
25 включает первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который проявляет связывающую активность в отношении клаудина 6 (CLDN6), вводят в комбинации индивидууму для лечения или предотвращения рака у индивидуума,

30 (I2-2) Набор (I2-1), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу или по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент засыпают в контейнер,

(I2-3) Набор, включающий

- (A) фармацевтическую композицию, которая включает мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает связывающей активностью в отношении клаудина 6 (CLDN6),
- (B) контейнер и
- (B) по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент,
- (I2-4) Набор (I2-3), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу или по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент засыпают в единый контейнер или в отдельные контейнеры, соответственно,
- (I2-5) Набор, любой из (I2-1)-(I2-4), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой любую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу из (A-2)-(A-39),
- (I2-6) Набор, любой из (I2-1)-(I2-5), где исследуемый рак представляет собой CLDN6-положительный рак,
- (I2-7) Набор, любой из (I2-1)-(I2-6), где исследуемым раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,
- (I2-8) Набор, любой из (I2-1)-(I2-7), где рак представляет собой рак, метастазирующий до брюшины,
- (I2-9) Набор, любой из (I2-1)-(I2-8), где раком является перитонеально диссеминированный рак,
- (I2-10) Способ, любой из (I2-1)-(I2-9), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент вводят отдельно или последовательно,
- (I2-11) Способ, любой из (I2-1)-(I2-10), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента,
- (I2-12) Способ, любой из (I2-1)-(I2-11), где по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент представляет собой агент, который повышает экспрессию CLDN6 в клетке.

(I2-13) Способ, любой из (I2-1)-(I2-12), где по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β в клетке.

5 (I2-14) Способ, любой из (I2-1)-(I2-13), где по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β 1 в клетке.

(I3-1) Набор, включающий

(A) по меньшей мере один индуцирующий экспрессию CLDN6 агент,

(Б) контейнер и

10 (В) инструкцию или этикетку, на которых указано, что по меньшей мере один противоопухолевый агент и фармацевтическую композицию, которая включает мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и второй
15 антигенсвязывающий фрагмент, который проявляет связывающую активность в отношении клаудина 6 (CLDN6), вводят в комбинации индивидууму для лечения или предотвращения рака у индивидуума,

(I3-2) Набор (I3-1), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу или по меньшей мере один индуцирующий экспрессию CLDN6 агент
20 засыпают в контейнер,

(I3-3) Набор, включающий:

(A) фармацевтическую композицию, которая включает мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137,
25 и который связывается либо с CD3 или с CD137, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который проявляет связывающую активность в отношении клаудина 6 (CLDN6),

(Б) контейнер и

(В) по меньшей мере один индуцирующий экспрессию CLDN6 агент,

30 (I3-4) Набор (I3-3), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один индуцирующий экспрессию CLDN6 агент засыпают в единый контейнер или в отдельные контейнеры, соответственно,

(I3-5) Набор любой из (I3-1)-(I3-4), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу любую из (A-2)-(A-39),

5 (I3-6) Способ любой из (I3-1)-(I3-5), где исследуемый рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

(I3-7) Набор, любой из (I3-1)-(I3-6), где исследуемым раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную
10 тератоидно-рабдоидную опухоль,

(I3-8) Набор, любой из (I3-1)-(I3-7), где рак представляет собой рак, метастазирующий до брюшины,

(I3-9) Набор, любой из (I3-1)-(I3-8), где раком является перитонеально диссеминированный рак,

15 (I3-10) Способ, любой из (I3-1)-(I3-9), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один индуцирующий экспрессию CLDN6 агент вводят отдельно или последовательно.

(I3-11) Способ, любой из (I3-1)-(I3-10), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения
20 по меньшей мере одного индуцирующего экспрессию CLDN6 агента,

(I3-12) Способ, любой из (I3-1)-(I3-11), где по меньшей мере один индуцирующий экспрессию CLDN6 агент представляет собой агент, который повышает экспрессию CLDN6 в клетке,

25 (I3-13) Способ, любой из (I3-1)-(I3-12), где по меньшей мере один индуцирующий экспрессию CLDN6 агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β в клетке, и

(I3-14) Способ, любой из (I3-1)-(I3-13), где по меньшей мере один индуцирующий экспрессию CLDN6 агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β 1 в клетке.

30 (J-1) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула для применения при лечении рака, где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и

(ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который проявляет связывающую активность в отношении клаудина 6 (CLDN6),

(J-2) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула (J-1), которая представляет собой мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу любую из (A-2)-(A-39),

(J-3) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула любая из (J-1) или (J-2), которую используют при лечении рака в комбинации по меньшей с одним агентом, выбранным из группы, включающей другой противоопухолевый агент, индуцирующий TGF β агент и индуцирующий экспрессию CLDN6 агент,

(J-4) Комбинация мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей одного агента, выбранного из группы, включающей другой противоопухолевый агент, индуцирующий TGF β агент и индуцирующий экспрессию CLDN6 агент,

где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который проявляет связывающую активность в отношении клаудина 6 (CLDN6),

(J-5) Комбинация (J-4), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу любую из (A-2)-(A-39),

(J-6) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-3)-(J-5), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один агент вводят отдельно или последовательно,

(J-7) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация (J-6), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения по меньшей мере одного агента,

(J-8) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-3)-(J-7), где по меньшей мере один агент представляет собой по меньшей мере один агент, выбранный из группы, состоящей из химиотерапевтического агента, ингибитора иммунных контрольных точек и ингибитора PARP,

(J-9) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-3)-(J-8), где по меньшей мере один агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию CLDN6 в клетке,

5 (J-10) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-3)-(J-9), где по меньшей мере один агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β в опухолевой клетке,

(J-11) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-3)-(J-10), где по меньшей мере один агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β 1 в опухолевой клетке,

10 (J-12) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-8)-(J-11), где по меньшей мере один агент представляет собой препарат платины, алкалоид или антиметаболит,

(J-13) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-8)-(J-12), где по меньшей мере один агент представляет собой препарат платины,

15 (J-14) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-8)-(J-12), где по меньшей мере один агент представляет собой алкалоид,

(J-15) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация 20 любая из (J-8)-(J-12), где по меньшей мере один агент представляет собой ингибитор топоизомеразы,

(J-16) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-8)-(J-12), где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой антиметаболит,

25 (J-17) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-8)-(J-12), где по меньшей мере один агент представляет собой карбоплатин или цисплатин,

(J-18) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-8)-(J-12), где по меньшей мере один агент представляет собой 30 иринотекан,

(J-19) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-8)-(J-12), где по меньшей мере один агент представляет собой гемцитабин,

(J-20) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация (J-8), где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой антитело анти-PD-L1,

5 (J-21) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация (J-8), где по меньшей мере один агент представляет собой олапариб,

(J-22) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-1)-(J-21), где рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

10 (J-23) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-1)-(J-22), где исследуемым раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

15 (J-24) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-1)-(J-23), где рак представляет собой рак, метастазирующий до брюшины,

(J-25) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-1)-(J-24), где раком является перитонеально диссеминированный рак,

20 (J-26) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-1)-(J-25), которая предназначена для лечения пациентов с диагнозом рака, которые не поддаются лечению ингибитором иммунных контрольных точек,

25 (J-27) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-1)-(J-26), причем рак представляет собой рак, который предварительно лечили другим противоопухолевым агентом, или противоопухолевым агентом, который отличается от другого противоопухолевого агента, и

30 (J-28) Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или комбинация любая из (J-1)-(J-27), причем рак представляет собой рак, при лечении которого нельзя получить требуемое действие при введении только одного другого противоопухолевого агента.

(K-1) Применение мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы для получения лекарственного препарата, предназначенного для лечения рака,

причем мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который проявляет связывающую активность в отношении клаудина 6 (CLDN6),

(К-2) Применение (К-1), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу любую из (А-2)-(А-39),

(К-3) Применение по любому из пунктов (К-1) или (К-2), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу используют в комбинации по меньшей мере с одним агентом, выбранным из группы, включающей другой противоопухолевый агент, индуцирующий TGF β агент и индуцирующий экспрессию CLDN6 агента,

(К-4) Применение комбинации мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного агента, выбранного из группы, включающей другой противоопухолевый агент, индуцирующий экспрессию TGF β агент и индуцирующий экспрессию CLDN6 агент, для получения лекарственного препарата для лечения рака,

причем мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который проявляет связывающую активность в отношении клаудина 6 (CLDN6),

(К-5) Применение по п. (К-4), где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу любую из (А-2)-(А-39),

(К-6) Применение по п. (К-4) или п. (К-5), где лекарственный препарат представляет собой комбинированный препарат, содержащий мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один агент,

(К-7) Применение по любому из пунктов (К-3)-(К-5), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один агент вводят отдельно или последовательно,

(К-8) Применение по п. (К-7), где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения по меньшей мере одного агента,

5 (К-9) Применение по любому из пунктов (К-3)-(К-8), где по меньшей мере один агент выбран из группы, состоящей из химиотерапевтического агента, ингибитора иммунных контрольных точек и ингибитора PARP,

(К-10) Применение по любому из пунктов (К-3)-(К-9), где по меньшей мере один агент представляет собой агент, который повышает экспрессию CLDN6 в клетке,

10 (К-11) Применение по любому из пунктов (К-3)-(К-10), где по меньшей мере один другой агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β в опухолевой клетке,

(К-12) Применение по любому из пунктов (К-3)-(К-11), где по меньшей мере один агент представляет собой агент, который индуцирует экспрессию TGF β 1 в опухолевой клетке,

15 (К-13) Применение по любому из пунктов (К-9)-(К-12), где по меньшей мере один агент представляет собой препарат платины, алкалоид или антиметаболит,

(К-14) Применение по любому из пунктов (К-9)-(К-13), где по меньшей мере один агент представляет собой препарат платины,

20 (К-15) Применение по любому из пунктов (К-9)-(К-13), где по меньшей мере один другой агент представляет собой алкалоид,

(К-16) Применение по любому из пунктов (К-9)-(К-13), где по меньшей мере один другой агент представляет собой ингибитор топоизомеразы,

25 (К-17) Применение по любому из пунктов (К-9)-(К-13), где по меньшей мере один агент представляет собой антиметаболит,

(К-18) Применение по любому из пунктов (К-9)-(К-13), где по меньшей мере один агент представляет собой карбоплатин или цисплатин,

30 (К-19) Применение по любому из пунктов (К-9)-(К-13), где по меньшей мере один агент представляет собой иринотекан,

(К-20) Применение по любому из пунктов (К-9)-(К-13), где по меньшей мере один агент представляет собой гемцитабин,

(К-21) Применение по п. (К-9), где по меньшей мере один агент представляет собой антитело анти-PD-L1,

(К-22) Применение по п. (К-9), где по меньшей мере один агент представляет собой олапариб,

(К-23) Применение по любому из пунктов (К-1)-(К-22), где рак представляет собой CLDN6-положительный рак,

5 (К-24) Применение по любому из пунктов (К-1)-(К-23), где раком является любой рак, выбранный из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль,

10 (К-25) Применение по любому из пунктов (К-1)-(К-24), где рак представляет собой рак, метастазирующий до брюшины,

(К-26) Применение по любому из пунктов (К-1)-(К-25), где раком является перитонеально диссеминированный рак,

15 (К-27) Применение по любому из пунктов (К-1)-(К-26), предназначенное для лечения пациентов с диагнозом рака, который не поддается лечению с использованием ингибитора иммунных контрольных точек,

(К-28) Применение по любому из пунктов (К-1)-(К-27), где раком является рак, который предварительно лечили по меньшей мере другим противоопухолевым агентом или противоопухолевым агентом, который
20 отличается по меньшей мере от одного другого противоопухолевого агента, и

(К-29) Применение по любому из пунктов (К-1)-(К-28), где рак представляет собой рак, при лечении которого нельзя получить требуемое действие при введении по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента.

25 Краткое описание фигур

На фиг 1 представлен график сравнения экспрессии CLDN6 в различных опухолевых тканях с использованием данных из атласа ракового генома (TCGA, the Cancer Genome Atlas).

30 На фиг. 2 представлен эпитоп H0868L0581 контактной области Fab на CD137. Картирование эпитопа в аминокислотной последовательности CD137 (черный цвет: ближе 3,0 ангстрем, полосы: ближе 4,5 ангстрем от H0868L0581).

На фиг. 3 представлен эпитоп H0868L0581 контактной области Fab H0868L0581 на CD137. Картирование эпитопа в кристаллической структуре

CD137 (темно-серые сферы: ближе 3,0 ангстрем, светло-серые стержни: ближе 4,5 ангстрем от H0868L0581).

На фиг. 4 представлены различные форматы антител. Аннотация каждой области Fv для таблицы 4 и правила наименования для таблицы 4, таблицы 5 и
5 таблицы 6. Диаграмма, изображающая (а) 1+1 биспецифичные антитела, полученная с использованием FAST-Ig; (б) Биспецифичные антитела 1+1, полученные с использованием технологии CrossMab.

На фиг. 5 представлена связывающая активность биспецифичных антител anti-CLDN6/CD3 (CS2961 и 6PHU3/TR01) в отношении семейства белков
10 человека CLDN (CLDN3, CLDN4, CLDN6 и CLDN9). Связывающую активность биспецифичных антител anti-CLDN6/CD3 в отношении BaF3 трансфектантов (hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF и hCLDN9/BaF) оценивали на проточном цитометре при концентрации 15 мкг/мл, и строили гистограмму. В качестве отрицательного контроля использовали KLH/TR01.

15 На фиг. 6 представлены результаты оценки Т-клеточно-зависимой цитотоксичности с использованием анализа LDH.

На фиг. 7 представлено выравнивание аминокислотных последовательностей CLDN9 человека и CLDN6 человека. CLDN9 человека и
20 CLDN6 человека включают практически одинаковые последовательности во внеклеточном домене 1, за исключением N-концевого остатка (Met/Leu в положении 29). CLDN9 человека и CLDN6 человека отличаются двумя аминокислотными остатками во внеклеточном домене 2 (Arg/Leu в положении 145 и Gln/Leu в положении 156).

На фиг. 8 представлены результаты оценки Т-клеточно-зависимой
25 цитотоксичности антитела (PPU4135) в отношении различных линий опухолевых клеток (NUGC-3, PA-1, SNG-M, NEC8, NEC14, CHLA-02-ATRT, HT-1197 и OUMS-23) по данным анализа LDH.

На фиг. 9 представлены результаты анализа блокировки клеточного роста в реальное время антител CS3348, PPU4135 и PPU4136) в отношении различных
30 линий опухолевых клеток по данным анализа xCELLigence.

На фиг. 10 представлены результаты Т-клеточной активации при связывании CD3 с антителами (CS3348, PPU4135, PPU4136, PPU4137 и PPU4138), в ходе совместного культивирования с CLDN6-экспрессирующими клеточными линиями человека (OVCAR3 и NCI-H1435) и CLDN6 отрицательной

клеточной линией (5637). KLN/TR01 использовали в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 11 представлены результаты NF каппа В активации в ходе CD137 связывания с антителами (CS3348, PPU4134, PPU4135, PPU4136, PPU4137 и PPU4138), в ходе совместного культивирования с CLDN6-экспрессирующими клетки человека линиями (OVCAR3 и NCI-H1435) и CLDN6 отрицательной клеточной линией (5637). KLN/TR01 использовали в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 12 представлена противоопухолевая эффективность антител CS3348, PPU4134, PPU4135, PPU4136, PPU4137 и PPU4138) в дозе 1 мг/кг с использованием мышинной модели NCI-H1435/HuNOG.

На фиг. 13 представлена противоопухолевая эффективность антител (CS3348 и PPU4135) *in vivo* в дозах 0,05 мг/кг и 0,2 мг/кг с использованием мышинной модели OV-90/HuNOG.

На фиг. 14 представлены изменения уровней AST, ALT, GLDH (ферменты печени), ALP, TBIL, GGT, TBA (параметры повреждения печени и желчновыводящих путей), и CRP (воспалительный маркер), опосредованные введением CS3348 или PPU4135.

На фиг. 15 представлена выживаемость на модели диссеминарования брюшины у мышей после введения антитела CLDN6/Dual-Fab.

На фиг. 16 представлено изменение уровня экспрессии CLDN6 после обработки различных опухолевых линий клеток (клеточная линия рака яичников человека (NIH-OVCAR3), клеточная линия рака легких человека (NCI-H1435) и клеточная линия рака эндометрия человека (SNG-M)) химиотерапевтическим агентом цисплатином (CDDP) или карбоплатином (CBDCA).

На фиг. 17 представлена оценка изменения способности к Т-клеточной активации антитела CS4135 в ходе CD3 связывания после обработки химиотерапевтическим агентом (цисплатином CDDP) или карбоплатином (CBDCA)) с использованием системы анализа люциферазы, при котором используют ответ клеток Юркат (GloResponse NFAT-luc2 Jurkat cells).

На фиг. 18 представлено исследование относительного уровня экспрессии CLDN6 после введения карбоплатина мышам с трансплантированной опухолью SNG-M, который исследовали методом ПЦР в реальном времени с использованием системы GAPDH в качестве внутреннего контроля.

На фиг. 19 представлено изменение объема опухоли после введения
единого агента, антитела CS4135, единого введения карбоплатина и
комбинированного введения антитела CS4135 и карбоплатина на модели
ксенотрансплантата мышей NOG(huNOG), трансплантированных клеточной
5 линией опухолевых клеток рака матки SNG-M человека и CD34-
положительными клетками человека.

На фиг. 20 представлено изменение объема опухоли после введения
единого агента, антитела CS4135, единого введения карбоплатина и
комбинированного (одновременного) введения антитела CS4135 и карбоплатина
10 на модели ксенотрансплантата мышей NOG(huNOG), трансплантированных
клеточной линией опухолевых клеток рака яичника OVCAR3 человека и CD34-
положительными клетками человека.

На фиг. 21 представлено изменение объема опухоли после введения
единого агента, антитела CS4135, введения единого агента карбоплатина, и
15 введения карбоплатина с последующим введением антитела CS4135 на
модели ксенотрансплантата мышей NOG(huNOG), трансплантированных
клеточной линией опухолевых клеток рака яичника человека OVCAR3 и CD34-
положительными клетками человека.

На фиг. 22 представлено изменение объема опухоли после введения
20 единого агента, антитела CS4135, единого введения гидрохлорида иринотекана и
совместного введения антитела CS4135 и гидрохлорида иринотекана на модели
ксенотрансплантата мышей NOG(huNOG), трансплантированных клеточной
линией опухолевых клеток рака яичника OVCAR3 и CD34-положительными
клетками человека.

25 На фиг. 23 представлено изменение объема опухоли после введения
единого агента, антитела CS4135, мышам hCD137 KI/hCD3Tg,
трансплантированных клеточной линией опухолевых клеток рака легкого LLC1
человека, вынужденных экспрессировать клаудин 6 (CLDN6).

На фиг. 24 представлен результат введения антитела CS4135 мышам
30 hCD137 KI/hCD3Tg, трансплантированным клеточной линией опухолевых
клеток рака легкого LLC1, вынужденных экспрессировать клаудин 6 (CLDN6), и
последующего анализа числа CD8-положительных Т клеток в опухолевой ткани
по данным проточной цитометрии (FCM).

На фиг. 25 представлено изменение объема опухоли после введения
единого агента, антитела CS4135, введения единого агента, антимышиного
антитела PD-L1 и комбинированного введения антитела CS4135 и
антимышиного антитела PD-L1 мышам hCD137 KI/hCD3Tg,
5 трансплантированным клеточной линией опухолевых клеток рака легкого LLC1,
вынужденных экспрессировать клаудин 6 (CLDN6).

На фиг. 26 представлено изменение уровня экспрессии CLDN6 в
дефицитной линии по BRCA1 опухолевых клеток рака яичников человека
UWB1.289 или BRAC1 опухолевых клеток рака яичников дикого типа OV-90
10 (ATCC) после обработки ингибитором PARP (олапариб), которая была
исследована методом FACS анализа.

На фиг. 27 представлена активность цитотоксичности антитела CS4135 в
экспрессирующей CLDN6 дефицитной линии по BRCA1 опухолевых клеток рака
яичников человека UWB1.289 или BRAC1 опухолевых клеток рака яичников
15 дикого типа OV-90, в которую добавляли ингибитор PARP (олапариб), и
которую оценивали методом анализа на основе высвобождения лактат
дегидрогеназы (LDH) с использованием клеток человека PBMC человека в
качестве эффекторной клетки.

На фиг. 28 представлен анализ активности цитотоксичности антитела
20 CS4135 в присутствии или отсутствии биспецифичного антитела KLH/CD137 с
использованием анализа в реальное время блокировки роста клеток (анализ
xCELLigence). Линию клеток рака толстой кишки мыши MC38/CLDN6,
экспрессирующую CLDN6 человека, использовали в качестве клеток-мишеней, а
Т-клетки, полученные от трансгенных мышей hCD3 или мышей с нокаутом
25 hCD3/hCD137, использовали в качестве эффекторных клеток.

На фиг. 29 представлены результаты измерения уровня экспрессии CLDN6
с помощью количественной ПЦР в клеточной линии рака яичника человека
(NIH:OVCAR-3), обработанной карбоплатином, цисплатином, иринотеканом или
гемцитабином, и по сравнению с уровнем экспрессии CLDN6 в необработанных
30 клетках.

На фиг. 30 представлены результаты измерения уровня экспрессии TGF- β 1
с помощью количественной ПЦР в клеточной линии рака яичника человека
(NIH:OVCAR-3), обработанной карбоплатином, цисплатином, иринотеканом или

гемцитабином, и сравнение их с уровнем экспрессии TGF-β1 в необработанных клетках.

На фиг. 31 представлены результаты измерения уровня экспрессии CLDN6 с помощью количественной ПЦР в клеточной линии рака яичника человека (NIH:OVCAR-3), стимулированной TGF-β1, по сравнению этого результата с уровнем экспрессии CLDN6 в необработанных клетках.

На рис. 32 показаны результаты анализа уровня экспрессии CLDN6 с помощью анализа FACS в различных типах линий клеток рака яичников (NIH:OVCAR-3, COV362, COV413A и COV413B), стимулированных TGF-β1, по сравнению с уровнем экспрессии CLDN6 в нестимулированных клетках.

Описание вариантов осуществления настоящего изобретения

Методики и процедуры, описанные или цитированные в данном контексте, в основном представляются очевидными специалистам в данной области техники и обычно применяются ими с использованием общепринятых методологий, таких как, например, широко используемые методологии, описанные в статьях: Sambrook и др., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, и др. ред., (2003)); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor ред. (1995)), Harlow and Lane, ред. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ред. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ред., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ред., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney), ред., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, ред., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, ред.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, ред., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis и др., ред., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan и др., ред., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ред., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, ред.,

Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, ред., Harwood Academic Publishers, 1995); и Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita и др., ред., J.B. Lippincott Company, 1993).

Ниже представлены определения и подробное описание для облегчения понимания настоящего изобретения, проиллюстрированного в данном контексте.

Определения

Аминокислоты

В данном контексте аминокислоты описываются с использованием одно- или трехбуквенного кода или обоих кодов, например, Ala/A, Leu/L, Arg/R, Lys/K, Asn/N, Met/M, Asp/D, Phe/ F, Cys/C, Pro/P, Gln/Q, Ser/S, Glu/E, Thr/T, Gly/G, Trp/W, His/H, Tyr/Y, Ile/I или Val/V.

Изменение аминокислот

Для изменения аминокислот (также описанного в данном контексте как «аминокислотная замена» или «аминокислотная мутация») в аминокислотной последовательности антигенсвязывающей молекулы можно соответствующим образом использовать известные методы, такие как методы сайт-направленного мутагенеза (Kunkel и др. (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82, 488-492 (1985)) и ПЦР с перекрывающимся удлинением. Кроме того, несколько известных способов также можно использовать в качестве способов замены аминокислот на неприродные аминокислоты (Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35, 225-249 (2006); и Proc. Natl. Acad. Sci. США 100 (11), 6353-6357 (2003)).

Например, можно использовать бесклеточную систему трансляции (Clover Direct (Protein Express)), содержащую тРНК, которая содержит неприродную аминокислоту, связанную с комплементарной янтарной супрессорной тРНК одного из стоп-кодонов, кодона UAG (янтась кодон).

В настоящем описании значение термина «и/или» при описании места изменения аминокислоты включает каждую комбинацию, в которой «и» и «или» комбинируются пригодным образом. В частности, например, термин «аминокислоты в положениях 33, 55 и/или 96 заменены» включает в себя следующие варианты аминокислотных изменений: аминокислота(ы) в (a) положении 33, (b) положении 55, (c) положении 96, (d) положениях 33 и 55, (e) положениях 33 и 96, (f) положениях 55 и 96 и (g) положениях 33, 55 и 96.

Кроме того, в данном контексте в качестве выражения, указывающего на изменение аминокислот, можно соответствующим образом использовать выражение, в котором указаны число до и после конкретного положения, аминокислоты в однобуквенном или трехбуквенном коде до и после изменения, соответственно. Например, изменение N100bL или Asn100bLeu, используемое при замене аминокислоты, содержащейся в вариабельной области антитела, указывает на замену Asn в положении 100b (согласно нумерации Кабата) на Leu. То есть число указывает на положение аминокислоты в соответствии с нумерацией Кабата, однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты, написанный перед числом, показывает аминокислоту до замены, а однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты код, написанный после числа, показывает аминокислоту после замены. Аналогичным образом, изменение R238D или Pro238Asp, используемое при замене аминокислоты в области Fc, содержащейся в консервативной области антитела, указывает на замену Pro в положении 238 (согласно нумерации EU) на Asp. То есть число указывает на положение аминокислоты в соответствии с нумерацией ЕС, однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты, написанный перед числом, указывает аминокислоту до замены, а однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты, написанный после числа, указывает аминокислоту после замены.

Полипептиды

Используемый в данном контексте термин «полипептид» относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин «полипептид» относится к любой цепи из двух или более аминокислот и не относится к продукту определенной длины. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, «белок», «аминокислотная цепь» или любой другой термин, используемый для обозначения цепи из двух или более аминокислот, включены в определение «полипептид», а термин «полипептид» может использоваться вместо любого из этих терминов или взаимозаменяемо с ним. Термин «полипептид» также предназначен для обозначения продуктов постэкспрессионных модификаций полипептида, включая, но не ограничиваясь перечисленным, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, модификацию известными защитными/блокирующими группами,

протеолитическое расщепление или модификацию неприродными аминокислотами. Полипептид можно получить из природного биологического источника или получить с помощью технологии рекомбинантных ДНК, но он не обязательно транслируется с определенной последовательности нуклеиновой кислоты. Его можно получить любым способом, в том числе с использованием химического синтеза. Размер полипептида, описанного в настоящем документе, может составлять приблизительно 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 25 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 200 или более, 500 или более, 1000 или более или 2000 или более аминокислот. Полипептиды могут характеризоваться определенной трехмерной структурой, хотя они не обязательно характеризуются такой структурой. Полипептиды с определенной трехмерной структурой называются свернутыми, а полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой, а могут принимать большое количество различных конформаций, называются развернутыми.

15 Идентичность аминокислотных последовательностей в процентах (%)

«Идентичность аминокислотных последовательностей в процентах (%)» по отношению к эталонной полипептидной последовательности определяется как процент аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и при необходимости введения пробелов, для достижения максимального процента идентичности последовательностей и не рассматривая какие-либо консервативные замены как часть идентичности последовательности.

Выравнивание с целью определения идентичности аминокислотных последовательностей в процентах можно достигать различными способами, доступными специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программные обеспечения BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить пригодные параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей настоящего изобретения значения % идентичности аминокислотных последовательностей получали с использованием компьютерной программы сравнения последовательностей

ALIGN-2. Компьютерная программа сравнения последовательностей ALIGN-2 была разработана фирмой Genentech, Inc., а исходный код был предоставлен вместе с пользовательской документацией в Бюро регистрации авторских прав США, Вашингтон, DC Колумбия, 20559, где он зарегистрирован под регистрационным номером авторских прав США TXU510087. Программа ALIGN-2 общедоступна от фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, Калифорния, или ее можно скомпилировать из исходного кода. Программу ALIGN-2 следует скомпилировать для использования в операционной системе UNIX, включая цифровую UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей задаются программой ALIGN-2 и не изменяются. Все параметры сравнения последовательностей задаются программой ALIGN-2 и не изменяются. В случаях, когда ALIGN-2 используется для сравнения аминокислотных последовательностей, идентичность аминокислотной последовательности в процентах данной аминокислотной последовательности А в отношении, по сравнению с ней или в отличии от данной аминокислотной последовательности В (которую в другом варианте можно назвать как данная аминокислотная последовательность А, которая характеризуется или содержит определенную идентичную аминокислотную последовательности в отношении, по сравнению или в отличии от данной аминокислотной последовательности В), рассчитывают следующим образом:

$$100 \times X/Y$$

где X означает число аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения с помощью программы выравнивания последовательностей ALIGN-2 при выравнивании в этой программе А и В, и где Y представляет собой общее число аминокислотных остатков в В. Следует понимать, что если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, % идентичности аминокислотных последовательностей от А до В не будет равен % идентичности аминокислотных последовательностей от В до А. Если специально не указано иное, все процентные значения идентичности аминокислотной последовательности, используемые в данном контексте, получают, как описано выше в предыдущем абзаце, с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

Методы рекомбинантных ДНК и композиции

Антитела и антигенсвязывающие молекулы можно получить с использованием методов рекомбинантных ДНК и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. В одном варианте осуществления настоящего изобретения представлена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, как описано в данном контексте. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). В другом варианте представлены один или более векторов (например, экспрессионные векторы), включающие такие нуклеиновые кислоты. В еще одном варианте предлагается клетка-хозяина, например, трансформированная следующим вектором): (1) вектор, включающий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, включающую VL антитела и аминокислотную последовательность, включающую VH антитела, или (2) первый вектор, включающий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, включающую VL антитела, и второй вектор, включающий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, включающую VH антитела. В одном варианте клетка-хозяина представляет собой эукариотическую клетку, например, клетку яичника китайского хомячка (СНО) или лимфоидную клетку (например, клетку Y0, NS0, Sp2/0). В другом варианте осуществления предлагается способ получения мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, при этом способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, как указано выше, в условиях, пригодных для экспрессии антитела, и необязательно выделение антитела из клетки-хозяина (или культуральной среды клеток-хозяина).

Для получения антитела методом рекомбинантных ДНК, описанного в настоящем документе, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и встраивают в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяина. Такую нуклеиновую кислоту можно простым методом выделить и секвенировать с использованием обычных процедур (например, с использованием

олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Пригодные клетки-хозяина для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем документе. Например, антитела можно
5 продуцировать в бактериях, прежде всего, когда нет необходимости в гликозилировании и эффекторной функции Fc. Способы экспрессии фрагментов и полипептидов в бактериях см., например, в патентах 5648237, 5789199 и 5,840,523. (См. также статью Charlton, *Methods in Molecular Biology*, т. 248
10 (В.К.С. Lo, ред., Humana Press, Totowa, NJ), стр. 245-254 (2003), где описана экспрессия фрагментов антител в *E. coli*). После экспрессии антитело можно выделить из пасты бактериальных клеток в виде растворимой фракции и затем подвергать дальнейшей очистке.

Кроме прокариотических, эукариотические микроорганизмы, такие как
15 мицелиальные грибы или дрожжи, являются пригодными для клонирования или экспрессии клеток хозяина для кодирующих антитело векторов, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы», что приводит к продуцированию антител с частично или полностью человеческим типом гликозилирования. См. Gerngross, *Nat. Biotech.*
20 22:1409-1414 (2004) и Li и др., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Пригодные клетки-хозяина для экспрессии гликозилированного антитела также получают из многоклеточных организмов (беспозвоночных и
позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы,
25 которые можно использовать в сочетании с клетками насекомых, прежде всего, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

В качестве клеток хозяина также можно использовать культуры
растительных клеток. См., например, патенты США № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (в которых описана технология PLANTIBODIES™
30 для продуцирования антител в трансгенных растениях).

В качестве клеток-хозяина также можно использовать клетки позвоночных. Например, могут оказаться пригодными линии клеток млекопитающих, адаптированные к росту в суспензии. Другими примерами пригодных линий клеток-хозяина млекопитающих являются линия CV1 почек обезьяны,

трансформированная SV40 (COS-7); линия эмбриональных почек человека (293 или 293 клетки, как описано, например, в статье Graham и др., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почек детеныша хомячка (ВНК); мышинные клетки Сертоли (клетки TM4, как описано, например, в статье Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почек обезьяны (CV1); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки собачьей почки (MDCK); клетки печени крысы линии buffalo (BRL 3A); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562); TRI-клетки, как описано, например, в статье Mather и др., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другие пригодные линии клеток-хозяина млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO (Urlaub и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор некоторых линий клеток-хозяина млекопитающих, пригодных для продуцирования антител, см., например, в статьях Yazaki и Wu, Methods in Molecular Biology, т. 248 (В.К.С. Ло, изд., Humana Press, Тотова, Нью-Джерси), стр. 255-268 (2003).

Получение рекомбинантной антигенсвязывающей молекулы, описанной в настоящем документе, можно осуществлять способами, аналогичными описанным выше, с использованием клетки-хозяина, содержащей (например, трансформированной с использованием указанных методов) один или несколько векторов, содержащих нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую полноразмерную антигенсвязывающую молекулу или часть антигенсвязывающей молекулы.

25 Антигенсвязывающие молекулы и мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы

Термин «антигенсвязывающая молекула», используемый в настоящем документе, относится к любой молекуле, которая содержит сайт связывания антигена, или к любой молекуле, которая обладает активностью связывания с антигеном, и может дополнительно относиться к таким молекулам, как пептид или белок, длиной около пяти аминокислот или более. Пептид и белок не ограничиваются теми, которые получены из живого организма, и, например, они могут представлять собой полипептид, полученный из искусственно созданной последовательности. Они также могут представлять собой любой полипептид

природного происхождения, синтетический полипептид, рекомбинантный полипептид и т.п. Молекулы каркаса, содержащие известную стабильную конформационную структуру, такую как альфа/бета-цилиндр в качестве каркаса, и в которой часть молекулы превращена в антигенсвязывающий сайт, также являются одним из вариантов антигенсвязывающей молекулы, описанной в настоящем документе.

«Мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы» относятся к антигенсвязывающим молекулам, которые специфически связываются с двумя или более антигенами. «Мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы» включают антитела и фрагменты антител, которые специфически связываются с двумя или более антигенами. Термин «биспецифичный» означает, что антигенсвязывающая молекула способна специфически связываться по меньшей мере с двумя различными типами антигенных детерминант. Термин «триспецифичный» означает, что антигенсвязывающая молекула способна специфически связываться по меньшей мере с тремя различными типами антигенных детерминант.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой триспецифичную антигенсвязывающую молекулу, способную специфически связываться с тремя различными типами антигенов, а именно триспецифичную антигенсвязывающую молекулу, способную связываться с CD3 и CD137, но не связываться с обоими антигенами одновременно и способную специфически связываться с CLDN6.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается противоопухолевый агент, содержащий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая содержит:

- (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и
- (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), предпочтительно с CLDN6 человека.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, предназначенная для применения в комбинации с одним другим противоопухолевым агентом, причем фармацевтическая композиция включает в

качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает следующие фрагменты:

(i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и

5 (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), предпочтительно с CLDN6 человека.

10 Более того, в одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, предназначенная для применения в комбинации по меньшей мере с одним индуцирующим TGF β агентом, где фармацевтическая композиция включает в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает следующие фрагменты:

(i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и

15 (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), предпочтительно с CLDN6 человека.

20 Более того, в другом аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, предназначенная для применения в комбинации по меньшей мере с одним индуцирующим экспрессию CLDN6 агентом, где фармацевтическая композиция включает в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает следующие фрагменты:

(i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и

25 (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), предпочтительно с CLDN6 человека.

30 В одном аспекте настоящего изобретения предлагается противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), и который проявляет более высокую цитотоксическую активность по сравнению со случаем, когда первый антигенсвязывающий фрагмент

представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, который может связываться только с CD3.

Более того, в еще одном аспекте настоящего изобретения предлагается противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента
5 мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), и который проявляет более низкую токсичность по сравнению со
10 случаем, когда первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, который может связываться только с CD3.

Более того, в другом аспекте настоящего изобретения предлагается противоопухолевый агент, включающий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает (1)
15 первый антигенсвязывающий домен, который способен связываться с Т-клеточным рецепторным комплексом и (2) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CLDN6, и который проявляет Т-клеточную цитотоксическую активность, которая эквивалентна или выше по сравнению с мультиспецифичным антителом (CS3348), включающим
20 антигенсвязывающий фрагмент, который может связываться с Т-клеточным рецепторным комплексом, который представляет собой фрагмент, включающий тяжелую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194, и легкую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 192, и антигенсвязывающий фрагмент, который может связываться с
25 CLDN6, который представляет собой фрагмент, включающий тяжелую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193, и легкую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая
30 композиция, которая включает в качестве активного ингредиента по меньшей мере один другой противоопухолевый агент, и предназначенная для применения в комбинации с мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулой, которая включает следующие фрагменты:

(i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и

(ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6).

5 В другом аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, предназначенная для лечения или предотвращения рака, сформированная при комбинировании следующей мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы по меньшей мере с одним другим противоопухолевым агентом:

10 мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, включающая (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6).

15 Более того, в одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, предназначенная для лечения или предотвращения рака, сформированная при комбинировании следующей мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы по меньшей мере с одним индуцирующим TGF β агентом:

20 мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, включающая (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6).

25 Кроме того, в другом аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, предназначенная для лечения или предотвращения рака, сформированная при комбинировании следующей мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы по меньшей мере с одним индуцирующим экспрессию CLDN6 агентом:

30 мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, включающая (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6).

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается комбинация мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), по меньшей мере с одним другим противоопухолевым агентом.

5

Кроме того, в другом аспекте настоящего изобретения предлагается комбинация мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), по меньшей мере с одним индуцирующим TGF β агентом.

10

В еще одном аспекте настоящего изобретения предлагается комбинация мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), по меньшей мере с одним индуцирующим экспрессию CLDN6 агентом.

15

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается способ индукции цитотоксичности, супрессии клеточной пролиферации, блокировки клеточной пролиферации, активации иммунного ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума, включающий введение эффективного количества мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), с эффективным количеством по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента.

20

25

Более того в другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ индукции цитотоксичности, супрессии клеточной пролиферации, блокировки клеточной пролиферации, активации иммунного ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума, при комбинированном применении мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей (i) первый

30

антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), причем указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предлагается способ повышения действия при индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, при блокировке пролиферации клеток, активации иммунного ответа, при лечении рака или предотвращении рака у индивидуума, с использованием мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), причем способ включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента.

Более того, в одном аспекте настоящего изобретения предлагается способ повышения действия при индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировке пролиферации клеток, активации иммунного ответа, при лечении рака или предотвращении рака у индивидуума, с использованием по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента, причем способ включает введение индивидууму эффективного количества мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6).

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается способ индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировки пролиферации клеток, активации иммунного ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума, причем способ включает введение эффективного количества мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6

(CLDN6), с использованием эффективного количества по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента.

5 Более того, в одном аспекте настоящего изобретения предлагается способ индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировки ингибирования пролиферации клеток, активации иммунного ответа, лечения
рака или предотвращения рака у индивидуума при комбинированном
10 применении мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), причем способ включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента.

15 Более того, в другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ повышения действия при индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировке пролиферации клеток, активации иммунного ответа, при лечении рака или предотвращении рака у индивидуума с использованием мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137,
20 и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), причем способ включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного индуцирующего TGF β агента.

25 В одном аспекте настоящего изобретения предлагается способ индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировки пролиферации клеток, активации иммунного ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума, причем способ включает введение индивидууму эффективного количества мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй
30 антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), с использованием эффективного количества по меньшей мере одного индуцирующего экспрессию CLDN6 агента.

Более того, в другом аспекте предлагается способ индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировки пролиферации

клеток, активации иммунного ответа, лечения рака или предотвращения рака у индивидуума при комбинированном применении мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), причем способ включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного индуцирующего экспрессию CLDN6 агента.

В одном аспекте предлагается способ повышения действия при индукции цитотоксичности, супрессии пролиферации клеток, блокировке пролиферации клеток, активации иммунного ответа, при лечении рака или предотвращении рака у индивидуума с использованием мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), причем способ включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного индуцирующего экспрессию CLDN6 агента.

В одном аспекте предлагается способ индукции повреждения раковой клетки или включающей раковые клетки опухолевой ткани, или способ супрессии роста раковой клетки или роста включающей раковые клетки опухолевой ткани, при контактировании раковой клетки с мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулой, включающей

(i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), и по меньшей мере один другой противоопухолевый агент.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ оценки способности мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающей (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6), и по меньшей мере один другой противоопухолевый агент, индуцировать повреждение раковой клетки или включающей раковые клетки

опухолевой ткани, или подавлять рост раковой клетки или рост включающей раковые клетки опухолевой ткани, при контактировании раковой клетки с мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулой и по меньшей мере с одним другим противоопухолевым агентом.

5 В еще одном аспекте настоящего изобретения предлагается набор, включающий:

следующие объекты:

10 (А) фармацевтическая композиция, включающая мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(Б) контейнер, и

15 (В) инструкция или этикетка, на которых указано, что мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один тип по меньшей мере одного противоопухолевого агента вводят в комбинации индивидууму для лечения или предотвращения рака у индивидуума.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается набор, включающий

20 (А) по меньшей мере один противоопухолевый агент,

(Б) контейнер и

25 (В) инструкцию или этикетку, на которых указано, что по меньшей мере один противоопухолевый агент и фармацевтическую композицию, которая включает мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который характеризуется связывающейся активностью в отношении клаудина 6 (CLDN6), вводят в комбинации индивидууму для лечения или предотвращения рака у индивидуума.

30 В другом аспекте настоящего изобретения предлагается набор, включающий

(А) фармацевтическую композицию, которая включает мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и второй антигенсвязывающий

фрагмент, который обладает связывающей активностью в отношении клаудина 6 (CLDN6),

(Б) контейнер и

(В) по меньшей мере один другой противоопухолевый агент.

5 В одном аспекте настоящего изобретения предлагается набор, включающий (А) по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент,

(Б) контейнер и

10 (В) инструкцию или этикетку, на которых указано, что мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один тип по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента вводят в комбинации индивидууму для лечения или предотвращения рака у индивидуума.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается набор, включающий

15 (А) фармацевтическую композицию, которая включает мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который обладает связывающей активностью в отношении клаудина 6 (CLDN6),

20 (Б) контейнер и

(В) по меньшей мере один индуцирующий TGF β агент.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается набор, включающий

25 (А) по меньшей мере один индуцирующий экспрессию CLDN6

(Б) контейнер и

(В) инструкцию или этикетку, на которых указано, что мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один тип по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента вводят в комбинации индивидууму для лечения или предотвращения рака у индивидуума.

30 В другом аспекте настоящего изобретения предлагается набор, включающий:

(А) фармацевтическую композицию, включающую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая включает первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается

либо с CD3 или с CD137, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

(Б) контейнер и

(В) по меньшей мере один индуцирующий экспрессию CLDN6.

5 В одном аспекте настоящего изобретения предлагается мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, предназначенная для применения при лечении рака, которая включает первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и второй антигенсвязывающий фрагмент, который проявляет
10 связывающую активность в отношении клаудина 6 (CLDN6),

В еще одном аспекте настоящего изобретения предлагается комбинация мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и которая связывается либо с CD3 или с CD137, и (ii) второй
15 антигенсвязывающий фрагмент, который обладает связывающей активностью в отношении клаудина 6 (CLDN6), и по меньшей мере одного агента, выбранного из группы, содержащей другой противоопухолевый агент, индуцирующий TGF β и индуцирующий экспрессию CLDN6, для применения при лечении рака.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается применение
20 мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который характеризуется связывающейся активностью в отношении клаудина 6 (CLDN6), при получении лекарственного
25 препарата для лечения рака.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предлагается комбинация мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, которая включает (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 или с CD137, и (ii) второй
30 антигенсвязывающий фрагмент, который обладает связывающей активностью в отношении клаудина 6 (CLDN6), по меньшей мере с одним агентом, выбранным из группы, содержащей другой противоопухолевый агент, индуцирующий TGF β агент и индуцирующий экспрессию CLDN6, при получении лекарственного препарата для лечения рака.

В одном аспекте настоящего изобретения мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащаяся в противоопухолевом агенте, в комбинации или наборе по настоящему изобретению, или использованная в способе или при применении по настоящему изобретению, может дополнительно включать (iii) Fc домен, проявляющий пониженную связывающую аффинность в отношении Fc γ рецептора по сравнению с природным IgG1 Fc доменом человека.

Компоненты мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, содержащиеся в противоопухолевом агенте, в комбинации или наборе по настоящему изобретению, или использованные в способе или при применении, можно соединять друг с другом в различных форматах. Типичные форматы представлены на фиг. 4. В конкретных вариантах осуществления изобретения мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула содержит Fc домен, состоящий из первой субъединицы Fc области и второй субъединицы Fc области, которые способны формировать стабильный ассоциат.

Согласно любому из представленных выше вариантов осуществления, компоненты мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул (например, антигенсвязывающий фрагмент и Fc домен) можно соединять напрямую или через различные линкеры, прежде всего пептидные линкеры, включающие одну или более аминокислот, обычно приблизительно 2-20 аминокислот, которые описаны в данном контексте или известны в данной области техники. Пригодные не-иммуногенные пептидные линкеры представляют собой, например, пептидные линкеры (G4S) n , (SG4) n , (G4S) n или G4(SG4) n , где n в основном означает число от 1 до 10, обычно от 2 до 4.

В одном аспекте мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащаяся в противоопухолевом агенте, в фармацевтической композиции, в комбинации или наборе по настоящему изобретению, или использованная в способе или при применении по настоящему изобретению, включает:

(i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

где первая переменная область антитела первого антигенсвязывающего фрагмента соединена с первой консервативной областью тяжелой цепи, вторая переменная область антитела первого антигенсвязывающего фрагмента

соединена с первой консервативной областью легкой цепи, третья переменная область антитела второго антигенсвязывающего фрагмента соединена со второй консервативной областью тяжелой цепи, и четвертая переменная область антитела второго антигенсвязывающего фрагмента соединена со второй консервативной областью легкой цепи.

В другом аспекте мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащаяся в противоопухолевом агенте, в фармацевтической композиции, в комбинации или наборе по настоящему изобретению, или использованные в способе или при применении по настоящему изобретению, включает:

(i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, и который связывается либо с CD3 либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6),

где первая переменная область антитела первого антигенсвязывающего фрагмента соединена с первой консервативной областью тяжелой цепи, вторая переменная область антитела первого антигенсвязывающего фрагмента соединена с первой консервативной областью легкой цепи, третья переменная область антитела второго антигенсвязывающего фрагмента соединена со второй консервативной областью тяжелой цепи, и четвертая переменная область антитела второго антигенсвязывающего фрагмента соединена со второй консервативной областью легкой цепи, где консервативные области представляют собой любую одну из представленных ниже (g1)-(g7):

(g1) первая консервативная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, первая консервативная область легкой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, вторая консервативная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и вторая консервативная область легкой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88,

(g2) первая консервативная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, первая консервативная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, вторая консервативная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и вторая консервативная область легкой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89.

В одном аспекте мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащаяся в противоопухолевом агенте, в фармацевтической композиции, в комбинации или наборе по настоящему изобретению, или использованная в способе или при применении по настоящему изобретению, может представлять собой мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, включающую четыре полипептидные цепи, где четыре полипептидные цепи представляют собой любую одну из указанных ниже (h01)-(h18):

(h01) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (цепь 4),

(h02) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (цепь 4),

(h03) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (цепь 4),

(h04) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (цепь 3), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (цепь 4),

(h05) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (цепь 2), и тяжелая цепь, включающая

Пироглутаминирование

Известно, что когда антитело экспрессируется в клетках, происходит его модификация после трансляции. Примеры посттрансляционной модификации включают расщепление лизина на С-конце тяжелой цепи карбоксипептидазой; модификация глутамина или глутаминовой кислоты на N-конце тяжелой цепи и легкой цепи с образованием пироглутаминовой кислоты в ходе реакции пироглутамилирования, гликозилирования, окисления, дезамидирования и гликирования, причем известно, что такие посттрансляционные модификации наблюдаются в различных антителах (*Journal of Pharmaceutical Sciences*, V. 97, p. 2426-2447 (2008)).

Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащаяся в противоопухолевом агенте, в фармацевтической композиции, в комбинации или наборе по настоящему изобретению, или использованные в способе или при применении по настоящему изобретению, может включать мультиспецифичное антитело, образующееся после посттрансляционной модификации. Примеры таких мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, которые подвергались посттрансляционной модификации, включают мультиспецифичные антитела, которые подвергались пироглутамилированию по N-концу варибельной области тяжелой цепи и/или делеции остатка лизина на С-конце тяжелой цепи. В данной области техники известно, что такая посттрансляционная модификация после пироглутамилирования по N-концу и делеции лизина на С-конце никоим образом не влияет на активность антитела (*Analytical Biochemistry*, V. 348, p. 24-39 (2006)).

Антигенсвязывающий фрагмент

В настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидной молекуле, которая специфически связывается с антигеном. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент способен направлять объект, к которому он присоединен (например, второй антигенсвязывающий фрагмент), к сайту-мишени, например, к конкретному типу опухолевых клеток, экспрессирующих раковый антиген (CLDN6). В другом варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент способен активировать передачу сигнала через свой антиген-мишень, например, антиген рецепторного комплекса Т-клеток (CD3) или костимулирующую молекулу CD137.

Антигенсвязывающие фрагменты включают антитела и их фрагменты, как дополнительно определено в данном контексте. Конкретные антигенсвязывающие фрагменты включают антигенсвязывающий домен или переменную область антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие фрагменты могут содержать консервативные области антитела, как дополнительно определено в данном контексте и известно в данной области техники. Пригодные консервативные области тяжелой цепи включают любой из пяти изотипов: альфа, дельта, эпсилон, гамма или мю. Пригодные консервативные области легкой цепи включают любой из двух изотипов: каппа и лямбда.

В данном контексте термины «первый», «второй», «третий» и «четвертый» по отношению к антигенсвязывающим фрагментам и т.д., используются для удобства различения, когда существует более одного фрагмента каждого типа и т.д. Использование этих терминов не предназначено для обозначения определенного порядка или ориентации мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, если это явно не указано иное.

Антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с CD3 и CD137

Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная в данном контексте, содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с CD3 и CD137 (также называемый в настоящем документе «двойной антигенсвязывающий фрагмент» или «первый антигенсвязывающий фрагмент» или «двойной Ig») или «двойной-Fab»). Первый антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном контексте, способен связываться с CD3 и CD137 и связывается либо с CD3, либо с CD137. Более подробно, первый антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном контексте, связывается с CD3, в другом варианте, первый антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном контексте, связывается с CD137. В конкретном варианте осуществления мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула содержит не более двух антигенсвязывающих фрагментов, способных специфически связываться с CD3 и CD137, но связывается либо с CD3, либо с CD137. В одном варианте осуществления мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула способна связываться с CD3 и CD137 и обеспечивает моновалентное связывание либо с CD3, либо с CD137. В одном

варианте осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент обладает активностью связывания с CD3 и активностью связывания с CD137, но когда фрагмент связывается с антигеном, фрагмент связывается с одним из двух, CD3 или CD137. В одном варианте осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137, но не связывается с CD3 и CD137 одновременно.

Антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с рецепторным комплексом Т-клеток

Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная в данном контексте, содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с комплексом рецептора Т-клеток, обладающим связывающей активностью (также называемый здесь «первым антигенсвязывающим фрагментом»). Первый антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном контексте, способен связываться с рецепторным комплексом Т-клеток. Антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с рецепторным комплексом Т-клеток, относится к части антитела комплекса анти-Т-клеточного рецептора, содержащей область, которая специфически связывается со всем рецепторным комплексом Т-клетки или частью рецепторного комплекса Т-клетки, а также является комплементарной с указанным комплексом. Комплекс рецептора Т-клетки может представлять собой рецептор Т-клетки сам по себе или молекулу-адаптер, составляющую комплекс рецептора Т-клетки с рецептором Т-клетки. CD3 является пригодным в качестве адаптера.

В некоторых вариантах осуществления двойной антигенсвязывающий фрагмент («первый антигенсвязывающий фрагмент») обычно представляет собой молекулу Fab, в прежде всего, традиционную молекулу Fab. В некоторых вариантах осуществления двойной антигенсвязывающий фрагмент («первый антигенсвязывающий фрагмент») представляет собой домен, содержащий переменные области легкой и тяжелой цепи антитела (VL и VH). Пригодные примеры таких доменов, содержащих переменные области легкой и тяжелой цепи антитела, включают «одноцепочечный Fv (scFv)», «одноцепочечное антитело», «Fv», «одноцепочечный Fv 2 (scFv2)», «Fab», «F(ab')₂» и т. д.

В некоторых вариантах осуществления двойной антигенсвязывающий фрагмент («первый антигенсвязывающий фрагмент») специфически связывается

с целым или частью частичного пептида CD3. В конкретном варианте осуществления CD3 представляет собой CD3 человека или CD3 яванского макака, прежде всего CD3 человека. В конкретном варианте осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент является перекрестно реактивным в отношении CD3 человека и яванского макака (т.е. специфически связывается с ним). В некоторых вариантах первый антигенсвязывающий фрагмент способен специфично связываться с эpsilon-субъединицей CD3, в частности с эpsilon-субъединицей CD3 человека, которая указана в последовательности SEQ ID NO: 170 (NP_000724.1) (регистрационные номера RefSeq указаны в скобках). В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент способен специфично связываться с эpsilon-цепью CD3, экспрессируемой на поверхности эукариотических клеток. В некоторых вариантах первый антигенсвязывающий фрагмент связывается с эpsilon-цепью CD3, экспрессируемой на поверхности Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления CD137 представляет собой CD137 человека. В некоторых вариантах особенно пригодные примеры антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению включают антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с тем же эпитопом, что и эпитоп CD137 человека, связанный антителом, выбранным из группы, состоящей из:

антитело, распознающее область, содержащую последовательность SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCS MCEQDCKQGQELTKKGC (SEQ ID NO: 182),

антитело, распознающее область, содержащую последовательность DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC (SEQ ID NO: 181),

антитело, распознающее область, содержащую последовательность LQDPCSNC PAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC (SEQ ID NO: 183),

антитело, распознающее область, содержащую последовательность LQDPCSNC PAGTFCDNNRNQIC (SEQ ID NO: 180) в белке CD137 человека.

В конкретных вариантах осуществления двойной антигенсвязывающий фрагмент («первый антигенсвязывающий фрагмент») включает любую одну из переменных областей (a1)-(a4), указанных ниже:

5 (a1) переменная область тяжелой цепи, включающая определяющую комплементарную область (CDR) 1 of SEQ ID NO: 9, CDR 2 с последовательностью SEQ ID NO: 15, и CDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 21 (первый антигенсвязывающий фрагмент)), и переменная область легкой цепи, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR 2 с последовательностью SEQ ID NO: 35, и CDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 39 (второй антигенсвязывающий фрагмент),

15 (a2) переменная область тяжелой цепи, включающая определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 10, CDR 2 с последовательностью SEQ ID NO: 16, и CDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 22 (первый антигенсвязывающий фрагмент), переменная область легкой цепи, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR 2 с последовательностью SEQ ID NO: 35, и CDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 39 (второй антигенсвязывающий фрагмент),

20 (a3) переменная область тяжелой цепи, включающая определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 11, CDR 2 с последовательностью SEQ ID NO: 17, и CDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 23 (первый антигенсвязывающий фрагмент), и переменная область легкой цепи, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR 2 с последовательностью SEQ ID NO: 36, и CDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 40 (второй антигенсвязывающий фрагмент),

25 (a4) переменная область тяжелой цепи, включающая определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 12, CDR 2 с последовательностью SEQ ID NO: 18, и CDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 24 (первый антигенсвязывающий фрагмент), и переменная область легкой цепи, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR 2 с последовательностью SEQ ID NO: 36, и CDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 40 (второй антигенсвязывающий фрагмент).

В конкретных вариантах осуществления двойной антигенсвязывающий фрагмент («первый антигенсвязывающий фрагмент») содержит переменные

области антитела, которые содержат каркасные антитела человека или каркасные гуманизированные антитела.

В конкретных вариантах осуществления двойной антигенсвязывающий фрагмент («первый антигенсвязывающий фрагмент») содержит один любой из (с1)-(с4), указанных ниже:

(с-1) переменная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (первый антигенсвязывающий фрагмент) и переменная область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 27, (второй антигенсвязывающий фрагмент),

(с-2) переменная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (первый антигенсвязывающий фрагмент) и переменная область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 27, (второй антигенсвязывающий фрагмент),

(с-3) переменная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (первый антигенсвязывающий фрагмент) и переменная область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 28, (второй антигенсвязывающий фрагмент),

(с-4) переменная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (первый антигенсвязывающий фрагмент) и переменная область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 28, (второй антигенсвязывающий фрагмент),

В одном варианте осуществления двойной антигенсвязывающий агент («первый антигенсвязывающий агент») включает последовательность переменной области тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере приблизительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 3 (первый антигенсвязывающий фрагмент), и последовательность переменной области легкой цепи, идентичную по меньшей мере приблизительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 27 (второй антигенсвязывающий фрагмент).

В другом варианте осуществления двойной антигенсвязывающий агент («первый антигенсвязывающий агент») включает последовательность переменной области тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере приблизительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 4 (первый антигенсвязывающий фрагмент), и последовательность

вариабельной области легкой цепи, идентичную по меньшей мере приблизительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 27 (второй антигенсвязывающий фрагмент).

5 В одном варианте осуществления двойной антигенсвязывающий агент («первый антигенсвязывающий агент») включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере приблизительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 5 (первый антигенсвязывающий фрагмент), и последовательность вариабельной области легкой цепи, идентичную по меньшей мере
10 приблизительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 28 (второй антигенсвязывающий фрагмент).

В другом варианте осуществления двойной антигенсвязывающий агент («первый антигенсвязывающий агент») включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере
15 приблизительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 6 (первый антигенсвязывающий фрагмент), и последовательность вариабельной области легкой цепи, идентичную по меньшей мере приблизительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 28 (второй антигенсвязывающий фрагмент).

20 В конкретных вариантах двойной антигенсвязывающий агент («первый антигенсвязывающий агент») включает любую одну из последовательностей (j01)-(j18), представленных ниже:

(j01) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54 (цепь 3) и легкая цепь, включающая аминокислотную
25 последовательность SEQ ID NO: 68 (цепь 4),

(j02) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 (chain 3) и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (цепь 4);

(j03) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ
30 ID NO: 56 (цепь 3) и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (цепь 4);

(j04) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (цепь 3 и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (цепь 4);

(j17) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (цепь 3) и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (цепь 4);

5 (j18) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (цепь 3) и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (цепь 4).

10 В некоторых вариантах осуществления двойной антигенсвязывающий фрагмент («первый антигенсвязывающий фрагмент») содержит переменные области антитела. В других вариантах двойной антигенсвязывающий фрагмент («первый антигенсвязывающий фрагмент») содержит первую переменную область антитела и вторую переменную область антитела, описанные выше.

15 Мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению также включают мультиспецифичное антитело, которое подверглось посттрансляционной модификации. Примеры таких мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, которые подвергаются посттрансляционной модификации, включают мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы, которые подверглись пироглутамилированию на N-конце переменной области тяжелой цепи и/или делеции лизина на C-конце тяжелой цепи. В данной области техники известно, что такая посттрансляционная модификация после пироглутамилирования на N-конце и делеции лизина на C-конце не оказывает какого либо влияния на активность антитела (Analytical Biochemistry, V. 348, p. 24-39 (2006)).

Антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с CLDN6

25 Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная в данном контексте, содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с CLDN6 (также называемый в данном контексте «антигенсвязывающий фрагмент CLDN6» или «второй антигенсвязывающий фрагмент»). В некоторых вариантах мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула содержит один антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с CLDN6.

30 В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент CLDN6 («второй антигенсвязывающий фрагмент») в основном представляет собой молекулу Fab, прежде всего, традиционную молекулу Fab. В некоторых вариантах антигенсвязывающий фрагмент CLDN6 («второй

антигенсвязывающий фрагмент») представляет собой домен, содержащий
вариабельные области легкой и тяжелой цепи антитела (VL и VH). Пригодные
примеры таких доменов, содержащих вариабельные области легкой и тяжелой
цепи антитела, включают «одноцепочечный Fv (scFv)», «одноцепочечное
5 антитело», «Fv», «одноцепочечный Fv 2 (scFv2)», «Fab», «F(ab')₂» и т.д.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий фрагмент CLDN6 («второй
антигенсвязывающий фрагмент») специфически связывается с полноразмерным
частичным пептидом CLDN6 или его частью. В конкретном варианте CLDN6
представляет собой CLDN6 человека, или CLDN6 яванского макака, или CLDN6
10 мыши, прежде всего CLDN6 человека. В конкретном варианте
антигенсвязывающий фрагмент CLDN6 («второй антигенсвязывающий
фрагмент») проявляет перекрестную реактивность к CLDN6 человека и
яванского макака (т.е. специфически связывается с ней).

В некоторых вариантах антигенсвязывающий фрагмент CLDN6 («второй
15 антигенсвязывающий фрагмент») специфически связывается с первым
внеклеточным доменом CLDN6 (аминокислоты 29-81 SEQ ID NO: 196 или 197)
или вторым внеклеточным доменом CLDN6 (аминокислоты 138-159 SEQ ID NO:
196 или 197). В некоторых вариантах антигенсвязывающий фрагмент CLDN6
20 («второй антигенсвязывающий фрагмент») специфически связывается с CLDN6
человека, экспрессируемым на поверхности эукариотических клеток. В
некоторых вариантах связывающая активность в отношении CLDN6
представляет собой связывающую активность в отношении белка CLDN6,
экспрессируемому на поверхности опухолевых клеток.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий фрагмент CLDN6 («второй
25 антигенсвязывающий фрагмент») в основном не связывается с CLDN9 человека.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий фрагмент CLDN6 («второй
антигенсвязывающий фрагмент») в основном не связывается с CLDN4 человека.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий фрагмент CLDN6 («второй
антигенсвязывающий фрагмент») в основном не связывается с CLDN3 человека.

30 В некоторых вариантах антигенсвязывающий фрагмент CLDN6 («второй
антигенсвязывающий фрагмент») в основном не связывается с мутантным
CLDN6, как определено в последовательности SEQ ID NO:205.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий фрагмент CLDN6 («второй
антигенсвязывающий фрагмент») представляет собой кроссоверную молекулу

Fab, т.е. молекулу Fab, в которой заменены либо переменные, либо консервативные области тяжелой и легкой цепей Fab.

В конкретных вариантах антигенсвязывающий фрагмент CLDN6 («второй антигенсвязывающий фрагмент») включает переменные области (b1) или (b2), указанные ниже:

(b1) переменная область тяжелой цепи, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR 2 с последовательностью SEQ ID NO: 14, CDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 20 (третья переменная область антитела), и переменная область легкой цепи, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 30, CDR 2 с последовательностью SEQ ID NO: 34, и CDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 38 (четвертая переменная область антитела),

(b2) переменная область тяжелой цепи, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR 2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 19 (третья переменная область антитела), и переменная область легкой цепи, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR 2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 37 (четвертая переменная область антитела), и

(b3) переменная область тяжелой цепи, включающая определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR 2 с последовательностью SEQ ID NO: 33, и CDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 37 (третья переменная область антитела), и переменная область легкой цепи, включающая CDR 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR 2 с последовательностью SEQ ID NO: 13, и CDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 19 (четвертая переменная область антитела).

В конкретных вариантах антигенсвязывающий фрагмент CLDN6 («второй антигенсвязывающий фрагмент») включает переменные области антитела, которые включают каркасные участки антител человека или гуманизированные каркасные участки антител.

В некоторых вариантах антигенсвязывающий фрагмент CLDN6 («второй антигенсвязывающий фрагмент») включает переменные области (d1) или (d2), указанные ниже:

5 (d1) переменная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (третья переменная область антитела), и переменная область легкой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 (четвертая переменная область антитела),

10 (d2) переменная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (третья переменная область антитела), и переменная область легкой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 (четвертая переменная область антитела), и

15 (d3) переменная область тяжелой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 (третья переменная область антитела), и переменная область легкой цепи, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (четвертая переменная область антитела).

В другом варианте осуществления антигенсвязывающий CLDN6 фрагмент («второй антигенсвязывающий фрагмент») включает последовательность переменной области тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере приблизительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 2 (третий антигенсвязывающий фрагмент), и последовательность переменной области легкой цепи, идентичную по меньшей мере приблизительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 26 (четвертый антигенсвязывающий фрагмент).

25 В другом варианте осуществления антигенсвязывающий CLDN6 фрагмент («второй антигенсвязывающий фрагмент») включает последовательность переменной области тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере приблизительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 1 (третий антигенсвязывающий фрагмент), и последовательность переменной области легкой цепи, идентичную по меньшей мере приблизительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 25 (четвертый антигенсвязывающий фрагмент).

В другом варианте осуществления антигенсвязывающий CLDN6 фрагмент («второй антигенсвязывающий фрагмент») включает последовательность переменной области тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере

приблизительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 25 (третий антигенсвязывающий фрагмент), и последовательность варибельной области легкой цепи, идентичную по меньшей мере приблизительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательности SEQ ID NO: 1 (четвертый антигенсвязывающий фрагмент).

В некоторых вариантах антигенсвязывающий CLDN6 фрагмент («второй антигенсвязывающий фрагмент») включает любую одну из указанных ниже последовательностей (k01)-(k09):

(k01) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (цепь 2),

(k02) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 (цепь 2),

(k03) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (цепь 2),

(k04) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (цепь 2),

(k05) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51 (цепь 2),

(k06) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (цепь 2),

(k07) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 (цепь 2),

(k08) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 (цепь 2),

(k09) тяжелая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 (цепь 1), и легкая цепь, включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (цепь 2).

5 В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий CLDN6 фрагмент («второй антигенсвязывающий фрагмент») содержит переменные области антитела. В некоторых вариантах антигенсвязывающий фрагмент CLDN6 («второй антигенсвязывающий фрагмент») содержит третью переменную область антитела и четвертую переменную область антитела, описанные выше.

10 В мультиспецифичной антигенсвязывающей молекуле, описанной выше, при условии, что она обладает активностью связывания с CD3, CD137, T-клеточным рецепторным комплексом или CLDN6, одну или более аминокислот можно заменить, удалить, добавить и/или вставить в аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи, а также
15 переменную область тяжелой цепи, переменную область легкой цепи, полную размерную тяжелую цепь и полную размерную легкую цепь. Способы, хорошо известные специалистам в данной области техники для получения аминокислотных последовательностей, в которых одна или более аминокислот были заменены, удалены, добавлены и/или вставлены, включают метод введения
20 мутаций в белки. Например, специалисты в данной области техники могут получить мутантные мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащие комбинацию переменных областей антитела, которые функционально эквивалентны комбинации переменных областей антитела в исходной мультиспецифичной антигенсвязывающей молекуле при
25 соответствующем введении мутаций в аминокислотную последовательность антитела, обладающего связывающей активностью с CD3, CD137, T-клеточным рецепторным комплексом или CLDN6, с использованием сайт-направленного мутагенеза (Hashimoto-Gotoh T., Mizuno T., Ogasahara Y. и Nakagawa M. An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275 (1995); Zoller MJ и Smith M. Oligonucleotide-directed
30 mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. Methods Enzymol. 100, 468-500 (1983); Kramer W., Drutsa V., Jansen HW., Kramer B., Pflugfelder M., и Fritz HJ. The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation

construction. *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456 (1984); Kramer W., и Fritz HJ. Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA *Methods. Enzymol.* 154, 350-367 (1987); и Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82, 488-492 (1985) и т.д.

В настоящем изобретении термин «функционально эквивалентный» означает, что аффинность связывания антигена эквивалентна, или, в другом варианте, означает, что цитотоксическая активность в отношении клеток, экспрессирующих клаудин 6, или тканей, содержащих такие клетки, эквивалентна в тех случаях, когда он используется в качестве мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы. Аффинность связывания и цитотоксическую активность можно измерить на основании описания, приведенного в данном контексте. Подробное описание представлено ниже.

Количество аминокислот, подлежащих изменению, не ограничено и может составлять, например, 40 или менее, 30 или менее, 20 или менее, предпочтительно 18 или менее, 16 или менее, 15 или менее, 12 или меньше, 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее, 2 или менее.

Если аминокислотный остаток изменяют, аминокислоту предпочтительно подвергают мутации в другую аминокислоту, которая сохраняет свойства боковой цепи аминокислоты. Примерами свойств боковой цепи аминокислот являются гидрофобные аминокислоты (A, I, L, M, F, P, W, Y и V), гидрофильные аминокислоты (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S и T), аминокислоты с алифатической боковой цепью (G, A, V, L, I и P), аминокислоты с боковой цепью, содержащей гидроксильную группу (S, T и Y), аминокислоты с боковой цепью, содержащей атом серы (C и M), аминокислоты с боковой цепью, содержащей карбоновую кислоту и амид (D, N, E и Q), аминокислоты с основной боковой цепью (R, K и H) и аминокислоты с ароматической боковой цепью (H, F, Y и W) (аминокислоты представлены в однобуквенном коде в скобках).

Аминокислотные замены в составе каждой из этих групп называются консервативными заменами. Уже известно, что полипептид, содержащий модифицированную аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков в данной аминокислотной последовательности удалены, добавлены и/или заменены другими аминокислотами, сохраняет свою

биологическую активность (Mark D. F. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5662-5666 (1984); Zoller M. J. и Smith M., Nucleic Acids Res. 10:6487-6500 (1982); Wang A. и др., Science 224:1431-1433 (1984); и Dalbadie-McFarland G. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6409-6413 (1982)).

5 Антиген

Использованный в данном контексте термин «антиген» относится к сайту (например, непрерывному участку аминокислот или конформационной конфигурации, состоящей из различных областей несмежных аминокислот) на полипептидной макромолекуле, с которой связывается антигенсвязывающий фрагмент, образуя комплекс антигенсвязывающий фрагмент-антиген. Пригодные антигенные детерминанты можно обнаружить, например, на поверхности опухолевых клеток, на поверхности инфицированных вирусом клеток, на поверхности других патогенных клеток, на поверхности иммунных клеток, в свободном виде в сыворотке крови и/или во внеклеточном матриксе (ECM).
10
Белки, называемые в данном контексте антигенами (например, CD3, CD137, CLDN6), могут представлять собой любую нативную форму белков из любого источника позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. В конкретном варианте осуществления антиген представляет собой CD3 человека,
15 CD137 человека или CLDN6 человека. Если в данном контексте упоминается конкретный белок, термин охватывает «полноразмерный», непротессированный белок, а также любую форму белка, полученную в результате процессинга в клетке. Этот термин также охватывает природные варианты белка, например, варианты сплайсинга или аллельные варианты.

25 В некоторых вариантах осуществления мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная в настоящем документе, связывается с эпитопом CD3, CD137 или CLDN6, который является консервативным в составе CD3, CD137 или CLDN6 различных видов. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по
30 настоящему изобретению представляет собой триспецифичную антигенсвязывающую молекулу, т.е. она способна специфически связываться с тремя различными антигенами – способна связываться с CD3 и CD137, но не

связывается с обоими антигенами одновременно. и способна специфически связываться с CLDN6.

Клаудин-6 (CLDN6) и другие белки семейства клаудинов

5 Термин «CLDN6», используемый в данном контексте, относится к любому нативному клаудину-6 из любого источника позвоночных, включая
млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. Аминокислотная последовательность CLDN6 человека (hCLDN6) указана в последовательности SEQ ID NO: 196 или
10 197, а аминокислотная последовательность CLDN6 мыши (mCLDN6) указана в последовательности SEQ ID NO: 201.

Кроме CLDN6, в семействе клаудинов существует много других белков, таких как CLDN3, CLDN4 и CLDN9. Аминокислотные последовательности CLDN3 человека (hCLDN3), CLDN4 человека (hCLDN4) и CLDN9 человека (hCLDN9) указаны в последовательности SEQ ID No: 199, 200 и 198,
15 соответственно. Аминокислотные последовательности CLDN3 мыши (mCLDN3), CLDN4 мыши (mCLDN4) и CLDN9 мыши (mCLDN9) указаны в последовательности SEQ ID No: 203, 204 и 202, соответственно.

CD3

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифичная
20 антигенсвязывающая молекула специфически связывается с полноразмерным частичным пептидом CD3 или его частью. В конкретном варианте осуществления CD3 представляет собой CD3 человека или CD3 яванского макака, прежде всего CD3 человека. В конкретном варианте осуществления мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула проявляет перекрестную
25 реактивность с CD3 человека и яванского макака (т.е. специфически связывается с ним). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула способна специфично связываться с эpsilon-субъединицей CD3, прежде всего с эpsilon-субъединицей CD3 человека.
которая указана в последовательности SEQ ID NO: 170 (NP_000724.1)
30 (регистрационные номера RefSeq: указаны в скобках). В некоторых вариантах осуществления мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула способна специфично связываться с эpsilon-цепью CD3, экспрессируемой на поверхности эукариотических клеток. В некоторых вариантах осуществления

мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула связывается с эpsilon-цепью CD3, экспрессируемой на поверхности Т-клеток.

CD137

В некоторых вариантах осуществления CD137 представляет собой CD137 человека. В некоторых вариантах осуществления предпочтительные примеры антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению включают антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с тем же эпитопом, что и эпитоп CD137 человека, связанный антителом, выбранным из группы, состоящей из следующих антител:

10 антитело, распознающее область, содержащую последовательность
SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCS
MCEQDCKQGQELTKKGC (SEQ ID NO: 182),

антитело, распознающее область, содержащую последовательность
DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC (SEQ ID NO: 181),

15 антитело, распознающее область, содержащую последовательность
LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKEC
SSTSNAEC, (SEQ ID NO: 183) и

антитело, распознающее область, содержащую последовательность
LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC (SEQ ID NO: 180) в белке CD137 человека.

20 Антигенсвязывающий домен

Термин «антигенсвязывающий домен» относится к части антитела, которая включает область, которая специфически связывается с частью или полноразмерным антигеном и является комплементарной ему. В

антигенсвязывающий домен можно включать, например, один или более
25 переменных доменов антитела (также называемыми переменными областями антитела). Предпочтительно, антигенсвязывающие домены содержат как переменную область легкой цепи антитела (VL), так и переменную область тяжелой цепи антитела (VH). Такие предпочтительные антигенсвязывающие домены включают, например, «одноцепочечный Fv (scFv)», «одноцепочечное
30 антитело», «Fv», «одноцепочечный Fv2 (scFv2)», «Fab» и «F (аб')₂». В антигенсвязывающий домен также можно включать однодоменные антитела.

Однодоменное антитело

В настоящем описании термин «однодоменное антитело» не ограничен его структурой, при условии, что домен сам по себе может проявлять

антигенсвязывающую активность. Известно, что обычное антитело, например, антитело IgG, проявляет антигенсвязывающую активность в состоянии, когда переменная область сформирована в результате спаривания VH и VL, тогда как собственная доменная структура однодоменного антитела может проявлять антигенсвязывающую активность сама по себе без спаривания с другим доменом. Обычно однодоменное антитело характеризуется относительно низкой молекулярной массой и существует в форме мономера.

Примеры однодоменных антител включают, но не ограничиваясь перечисленным, антигенсвязывающие молекулы, исходно лишенные легкой цепи, такие как VHH семейства животных Camelidae и VNAR акулы, и фрагменты антител, содержащие полноразмерный домен VH антитела или его часть, или полноразмерный домен VL антитела или его часть. Примеры однодоменного антитела, которое представляет собой фрагмент антитела, содержащий полноразмерный домена VH или VL антитела или его часть, включают, но не ограничиваясь перечисленным, искусственно полученные однодоменные антитела, полученные из VH антитела человека или VL антитела человека, как описано в патенте США №6248516 B1 и т.д. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одно однодоменное антитело содержит три области CDR (CDR1, CDR2 и CDR3).

Однодоменное антитело можно получить из организма животного, способного продуцировать однодоменное антитело, или при иммунизации животного, способного продуцировать однодоменное антитело. Примеры животных, способных продуцировать однодоменное антитело, включают, но не ограничиваясь перечисленным, животных семейства Camelidae и трансгенных животных, несущих ген, способный продуцировать однодоменное антитело. К животным семейства Camelidae относятся верблюды, ламы, альпаки, одногорбые верблюды, гуанако и др. Примеры трансгенных животных, несущих ген, способный продуцировать однодоменное антитело, включают, но не ограничиваясь перечисленным, трансгенных животных, описанных в международной публикации № WO2015/143414 и публикации патента США № US 2011/0123527 A1. Каркасные последовательности однодоменного антитела, полученного из организма животного, можно преобразовать в последовательности зародышевой линии человека или подобные им последовательности для получения гуманизованного однодоменного антитела.

Гуманизированное однодоменное антитело (например, гуманизированное V_HH) также является одним из вариантов однодоменного антитела по настоящему изобретению.

В другом варианте, однодоменное антитело можно получить с использованием методом ИФА, пэннинга и т.п. из полипептидной библиотеки, содержащей однодоменные антитела. Примеры полипептидной библиотеки, содержащей однодоменные антитела, включают, но не ограничиваясь перечисленным, библиотеки наивных антител, полученные из организмов различных животных или людей (например, *Methods in Molecular Biology*, 911 p.65-78 (2012); и *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1764:8 (1307-1319 (2006)), библиотеки антител, полученные в ходе иммунизации различных животных (например, *Journal of Applied Microbiology* 117:2. 528-536 (2014)), и библиотеки синтетических антител, полученные из генов антител различных животных или людей (например, *Journal of Biomolecular Screening* 21: 1. 35-43 (2016); *Journal of Biological Chemistry* 291:24. 12641-12657 (2016); и *AIDS* 30: 11 (1691-1701 (2016)).

Вариабельная область

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L, соответственно) нативного антитела в основном характеризуются сходными структурами, при этом каждый домен включает четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гипервариабельных участка (HVR). (См., например, статью Kindt и др. *Kuby Immunology*, 6-е изд., WH Freeman and Co., с. 91 (2007)). Один домен V_H или V_L является достаточным для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, можно выделить с использованием домена V_H или V_L из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов V_L или V_H, соответственно. См., например, статьи Portolano и др., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson и др., *Nature* 352:624-628 (1991).

HVR или CDR

Термин «гипервариабельная область» или «HVR», используемый в настоящем документе, относится к каждой из областей вариабельного домена

антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности («определяющие комплементарность области» или «CDR») и/или образуют структурно определенные петли («гипервариабельные петли») и/или содержат остатки, контактирующие с антигеном («контакты антигена»).

5 Гипервариабельные области (HVR) также называют «определяющими комплементарность областями» (CDR), и эти термины используются в данном контексте взаимозаменяемо по отношению к частям вариабельной области, которые формируют антигенсвязывающие области. В основном антитела содержат шесть областей HVR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3).

10 Примеры HVR, описанные в данном контексте, включают следующие структуры:

а) гипервариабельные петли, расположенные по аминокислотным остаткам 26–32 (L1), 50–52 (L2), 91–96 (L3), 26–32 (H1), 53–55 (H2) и 96–101 (H3) (Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

15 (b) CDR, расположенные по аминокислотным остаткам 24–34 (L1), 50–56 (L2), 89–97 (L3), 31–35b (H1), 50–65 (H2) и 95–102 (H3), (Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)),

20 (c) контакты антигена, расположенные по аминокислотным остаткам 27c–36 (L1), 46–55 (L2), 89–96 (L3), 30–35b (H1), 47–58 (H2) и 93–101 (H3) (MacCallum и др. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); и

(d) комбинации (a), (b) и/или (c), включающие аминокислотные остатки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26–35 (H1), 26–35b (H1), 49–65 (H2), 93–102 (H3) и 94–102 (H3).

25 Если не указано иное, остатки HVR и другие остатки в вариабельном домене (например, остатки FR) пронумерованы в данном контексте, как описано в статье Kabat и др. (см. выше).

HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 также упоминаются как «H-CDR1», «H-CDR2», «H-CDR3», «L-CDR1», "L-CDR2" и 30 "L-CDR3", соответственно.

Способность связываться с CD3 и CD137

«Способность вариабельной области антитела по настоящему изобретению связываться с CD3 и CD137», можно определить методом, известным в данной области техники.

Такой анализ можно проводить, например, методом электрохемилюминесценции (метод ECL) (BMC Research Notes 4: 281 (2011)).

Прежде всего, например, низкомолекулярное антитело, состоящее из области, способной связываться с CD3 и CD137, например, исследуемой Fab-области меченной биотином антигенсвязывающей молекулы, подлежащей тестированию, или моновалентное антитело (антитело, лишенное одной из двух Fab-областей, переносимых обычным антителом), смешивают с CD3 или CD137, содержащими сульфо-метку (Ru-комплекс), и смесь добавляют на планшет с иммобилизованным стрептавидином. В ходе этой операции исследуемая антигенсвязывающая молекула, меченная биотином, связывается со стрептавидином на планшете. Наблюдается излучение сульфо-метки, и сигнал люминесценции можно детектировать на приборе Sector Imager 600 или 2400 (MSD К.К.) или т.п., чтобы тем самым подтвердить связывание вышеупомянутой исследуемой области антигенсвязывающей молекулы с CD3 или CD137.

В другом варианте, этот анализ можно проводить методами ИФА, FACS (сортировка клеток, активированная флуоресценцией), ALPHAScreen (гомогенный анализ усиленной за счет эффекта близости люминесценции), методом BIACORE, основанным на явлении поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и т.д. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (11), 4005-4010 (2006)).

Более подробно, анализ можно проводить с использованием, например, анализатора взаимодействия Biacore (GE Healthcare Japan Corp.), основанного на явлении поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Анализатор Biacore включает любую модель, например Biacore T100, T200, X100, A100, 4000, 3000, 2000, 1000 или С. В качестве сенсорного чипа можно использовать любой сенсорный чип для Biacore, например CM7, CM5, CM4, CM3, C1, SA, NTA., L1, НРА или Au-чип. Белки для захвата антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, такие как белок А, белок G, белок L, антитела против IgG человека, антитела против IgG-Fab человека, антитела против L-цепи человека, антитела против Fc человека, антигенные белки или антигенные пептиды, иммобилизуют на сенсорном чипе с методом конденсации, такого как аминное связывание, дисульфидное связывание или альдегидное связывание. CD3 или CD137 добавляют в чип в качестве аналита и измеряют взаимодействие с использованием полученной сенсограммы. В этой операции концентрацию CD3 или CD137 можно выбрать в диапазоне от нескольких мкМ до нескольких

пМ в зависимости от силы взаимодействия (например, KD) анализируемого образца.

В другом варианте, CD3 или CD137 можно иммобилизовать вместо антигенсвязывающей молекулы на сенсорном чипе, с которым, в свою очередь, может взаимодействовать анализируемый образец антитела. Способность 5
вариабельной области антитела антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению проявлять связывающую активность к CD3 или CD137, можно подтвердить на основании значения константы диссоциации (KD), рассчитанной на основе сенсограммы взаимодействия, или на основе степени увеличения 10
сигнала на сенсограмме после воздействия образца антигенсвязывающей молекулы по сравнению с уровнем до воздействия.

В некоторых вариантах осуществления активность связывания или аффинность вариабельной области антитела по настоящему изобретению к 15
исследуемому антигену (т.е. CD3 или CD137) оценивают при 37° С (для CD137) или 25° С (для CD3), с использованием, например, прибора Biacore T200 (GE Healthcare) или прибора Biacore 8K (GE Healthcare). Анти-Fc человека (например, GE Healthcare) иммобилизуют на всех проточных ячейках сенсорного чипа CM4 с использованием набора для связывания аминов (например, GE Healthcare). Антигенсвязывающие молекулы или вариабельные области антитела 20
захватываются на поверхности сенсора анти-Fc, затем антиген (CD3 или CD137) вводят в проточную кювету. Уровни захвата антигенсвязывающих молекул или вариабельных областей антитела можно установить на 200 резонансных единиц (RU). Рекомбинантный CD3 или CD137 человека можно добавлять в концентрации от 400 до 25 нМ, которую получают методом двукратного 25
серийного разведения с последующей диссоциацией. Все антигенсвязывающие молекулы или вариабельные области антител и анализируемые образцы готовят в буферном растворе ACES pH 7,4, содержащем 20 мМ ACES, 150 мМ NaCl, 0,05% твин 20, 0,005% NaN₃. Поверхность датчика регенерируют на каждом 30
цикле с использованием 3М MgCl₂. Аффинность связывания определяют при обработке и аппроксимации данных на модели связывания 1:1 с использованием, например, оценочного программного обеспечения Biacore T200 версии 2.0 (GE Healthcare) или оценочного программного обеспечения Biacore 8K (GE Healthcare). Значения KD рассчитывают для оценки специфичной связывающей

активности или аффинности антигенсвязывающих доменов по настоящему изобретению.

Анализ ALPHA Screen осуществляют по технологии ALPHA с использованием двух типов гранул (донорной и акцепторной) на основе
5 следующего принципа: сигналы люминесценции детектируют только тогда, когда эти две гранулы расположены в непосредственной близости за счет биологического взаимодействия между молекулой, связанной с донорной гранулой, и молекулой, связанной с акцепторной гранулой.

Фотосенсибилизатор, возбуждаемый лазером в донорной грануле, преобразует
10 кислород окружающей среды в синглетный кислород, находящийся в возбужденном состоянии. Синглетный кислород диффундирует вокруг гранулы-донора и достигает гранулы-акцептора, расположенной рядом с ней, тем самым вызывая хемилюминесцентную реакцию в грануле, которая в конечном итоге излучает свет. В отсутствие взаимодействия между молекулой, связанной с
15 донорной гранулой, и молекулой, связанной с акцепторной гранулой, синглетный кислород, образуемый донорной гранулой, не достигает акцепторной гранулы. Таким образом, хемилюминесцентная реакция не происходит.

Одно из веществ (лиганд), между которыми предстоит наблюдать
20 взаимодействие, иммобилизуют на тонкой золотой пленке сенсорного чипа. Сенсорный чип облучают светом таким образом, чтобы на границе раздела между тонкой золотой пленкой и стеклом происходило полное отражение. В результате на части отраженного света формируется участок падения интенсивности отражения (сигнал поверхностного плазмонного резонанса, SPR
25 (ППР)). На поверхность сенсорного чипа добавляют другое (аналит) из веществ, между которыми необходимо наблюдать взаимодействие. При связывании аналита с лигандом масса иммобилизованной молекулы лиганда увеличивается, что приводит к изменению показателя преломления растворителя на поверхности сенсорного чипа. Такое изменение показателя преломления
30 смещает положение сигнала ППР (и наоборот, диссоциация связанных молекул возвращает сигнал в исходное положение). Система Biacore откладывает по оси ординат величину сдвига, т.е. изменения массы на поверхности сенсорного чипа, и отображает зависящее от времени изменение массы в виде данных анализа (сенсограммы). Количество аналита, связанного с лигандом, захваченным на

поверхности сенсорного чипа (степень изменения ответа на сенсограмме до взаимодействия аналита и после него), можно определить по сенсограмме. Однако, поскольку связанное количество также зависит от количества лиганда, сравнение необходимо проводить в условиях, когда используют в основном одинаковые количества лиганда. Кинетические параметры, т.е. константу скорости ассоциации (k_a) и константу скорости диссоциации (k_d), можно определить по кривой на сенсограмме, а аффинность (KD) можно определить по соотношению между этими константами. В методе BIACORE также предпочтительно используют анализ ингибирования. Примеры анализа ингибирования описаны в статье Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (11), 4005-4010 (2006).

Не связывается с CD3 и CD137 (4-1BB) одновременно

Как описано выше, связывание одного из CD3 или CD137 включает отсутствие связывания с CD3 и CD137 (4-1BB) одновременно. Термин «не связывается с CD3 и CD137 (4-1BB) в одно и то же время» или «не связывается с CD3 и CD137 (4-1BB) в одно и то же время» означает, что антигенсвязывающий фрагмент или переменная область антитела по настоящему изобретению не может связываться с CD137 в состоянии, связанном с CD3, в то время как антигенсвязывающий фрагмент или переменная область антитела не может связываться с CD3 в состоянии, связанном с CD137. В этом контексте словосочетание «не связывается с CD3 и CD137 в одно и то же время» также включает отсутствие перекрестного связывания с клеткой, экспрессирующей CD3, с клеткой, экспрессирующей CD137, или отсутствие связывания с CD3 и CD137, каждый из которых экспрессируется в другой клетке в одно и то же время.

Такая переменная область антитела конкретно не ограничена, пока переменная область антитела проявляет эти функции. Их примеры могут включать переменные области, полученные из переменной области антитела типа IgG за счет изменения части его аминокислот для связывания с требуемым антигеном. Аминокислоту, подлежащую изменению, выбирают, например, из аминокислот, изменение которых не отменяет связывание с антигеном, в переменной области антитела, связывающейся с CD3 или CD137.

В этом контексте словосочетание «экспрессируется на различных клетках» просто означает, что антигены экспрессируются на отдельных клетках.

Комбинация таких клеток может представлять собой, например, клетки одного и того же типа, такие как Т-клетка и другая Т-клетка, или могут представлять собой клетки различных типов, такие как Т-клетка и НК-клетка.

5 Возможность связывания мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, содержащейся в противоопухолевом агенте, фармацевтической композиции, комбинации или наборе по настоящему изобретению или используемой в способе или при применении по настоящему изобретению «с одним из CD3 или CD137», когда связывание с антигеном можно подтвердить тем, что: антигенсвязывающая молекула обладает связывающей активностью как в отношении CD3, так и в отношении CD137, затем предоставлением возможности белков CD3 или CD137 заранее связаться с антигенсвязывающей молекулой, содержащей вариабельную область, обладающую такой связывающей активностью; и затем определением наличия или отсутствия его связывающей активности по отношению к другому белку с помощью метода, 10 упомянутого выше. В другом варианте такую возможность можно также подтвердить при определении возможности подавлять связывание антигенсвязывающей молекулы либо с CD3, либо CD137, иммобилизованным на планшете ИФА или сенсорном чипе, при добавлении другого белка в раствор. В некоторых вариантах осуществления связывание антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению либо с CD3, либо с CD137 подавляется за счет связывания антигенсвязывающей молекулы с другим белком по меньшей мере на 50%, предпочтительно на 60% или более, более предпочтительно на 70% или более, более предпочтительно на 80% или более, еще более предпочтительно на 90% или более или еще более предпочтительно на 95% или более.

25 В одном аспекте, в то время как один антиген (например, CD3) иммобилизован, подавление связывания антигенсвязывающей молекулы с CD3 можно определить в присутствии другого антигена (например, CD137) способами, известными в данной области техники (т.е. ИФА), BIACORE и т.д.). В другом аспекте, в то время как CD137 иммобилизован, подавление связывания антигенсвязывающей молекулы с CD137 также можно определить в присутствии CD3. При осуществлении любого из двух аспектов, упомянутых выше, определяют, что антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению не связывается с CD3 и CD137 в одно и то же время, если связывание подавляется по меньшей мере на 50%, предпочтительно на 60% или более предпочтительно 30

на 70% или более, еще более предпочтительно на 80% или более, еще более предпочтительно на 90% или более или еще более предпочтительно на 95% или более.

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

Предпочтительно концентрация антигена, добавляемого в качестве аналита, в 100 раз превышает концентрацию другого антигена, подлежащего иммобилизации, и связывание подавляется по меньшей мере на 80%.

10 В одном варианте осуществления, рассчитывают отношение значений KD для связывающей активности антигенсвязывающей молекулы в отношении CD3 (аналит) к связывающей активности антигенсвязывающей молекулы с CD137 (иммобилизованном) ($KD(CD3)/KD(CD137)$), и концентрацию CD3 (аналита), которая в 10, 50, 100 или 200 раз превышает соотношение значений KD
15 ($KD(CD3)/KD(CD137)$), чем CD137 (иммобилизованный), можно использовать для измерения конкурентного связывания, указанного выше (например, можно выбрать более высокую 1-кратную, 5-кратную, 10-кратную или 20-кратную концентрацию, если отношение значений KD равно 0,1. Кроме того, если отношение значений KD равно 10, можно выбрать 100-кратную, 500-кратную,
20 1000-кратную или 2000-кратную концентрацию.

В одном аспекте, в то время как один антиген (например, CD3) иммобилизован, ослабление сигнала связывания антигенсвязывающей молекулы с CD3 можно определить в присутствии другого антигена (например, CD137) способами, известными в данном уровне техники (т.е. ИФА, ECL
25 (электрохемилюминисцентный анализ и т.д.). В другом аспекте, в то время как CD137 иммобилизован, ослабление сигнала связывания антигенсвязывающей молекулы с CD137 также можно определить в присутствии CD3. При осуществлении любого из двух аспектов, упомянутых выше, определяют, что антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению не связывается с
30 CD3 и CD137 в одно и то же время, если сигнал связывания ослаблен по меньшей мере на 50%, предпочтительно на 60% или более, предпочтительно на 70% или более, еще более предпочтительно на 80% или более, еще более предпочтительно на 90% или более или еще более предпочтительно на 95% или более.

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

Предпочтительно концентрация антигена, добавляемого в качестве аналита, в 100 раз превышает концентрацию другого антигена, подлежащего иммобилизации, и связывание подавляется по меньшей мере на 80%.

В одном варианте осуществления, рассчитывают отношение значений KD для связывающей активности антигенсвязывающей молекулы в отношении CD3 (аналит) к связывающей активности антигенсвязывающей молекулы в отношении CD137 (иммобилизованный) ($KD(CD3)/KD(CD137)$), и концентрацию CD3 (аналита), которая в 10, 50, 100 или 200 раз превышает соотношение значений KD ($KD(CD3)/KD(CD137)$), чем CD137 (иммобилизованный), можно использовать для измерения конкурентного связывания, указанного выше (например, можно выбрать более высокую 1-кратную, 5-кратную, 10-кратную или 20-кратную концентрацию, если отношение значений KD равно 0,1. Кроме того, если отношение значений KD равно 10, можно выбрать 100-кратную концентрацию, 500-кратную, 1000-кратную или 2000-кратную концентрацию.

Более подробно, в случае использования, например, метода ECL, получают исследуемую антигенсвязывающую молекулу, меченную биотином, CD3, меченный сульфo-меткой (Ru-комплекс) и немеченый CD137. Если исследуемая антигенсвязывающая молекула способна связываться с CD3 и CD137, но связывается либо с CD3, либо с CD137, сигнал люминесценции сульфo-метки детектируют в отсутствие немеченого CD137 при добавлении смеси антигенсвязывающей молекулы, предназначенной для исследования, и меченного CD3 на планшет с иммобилизованным стрептавидином, с последующим проявлением на свету. Наоборот, сигнал люминесценции снижается в присутствии немеченого CD137. Такое снижение сигнала люминесценции можно оценивать количественно для определения относительной связывающей активности. Такой анализ можно провести аналогичным образом с использованием меченого CD137 и немеченого CD3.

В случае анализа ALPHAScreen исследуемая антигенсвязывающая молекула взаимодействует с CD3 в отсутствие конкурирующего CD137, генерируя сигналы при длине волны от 520 до 620 нм. Немеченый CD137 конкурирует с

CD3 за взаимодействие с исследуемой антигенсвязывающей молекулой.

Снижение флуоресценции, вызванное конкуренцией, можно оценить количественно, чтобы таким образом определить относительную связывающую активность. Бiotинилирование полипептида с использованием сульфо-NHS-биотина или аналогичным методом известно в данной области техники. В CD3 можно включить метку GST соответствующим адаптированным методом, который включает, например, слияние полинуклеотида, кодирующего CD3, в пламени с полинуклеотидом, кодирующим GST; и обеспечение экспрессии полученного в результате гибридного гена клетками или т.п., содержащими векторы, способные к его экспрессии, с последующей очисткой с использованием колонки с иммобилизованным глутатионом. Полученные сигналы предпочтительно анализируют с использованием, например, программного обеспечения GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего), оптимизированного к модели односайтовой конкуренции, основанной на нелинейном регрессионном анализе. Такой анализ можно провести аналогичным образом с использованием меченого CD137 и немеченого CD3.

В другом варианте можно использовать метод с использованием резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Явление FRET представляет собой явление, при котором энергия возбуждения передается напрямую между двумя флуоресцентными молекулами, расположенными рядом друг с другом, посредством электронного резонанса. Когда происходит FRET, энергия возбуждения донора (флуоресцентной молекулы, находящейся в возбужденном состоянии) передается акцептору (другой флуоресцентной молекуле, расположенной вблизи донора) таким образом, что испускаемая донором флуоресценция исчезает (точнее, время жизни флуоресценции укорачивается) и вместо этого флуоресценция излучается акцептором. Используя это явление, можно проанализировать, происходит ли связывание с CD3 и CD137 в одно и то же время. Например, когда CD3, несущий донор флуоресценции, и CD137, несущий акцептор флуоресценции, одновременно связываются с исследуемой антигенсвязывающей молекулой, флуоресценция донора исчезает, в то время как флуоресценция излучается акцептором. Следовательно, наблюдается изменение длины волны флуоресценции. Подтверждено, что такое антитело одновременно связывается с CD3 и CD137. С другой стороны, если смешивание CD3, CD137 и исследуемой

антигенсвязывающей молекулы не изменяет длину волны флуоресценции донора флуоресценции, связанного с CD3, эту исследуемую антигенсвязывающую молекулу можно рассматривать как антигенсвязывающий домен, который способен связываться с CD3 и CD137, но связывается либо с CD3, либо с CD137.

5 Например, обеспечивают связывание исследуемой меченной биотином антигенсвязывающей молекулы со стрептавидином на донорной грануле, тогда как CD3, меченный глутатион-S-трансферазой (GST), может связываться с акцепторной гранулой. Исследуемая антигенсвязывающая молекула взаимодействует с CD3 в отсутствие конкурирующего второго антигена, генерируя сигналы с длиной волны от 520 до 620 нм. Немеченый второй антиген конкурирует с CD3 за взаимодействие с исследуемой антигенсвязывающей молекулой. Снижение флуоресценции, вызванное конкуренцией, можно оценить количественно, чтобы таким образом определить относительную связывающую активность. Биотинилирование полипептида с использованием сульфо-NHS-биотина или аналогичного метода известно в данной области техники. В CD3 можно включить метку GST соответствующим адаптированным методом, который включает, например: слияние полинуклеотида, кодирующего CD3, в пламени с полинуклеотидом, кодирующим GST; и обеспечение экспрессии полученного гибридного гена клетками или т.п., содержащими векторы, способные к его экспрессии, с последующей очисткой с использованием колонки с иммобилизованным глутатионом. Полученные сигналы предпочтительно анализируют с использованием, например, программного обеспечения GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего), оптимизированного к односайтовой модели конкуренции, основанной на нелинейном регрессионном анализе.

15 Включение метки не ограничивается меткой GST и может осуществляться с использованием любой метки, такой как, но не ограничиваясь перечисленным, гистидиновая метка, MBP, CBP, метка Flag, метка HA, метка V5 или метка с-тус. Связывание исследуемой антигенсвязывающей молекулы с донорской гранулой не ограничивается связыванием с использованием реакции биотин-стрептавидин. Прежде всего, когда исследуемая антигенсвязывающая молекула содержит Fc, возможный метод включает обеспечение возможности связывания исследуемой антигенсвязывающей молекулы через Fc-распознающий белок, такой как белок A или белок G, на донорской грануле.

Кроме того, в случае, когда вариабельная область не может в одно и то же время связываться с CD3 и CD137, каждый из которых экспрессируется на разных клетках, эти антигены также можно проанализировать методом, известным в данной области техники.

5 Более подробно, было подтверждено, что исследуемая антигенсвязывающая молекула является положительной по данным анализа ECL-ИФА для детектирования связывания с CD3 и CD137, в одно и же время, ее также смешивают с клеткой, экспрессирующей CD3, и клеткой, экспрессирующей CD137. Можно установить, что исследуемая антигенсвязывающая молекула не
10 способна связываться с CD3 и CD137, экспрессируемыми на различных клетках, одновременно, если только антигенсвязывающая молекула и эти клетки не связываются друг с другом одновременно. Такой анализ можно проводить, например, с использованием ECL-ИФА на основе клеток. Клетку, экспрессирующую CD3, предварительно иммобилизуют на планшете.

15 После связывания исследуемой антигенсвязывающей молекулы с этой клеткой в планшет добавляют клетку, экспрессирующую CD137. Другой антиген, экспрессируемый только на клетках, экспрессирующих CD137, детектируют с использованием антитела с сульфо-меткой в отношении этого антигена. Сигнал наблюдают, когда антигенсвязывающая молекула связывается
20 с двумя антигенами, соответственно экспрессируемыми на двух клетках, одновременно. Никакого сигнала не наблюдается, когда антигенсвязывающая молекула не связывается с этими антигенами одновременно.

В другом варианте такой анализ можно проводить методом ALPHAScreen. Исследуемую антигенсвязывающую молекулу, смешивают с клеткой,
25 экспрессирующей CD3, связанный с донорной гранулой, и клеткой, экспрессирующей CD137, связанный с акцепторной гранулой. Сигнал наблюдается, когда антигенсвязывающая молекула связывается с двумя антигенами, экспрессируемыми на двух клетках, соответственно, в одно и то же время. Никакого сигнала не наблюдается, когда антигенсвязывающая молекула
30 не связывается с этими антигенами в одно и то же время.

В другом варианте, этот анализ также можно проводить с использованием метода анализа взаимодействия Octet. Во-первых, клетке, экспрессирующей CD3 с пептидной меткой, обеспечивают связывание с биосенсором, который распознает пептидную метку. Клетку, экспрессирующую CD137, и исследуемую

антигенсвязывающую молекулу добавляют в лунки и анализируют для детектирования взаимодействия. При этом наблюдается большой сдвиг длины волны, вызванный связыванием исследуемой антигенсвязывающей молекулы и клетки, экспрессирующей CD137, с биосенсором, то есть когда

5 антигенсвязывающая молекула связывается с двумя антигенами, соответственно экспрессируемыми на двух клетках, в одно и то же время. Небольшой сдвиг длины волны, вызванный связыванием с биосенсором только исследуемой антигенсвязывающей молекулы, наблюдается, когда антигенсвязывающая молекула не связывается с этими антигенами в одно и то же время.

10 Вместо этих методов, основанных на связывающей активности, можно проводить анализ, основанный на биологической активности. Например, клетку, экспрессирующую CD3, и клетку, экспрессирующую CD137, смешивают с исследуемой антигенсвязывающей молекулой и культивируют. Два антигена, экспрессированные на двух клетках, соответственно, взаимно активируются

15 через исследуемую антигенсвязывающую молекулу, когда антигенсвязывающая молекула связывается с этими двумя антигенами в одно и то же время. Следовательно, можно детектировать изменение сигнала активации, такое как увеличение уровней антигенов в ходе последующей стадии фосфорилирования. В другом варианте в результате активации индуцируется продуцирование

20 цитокинов. Следовательно, количество продуцируемых цитокинов можно измерить, чтобы таким образом подтвердить, связываются ли они с двумя клетками одновременно. В другом варианте, в результате активации индуцируется цитотоксичность в отношении клеток, экспрессирующих CD137. В другом варианте, экспрессия репортерного гена индуцируется промотором,

25 который активируется ниже по пути сигнальной трансдукции CD137 или CD3 в результате активации. Следовательно, цитотоксичность или количество продуцируемых репортерных белков можно измерить, чтобы таким образом подтвердить связывание с двумя клетками в одно и то же время или его отсутствие.

30 Мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащаяся в противоопухолевом препарате, фармацевтической композиции, комбинации или наборе по настоящему изобретению или используемая в способе или при применении по настоящему изобретению, представляет собой антигенсвязывающую молекулу, связывание которой с CD3 и CD137 не является

одновременным (т.е. не связывается с CD3 и CD137 одновременно); и следовательно, не происходит одновременного связывания CD3 и/или CD137, экспрессируемыми на различных иммунных клетках (например, Т-клетках), с помощью одной и той же антигенсвязывающей молекулы, что позволяет
 5 исключить токсичность из-за нежелательного перекрестного связывания между различными иммунными клетками, которое считается ответственным за побочные реакции, когда обычную мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, способную одновременно связываться с CD3, и вторую молекулу (например, CD137), экспрессируемую на Т-клетках, вводят *in vivo*.

10 Токсичность мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, при введении *in vivo*, можно определить по продуцированию цитокинов и т.п. Низкая токсичность означает отсутствие индуцированной иммунной активации, такой как CLDN6-независимое продуцирование цитокинов, по сравнению с мультиспецифичным антителом, используемым в качестве контроля.

15 Молекула Fab

«Молекула Fab» относится к белку, состоящему из доменов VH и CH1 тяжелой цепи («тяжелая цепь Fab») и доменов VL и CL легкой цепи («легкая цепь Fab») иммуноглобулина.

Гибридный

20 Термин «гибридный» означает, что компоненты (например, молекула Fab и субъединица домена Fc) связаны пептидными связями либо напрямую, либо через один или несколько пептидных линкеров.

«Кроссоверный» Fab

25 Молекула «кроссоверного» Fab (также называемая «Crossfab») означает молекулу Fab, в которой либо переменные области, либо консервативные области тяжелой и легкой цепи Fab заменены, т.е. кроссоверная молекула Fab содержит пептидную цепь, состоящую из переменной области легкой цепи и консервативной области тяжелой цепи, а также пептидную цепь, состоящую из переменной области тяжелой цепи и консервативной области легкой цепи.

30 Для ясности следует отметить, что в кроссоверной молекуле Fab, в которой переменные области легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab заменены, пептидная цепь, содержащая консервативную область тяжелой цепи, называется в данном контексте «тяжелой цепью» кроссоверной молекулы Fab. И наоборот, в кроссоверной молекуле Fab, в которой консервативные области легкой цепи Fab

и тяжелой цепи Fab заменены, пептидная цепь, содержащая переменную область тяжелой цепи, называется в данном контексте «тяжелой цепью» кроссоверной молекулы Fab.

«Стандартный» Fab

5 И наоборот, «стандартная» молекула Fab означает молекулу Fab в ее природном формате, т.е. содержащую тяжелую цепь, состоящую из переменной и консервативной областей тяжелой цепи (VH-CH1), и легкую цепь, состоящую из переменной и консервативной областей легкой цепи (VL-CL). Термин «молекула иммуноглобулина» относится к белку,
 10 характеризующемуся структурой природного антитела. Например, иммуноглобулины класса IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой приблизительно 150000 Да, состоящие из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, связанных дисульфидными связями. В направлении от N-конца к C-концу каждая тяжелая цепь характеризуется
 15 переменной областью (VH), также называемой переменным доменом тяжелой цепи, за которым следуют три консервативных домена (CH1, CH2 и CH3), также называемые консервативной областью тяжелой цепи. Аналогичным образом, от N-конца к C-концу каждая легкая цепь включает переменную область (VL), также называемую переменным доменом легкой цепи, за
 20 которым следует консервативный домен легкой цепи (CL), также называемый консервативной областью легкой цепи. Тяжелую цепь иммуноглобулина можно отнести к одному из пяти типов: альфа (IgA), дельта (IgD), эпсилон (IgE), гамма (IgG) или мю (IgM), некоторые из которых можно дополнительно разделить на подтипы, например, гамма 1 (IgG1), гамма 2 (IgG2), гамма 3 (IgG3), гамма 4
 25 (IgG4), альфа 1 (IgA1) и альфа 2 (IgA2). Легкую цепь иммуноглобулина можно отнести к одному из двух типов, называемых каппа и лямбда, на основании аминокислотной последовательности ее консервативного домена. Иммуноглобулин в основном состоит из двух молекул Fab и домена Fc, связанных через шарнирную область иммуноглобулина.

30 Аффинность

Термин «аффинность» относится к суммарной силе нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антигенсвязывающей молекулы или антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, используемый в данном контексте

термин «аффинность связывания» относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антигенсвязывающей молекулы и антигена или антитела и антигена). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно можно выразить константой диссоциации (KD), которая представляет собой отношение констант скорости диссоциации и ассоциации (k_{off} и k_{on} соответственно). Таким образом, равные аффинности могут включать различные константы скорости, до тех пор, пока соотношение констант скорости остается без изменений.

Аффинность можно измерить хорошо известными методами, известными в данной области техники, включая описанные в данном контексте. Конкретным методом измерения аффинности является поверхностный плазмонный резонанс (ППР).

Методы определения аффинности

В некоторых вариантах антигенсвязывающая молекула или антитело, представленное в данном контексте, характеризуется константой диссоциации (KD) 1 мкМ или менее, 120 нМ или менее, 100 нМ или менее, 80 нМ или менее, 70 нМ или менее, 50 нМ или менее, 40 нМ или менее, 30 нМ или менее, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее, 2 нМ или менее, 1 нМ или менее, 0,1 нМ или менее, 0,01 нМ или менее или 0,001 нМ или менее (например, 10^{-8} М или менее, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, от 10^{-9} М до 10^{-13} М) по отношению к его антигену. В некоторых вариантах значение KD антитело/антигенсвязывающая молекула для CD3, CD137 или CLDN6 находится в диапазоне 1-40, 1-50, 1-70, 1-80, 30-50, 30-70, 30-80, 40-70, 40-80 или 60-80 нМ.

В одном варианте KD измеряют с помощью анализа связывания радиоактивно меченого антигена (РИА). В одном варианте РИА проводят с исследуемой Fab-версией антитела и его антигена. Например, аффинность связывания Fab с антигеном в растворе измеряют с помощью уравнивания Fab минимальной концентрацией (^{125}I)-меченого антигена в присутствии серийных разведений немеченого антигена, а затем связывания антигена на планшете, покрытом антителом против Fab (см., например, Chen и др., J. Mol. Biol., 293:865-881 (1999)). Для создания условий проведения анализа многолуночные планшеты MICROTITER™ (Thermo Scientific) покрывают в течение ночи 5 мкг/мл раствором захватывающего анти-Fab-антитела (Cappel Labs) в 50 мМ карбонате натрия (pH 9.6), а затем блокируют 2% (мас./об.)

бычьим сывороточным альбумином в PBS в течение двух-пяти ч при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В неадсорбирующей планшете (Nunc #269620) 100 пМ или 26 пМ [¹²⁵I]-антигена смешивают с серийными разведениями исследуемого Fab (например, в соответствии с условиями

5 определением антитела против VEGF, Fab-12, указанными в статье Presta и др., *Cancer Res.*, 57:4593-4599 (1997)). Затем исследуемый Fab инкубируют в течение ночи; однако инкубацию можно продолжать в течение более длительного периода (например, около 65 ч), чтобы обеспечить достижение равновесия. После этого смеси переносят в связывающий планшет для инкубации при

10 комнатной температуре (например, в течение 1 ч). Затем раствор удаляют, и планшет восемь раз промывают 0.1% полисорбатом 20 (TWEEN-20™) в PBS. Когда планшеты высохнут, добавляют 150 мкл на лунку сцинтиллятора (MICROSCINT-20™, Packard) и планшеты считывают на гамма-счетчике TOPCOUNT™ (Packard) в течение 10 мин. Для использования в анализах

15 конкурентного связывания выбирают концентрации каждого Fab, которые характеризуются 20% от максимального связыванием или менее.

Согласно другому варианту K_d измеряют с помощью системы BIACORE™ для анализа поверхностного плазмонного резонанса. Например, анализ с использованием BIACORE™-2000 или BIACORE™-3000 (BIAcore, Inc.,

20 Пискатауэй, Нью-Джерси) проводят при 25°C на чипах с иммобилизованным антигеном CM5 при ~10 единицах ответа (RU). В одном варианте биосенсорные чипы с карбоксиметилированным декстраном (CM5, BIACORE, Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика.

25 Антиген разбавляют 10 мМ ацетатом натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед инъекцией со скоростью потока 5 мкл/мин для достижения приблизительно 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После инъекции антигена добавляют 1 М этаноламин для блокировки непрореагировавших групп. Для измерений кинетики двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 до

30 500 нМ) добавляют в PBS с 0,05% поверхностно-активного вещества, полисорбата 20 (TWEEN-20™) (PBST), при 25°C и скорости потока приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывают с помощью простой модели связывания Ленгмюра «один к одному» (программное обеспечение для оценки BIACORE™, версия 3.2) с

использованием одновременной аппроксимации сенсорограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (K_d) рассчитывают как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen и др., J. Mol. Biol., 293:865-881 (1999). Если скорость ассоциации превышает $10^6 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$ по результатам анализа

5 поверхностного плазмонного резонанса, описанного выше, то скорость ассоциации можно определить с помощью метода тушения флуоресценции, по данным которого измеряют увеличение или уменьшение интенсивности эмиссии флуоресценции (возбуждение = 295 нм, испускание = 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C в растворе 20 нМ антитела против антигена (Fab-

10 форма) в PBS, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, измеренных с помощью спектрометра, например спектрофотометра с остановленным потоком (фирмы Aviv Instruments) или спектрофотометра SLM-AMINCO™ серии 8000 (фирмы ThermoSpectronic) в кювете с перемешиванием.

В соответствии со способами измерения аффинности антигенсвязывающей

15 молекулы или антитела, описанными выше, специалистам в данной области техники представляется очевидным измерение аффинности других антигенсвязывающих молекул или антител по отношению к различным типам антигенов.

Антитело

20 Термин «антитело» в данном контексте используется в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая, но не ограничиваясь только ими, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела, триспецифичные антитела) и фрагменты антител, при условии, что они

25 проявляют требуемую антигенсвязывающую активность.

В некоторых вариантах мультиспецифичное антитело, описанное в данном контексте, связывается с эпитопом CD3, CD137 или CLDN6, который является консервативным для CD3, CD137 или CLDN6 у разных видов. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифичное антитело по настоящему

30 изобретению является триспецифичным антителом, которое представляет собой антитело, способное специфически связываться с тремя различными типами антигенов. То есть в некоторых вариантах мультиспецифичное антитело по настоящему изобретению представляет собой триспецифичное антитело, способное связываться с CD3 и CD137 и связывается либо с CD3, либо с CD137,

т.е. оно не связывается одновременно с обоими антигенами CD3 и CD137, а также способно специфически связываться с CLDN6.

Класс антитела

5 Термин «класс» антитела относится к типу консервативного домена или консервативной области, которые содержит его тяжелая цепь. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно дополнительно разделить на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Консервативные домены тяжелой цепи, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, называются альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно.

10 Если не указано иное, аминокислотные остатки в консервативной области легкой цепи пронумерованы в данном контексте в соответствии со статьей Kabat и др., а нумерация аминокислотных остатков в консервативной области тяжелой цепи соответствует системе нумерации ЕС, также называемой ЕС индексом, как описано в книге Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е изд. Служба общественного здравоохранения, Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд, 1991.

Каркасные участки

20 Термин «каркасные участки» или «FR» относится к остаткам переменного домена, отличающимся от остатков гиперпеременной области (HVR). FR переменного домена обычно состоит из четырех доменов FR: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности HVR и FR обычно присутствуют в следующей последовательности в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Консенсусные участки человека

25 Термин «консенсусные участки человека» представляет собой участок, в котором представлены наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в выбранных последовательностях участка VL или VH иммуноглобулина человека. Обычно последовательности VL или VH человеческого иммуноглобулина выбирают из подгруппы последовательностей переменного домена. В основном подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу, как указано в книге Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е издание, NIH Publication 91-3242, Бетесда, Мэриленд, том 1-3 (1991). В одном варианте подгруппа для VL представляет собой

подгруппу каппа I, как описано в книге Kabat и др., см. выше. В одном варианте подгруппа для VH представляет собой подгруппу III, как указано в книге Kabat и др., см. выше.

Химерное антитело

5 Термин «химерное» антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из определенного источника или вида, тогда как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи получена из другого источника или вида. Аналогичным образом, термин «вариабельный домен химерного антитела» относится к вариабельной области антитела, в которой
10 часть вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи получена из конкретного источника или вида, в то время как остальной участок вариабельной области тяжелой и/или легкой цепи получен из другого источника или вида.

Гуманизированное антитело

15 Термин «гуманизированное» антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки нечеловеческих HVR и аминокислотные остатки FR человека. В некоторых вариантах гуманизированное антитело будет содержать в значительной мере все из по меньшей мере одного, а обычно двух вариабельных доменов, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют таковым в нечеловеческом антителе, и все или практически
20 все FR соответствуют таковым в человеческом антителе. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть консервативной области антитела, полученную из человеческого антитела. Термин «гуманизированная форма» антитела, например, нечеловеческое антитело, относится к антителу, которое подверглось гуманизации. Термин
25 «вариабельная область гуманизированного антитела» относится к вариабельной области гуманизированного антитела.

Человеческое антитело

30 «Человеческое антитело» представляет собой антитело, которое включает аминокислотную последовательность, которая соответствует последовательности антитела, продуцируемого человеком или человеческой клеткой или полученного из нечеловеческого источника, в котором используются репертуары человеческих антител или другие последовательности, кодирующие человеческие антитела. Это определение человеческого антитела конкретно исключает гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие

антигенсвязывающие остатки. Термин «вариабельная область человеческого антитела» относится к вариабельной области человеческого антитела.

Полинуклеотид (нуклеиновая кислота)

Термины «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота», используемые в
данном контексте взаимозаменяемо, относятся к полимерам нуклеотидов любой
5 длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой
дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или
основания и/или их аналоги или любой субстрат, который можно включать в
полимер с помощью ДНК- или РНК-полимеразы или с помощью синтетической
10 реакции. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды,
такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Последовательность
нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами.
Полинуклеотид может содержать модификацию(и), проведенную(ые) после
синтеза, такую как конъюгация с меткой. Другие типы модификаций включают,
15 например, «кэпы», замену одного или нескольких природных нуклеотидов с
использованием аналога, межнуклеотидные модификации, такие как, например,
модификации с незаряженными связями (например, метилфосфонаты,
фосфотриэфиры, фосфорамидаты, карбаматы и т. д.) и с заряженными связями
(например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т. д.), типы, содержащие
20 боковые фрагменты, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины,
антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т. д.), содержащие
интеркаляторы (например, акридин, псорален и т. д.), содержащие хелаторы
(например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т.
д.), содержащие алкилаторы, типы с модифицированными шивками (например,
25 альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.), а также немодифицированные
формы полинуклеотида(ов). Кроме того, любую из гидроксильных групп,
обычно присутствующих в сахарах, можно заменить, например, фосфонатными
группами, фосфатными группами, защищена стандартными защитными
группами или активирована для получения дополнительных связей с
30 дополнительными нуклеотидами, или ее можно конъюгировать с твердыми или
полутвердыми подложками. 5'- и 3'-концевые ОН-группы можно
фосфорилировать или замещать аминами или фрагментами органических
блокирующих групп, содержащими от 1 до 20 атомов углерода. Другие
гидроксилы также можно преобразовать в стандартные защитные группы.

Полинуклеотиды могут также содержать аналогичные формы сахаров рибозы или дезоксирибозы, которые общеизвестны в данной области техники, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидо-рибозу, аналоги карбоциклических сахаров, альфа-аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогептулозы, ациклические аналоги и основные аналоги нуклеозидов, такие как метилрибозид. Одну или несколько фосфодиэфирных связей можно заменить альтернативными связывающими группами. Эти альтернативные связывающие группы включают, но не ограничиваются только ими, варианты, где фосфат заменен на P(O)S («тиоат»), P(S)S («дитиоат»), (O)NR₂ («амидат»), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ («формацеталь»), в которых каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 атомов C), необязательно содержащий простую эфирную (-O-) связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не все связи в полинуклеотиде обязательно должны быть идентичными. Предшествующее описание применимо ко всем полинуклеотидам, упомянутым в данном контексте, включая РНК и ДНК.

Изолированная (нуклеиновая кислота)

«Изолированная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, которая была отделена от компонента ее природного окружения. Изолированная молекула нуклеиновой кислоты дополнительно включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует внехромосомно или в положении на хромосоме, отличающимся от ее природного расположения в хромосоме.

Вектор

Термин «вектор», используемый в данном контексте, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной размножить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Этот термин включает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Определенные векторы способны управлять экспрессией нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном контексте «векторами экспрессии». Векторы можно вводить в клетки-хозяина с помощью вируса или

электропорации. Однако введение векторов не ограничивается методом *in vitro*. Например, векторы также можно ввести субъекту непрямо с использованием метода *in vivo*.

Клетка-хозяин

5 Термины «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяина» и «культура клеток-хозяина» используются взаимозаменяемо и относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяина включают «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первично трансформированную клетку и полученное от нее
10 потомство, независимо от количества пассажей. Потомство может не являться полностью идентичным родительской клетке по содержанию нуклеиновых кислот, но может содержать мутации. Мутантное потомство, которое проявляет ту же функцию или биологическую активность, что и подвергнутая скринингу или отбору исходно трансформированная клетка, включено в данный контекст.

15 Специфичность

Термин «специфичность» означает, что молекула, которая специфически связывается с одним или несколькими партнерами по связыванию, не проявляет
какого-либо значительного связывания с молекулами, отличающимися от партнеров. Кроме того, термин «специфичность» также используется, когда
20 антигенсвязывающий сайт специфичен к определенному эпитопу из множества эпитопов, содержащихся в антигене. Если антигенсвязывающая молекула специфически связывается с антигеном, такое явление описывают словосочетанием «антигенсвязывающая молекула обладает/проявляет специфичность по отношению к/к антигену». Когда эпитоп, связанный
25 антигенсвязывающим сайтом, содержится во множестве различных антигенов, антигенсвязывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий сайт, может связываться с различными антигенами, содержащими этот эпитоп.

Фрагмент антитела

30 Термин «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличающейся от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются только ими, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител (например, scFv) и однодоменные антитела. Обзор некоторых

фрагментов антител приведен в статье Hudson и др., *Nat. Med.*, 9, 129-134 (2003). Обзор фрагментов scFv приведен, например, в статье Pluckthun, в книге «*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*», том 113, изд. Розенбурга и Мура, Springer-Verlag, Нью-Йорк, стр. 269-315 (1994), см. также международную заявку WO 93/16185 и патенты США № 5571894 и 5587458. Описание фрагментов Fab и F(ab')₂, содержащих остатки эпитопов, связывающихся с рецептором реутилизации и характеризующихся увеличенным периодом полувыведения *in vivo*, см. в патенте США № 5869046. Диатела представляют собой фрагменты антител с двумя сайтами связывания антигена, которые могут быть двухвалентными или биспецифичными. См., например, европейский патент EP 404097, международную заявку WO 1993/01161, статьи Hudson и др., *Nat. Med.*, 9, 129-134 (2003) и Hollinger и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6444-6448 (1993). Триатела и тетратела также описаны в статье Hudson и др., *Nat. Med.*, 9, 129-134 (2003). Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антитела, содержащие весь или часть переменного домена тяжелой цепи или весь или часть переменного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека (фирма Domantis, Inc., Уолтем, Массачусетс, см., например, патент США № 6248516 B1). Фрагменты антител можно получить различными методами, включающими, но не ограничиваясь только ими, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продуцирование рекомбинантными клетками-хозяина (например, *E. coli* или фагом), как описано в данном контексте.

Варибельный фрагмент (Fv)

В данном контексте термин «варибельный фрагмент (Fv)» относится к минимальной единице полученного из антитела антигенсвязывающего сайта, которая состоит из пары, включающей переменную область легкой цепи антитела (VL) и переменную область тяжелой цепи антитела (VH). В 1988 году авторами Skerra и Pluckthun было установлено, что гомогенные и активные антитела можно получить из периплазматической фракции *E. coli* с использованием вставки гена антитела в 5'-3'-направлении бактериальной сигнальной последовательности и индуцирования экспрессии гена в *E. coli* (см. статью в *Science*, 240 (4855), 1038-1041 (1988)). В фрагменте Fv, полученном из

фракции периплазмы, VH связывается с VL таким образом, что связывается с антигеном.

scFv, одноцепочечные антитела и sc(Fv)₂

В данном контексте термины «scFv», «одноцепочечное антитело» и
 5 «sc(Fv)₂» все относятся к фрагменту антитела с одной полипептидной цепью,
 которая содержит переменные области, полученные из тяжелой и легкой
 цепей, но не консервативную область. В целом, одноцепочечное антитело также
 содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который
 10 обеспечивает образование требуемой структуры, которая, как считается,
 обеспечивает связывание антигена. Одноцепочечные антитела подробно
 обсуждаются в книге Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies",
 том 113, Rosenberg и Moore, изд., Springer-Verlag, Нью-Йорк, 269-315 (1994).
 См. также международную заявку WO 1988/001649, патенты США № 4946778 и
 15 5260203. В конкретном варианте осуществления изобретения одноцепочечное
 антитело может являться биспецифичным и/или гуманизированным.

scFv представляет собой одноцепочечное низкомолекулярное антитело, в
 котором VH и VL, образующие Fv, связаны вместе пептидным линкером (см.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85(16), 5879-5883 (1988)). VH и VL могут
 удерживаться в непосредственной близости с помощью пептидного линкера.

20 sc(Fv)₂ представляет собой одноцепочечное антитело, в котором четыре
 переменные области двух VL и двух VH связаны линкерами, такими как
 пептидные линкеры, с образованием одной цепи (см. статью в J. Immunol.
 Methods, 231(1-2), 177-189 (1999)). Две VH и две VL можно получить из разных
 моноклональных антител. Такое sc(Fv)₂ предпочтительно включает, например,
 25 биспецифичное sc(Fv)₂, которое распознает два эпитопа, присутствующих в
 одном антигене, как описано в статье Journal of Immunology, 152(11), 5368-5374
 (1994). sc(Fv)₂ можно получить способами, известными специалистам в данной
 области техники. Например, sc(Fv)₂ можно получить при связывании scFv с
 помощью линкера, такого как пептидный линкер.

30 В данном контексте sc(Fv)₂ включает две единицы VH и две единицы VL,
 которые расположены в порядке VH, VL, VH и VL ([VH]-линкер-[VL]-линкер-
 [VH]-линкер- [VL]), начиная с N-конца одноцепочечного полипептида. Порядок
 двух единиц VH и двух единиц VL не ограничивается вышеуказанной формой, и

они могут быть расположены в любом порядке. Примеры формы приведены ниже.

[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VH]-линкер-[VL]

[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VL]-линкер-[VH]

5 [VH]-линкер-[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VL]

[VL]-линкер-[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VH]

[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VH]

Молекулярная форма $sc(Fv)_2$ также подробно описана в международной заявке WO 2006/132352. Согласно этим описаниям специалисты в данной области техники могут соответствующим образом получить требуемый $sc(Fv)_2$ с целью синтеза полипептидных комплексов, раскрытых в данном контексте.

Кроме того, антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению можно конъюгировать с полимером-носителем, таким как ПЭГ, или органическим соединением, таким как противоопухолевый агент. В другом варианте дополнительную последовательность сахарной цепи предпочтительно встраивают в антигенсвязывающие молекулы или антитела таким образом, чтобы сахарная цепь оказывала требуемый эффект.

Линкеры, используемые для связывания переменных областей антитела, включают произвольные пептидные линкеры, которые можно вводить методами генной инженерии, синтетические линкеры и линкеры, раскрытые, например, в книге Protein Engineering, 9(3), 299-305 (1996). Однако в настоящем описании предпочтительными являются пептидные линкеры. Длина пептидных линкеров конкретно не ограничена и можно выбрать специалистами в данной области техники в соответствии с целью. Длина предпочтительно составляет пять или более аминокислот (без особых ограничений, верхний предел обычно составляет 30 аминокислот или менее, предпочтительно 20 аминокислот или менее), и особенно предпочтительно 15 аминокислот. Когда $sc(Fv)_2$ содержит три пептидных линкера, их длину можно выбрать одинаковой или различной.

Например, такие пептидные линкеры включают:

30 Ser,

Gly-Ser,

Gly-Gly-Ser,

Ser-Gly-Gly,

Gly-Gly-Gly-Ser (с последовательностью SEQ ID NO: 171),

Ser-Gly-Gly-Gly (с последовательностью SEQ ID NO: 172),
 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (с последовательностью SEQ ID NO: 173),
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (с последовательностью SEQ ID NO: 174),
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (с последовательностью SEQ ID NO: 175),
 5 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (с последовательностью SEQ ID NO: 176),
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (с последовательностью SEQ ID NO: 177),
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (с последовательностью SEQ ID NO: 178),
 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (с последовательностью SEQ ID NO: 173))*n* и
 (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (с последовательностью SEQ ID NO: 174))*n*,
 10 где *n* представляет собой целое число, равное 1 или более. Длину или
 последовательности пептидных линкеров можно выбрать специалистами в
 данной области техники в зависимости от цели.

Синтетические линкеры (химические сшивающие агенты) обычно используются для сшивания пептидов, и примеры включают:

15 N-гидроксисукцинимид (NHS),
 дисукцинимидилсуберат (DSS),
 бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS3),
 дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP),
 дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP),
 20 бис(сукцинимидилсукцинат) этиленгликоля (EGS),
 бис(сульфосукцинимидилсукцинат) этиленгликоля (sulfo-EGS),
 дисукцинимидилтартрат (DST), дисульфосукцинимидилтартрат (sulfo-DST),
 бис[2-(сукцинимидоксикарбонилокси)этил]сульфон (BSOCOES) и
 бис[2-(сульфосукцинимидоксикарбонилокси)этил]сульфон (sulfo-
 25 BSOCOES). Эти сшивающие агенты выпускаются разными фирмами.

Обычно для связывания четырех переменных областей антитела вместе требуются три линкера. Линкеры, которые можно использовать, могут представлять собой один и тот же тип или различные типы.

Fab, F(ab')₂ и Fab'

30 «Fab» состоит из одной легкой цепи, а также домена CH1 и переменной области из одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидные связи с другой молекулой тяжелой цепи.

«F(ab')₂» или «Fab» получают при обработке иммуноглобулина (моноклонального антитела) протеазой, такой как пепсин и папаин, и эти

фрагменты относятся к фрагменту антитела, полученному при расщеплении иммуноглобулина (моноклонального антитела) вблизи дисульфидных связей, присутствующих между шарнирными областями в каждой из двух Н-цепей. Например, папаин расщепляет в 3'-5' направлении дисульфидные связи в IgG, присутствующие между шарнирными областями в каждой из двух Н-цепей, с образованием двух гомологичных фрагментов антитела, в которых L-цепь содержит VL (вариабельная область L-цепи) и CL (консервативная область L-цепи), связанных с фрагментом Н-цепи, содержащим VH (вариабельная область Н-цепи) и CH1 (область гамма 1 в консервативной области Н-цепи) через дисульфидную связь в их С-концевых областях. Каждый из этих двух гомологичных фрагментов антитела называется Fab'.

«F(ab')₂» состоит из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, содержащих консервативную область домена CH1 и часть доменов CH2, так что между двумя тяжелыми цепями образуются дисульфидные связи. Раскрытый в данном контексте F(ab')₂ предпочтительно можно получить следующим образом. Полноразмерное моноклональное антитело или такое антитело, содержащее требуемый антигенсвязывающий сайт, частично расщепляется протеазой, такой как пепсин, и Fc-фрагменты удаляют методом адсорбции на колонке с белком А. Выбор протеазы особо не ограничен, при условии, что она может селективно расщеплять полноразмерное антитело с образованием F(ab')₂ в пригодных условиях ферментативной реакции, таких как рН. Такие протеазы включают, например, пепсин и фицин.

Fc-область

Термин «Fc-область» или «Fc домен» относится к области, содержащей фрагмент, состоящий из шарнира или его части и доменов CH2 и CH3 в молекуле антитела. Fc-область класса IgG означает, но не ограничивается только ими, область от, например, цистеина 226 (нумерация ЕС (также называемая индексом ЕС в данном контексте)) до С-конца или пролина 230 (нумерация ЕС) до С-конца. Fc-область предпочтительно можно получить с использованием частичного расщепления, например, моноклональных антител IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 протеолитическим ферментом, таким как пепсин, с последующим повторным элюированием фракции, адсорбированной на колонке с белком А или колонке с белком G. Такой протеолитический фермент не ограничивается при условии, что фермент способен расщеплять полноразмерное антитело с

образованием исключительно Fab или $F(ab')_2$ в пригодных условиях реакции для фермента (например, рН). Такие примеры могут включать пепсин и папаин.

5 Fc-область, полученную, например, из природного IgG, можно использовать в качестве «Fc-области» по настоящему изобретению. В данном контексте природный IgG означает полипептид, который содержит
10 аминокислотную последовательность, идентичную природной последовательности IgG, и принадлежит к классу антител, в значительной мере кодируемых геном иммуноглобулина гамма. Природный человеческий IgG означает, например, природный человеческий IgG1, природный человеческий
15 IgG2, природный человеческий IgG3 или природный человеческий IgG4. Природный IgG также включает варианты или им подобные формы, непосредственно полученные из него. Множество аллотипических последовательностей, основанных на генном полиморфизме, описаны как консервативные области антител IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека и
20 антител IgG4 человека в книге «Sequences of proteins of immunological interest», публикация NIH № 91-3242, любая из которых может использоваться в настоящем изобретении. Прежде всего последовательность человеческого IgG1 может содержать DEL или EEM в виде аминокислотной последовательности, положения 356 - 358 по нумерации ЕС.

20 В некоторых вариантах Fc-домен мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы состоит из пары полипептидных цепей, содержащих домены тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина. Например, Fc-домен молекулы иммуноглобулина G (IgG) представляет собой димер, каждая субъединица которого содержит консервативные домены CH2 и CH3 тяжелой цепи IgG. Две
25 субъединицы Fc-домена способны стабильно ассоциироваться друг с другом. В одном варианте мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная в данном контексте, содержит не более одного Fc-домена.

В одном варианте, описанном в данном контексте, Fc-домен мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы представляет собой Fc-
30 домен IgG. В конкретном варианте Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1. В другом варианте Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1. В дополнительном конкретном варианте осуществления Fc-домен представляет собой Fc-область человеческого IgG1.

В одном аспекте изобретения мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащиеся в противоопухолевом агенте, фармацевтической композиции, комбинации или в наборе по настоящему изобретению или используемые в способе или при применении по настоящему изобретению, дополнительно включают

(iii) Fc-домен, который проявляет пониженную аффинность при связывании с гамма-рецептором Fc человека по сравнению с природным Fc-доменом человеческого IgG1,

где Fc-домен содержит (e1) или (e2), как описано ниже:

(e1) первая субъединица Fc-области, содержащая Cys в положении 349, Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407, и вторая субъединица Fc-области, содержащая Cys в положении 354 и Trp в положении 366;

(e2) первая субъединица Fc-области, содержащая Glu в положении 439, и вторая субъединица Fc-области, содержащая Lys в положении 356; где положения аминокислот пронумерованы в соответствии с индексом ЕС.

В одном аспекте изобретения мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащиеся в противоопухолевом средстве, фармацевтической композиции, комбинации или в наборе по настоящему изобретению или используемые в способе или при применении по настоящему изобретению, дополнительно включают

(iii) Fc-домен, который проявляет пониженную аффинность при связывании с гамма-рецептором Fc человека по сравнению с природным Fc-доменом человеческого IgG1,

где первая и/или вторая субъединица Fc-области, содержащаяся в Fc-домене, содержит (f1) или (f2), как описано ниже:

(f1) Ala в положении 234 и Ala в положении 235;

(f2) Ala в положении 234, Ala в положении 235 и Ala в положении 297;

где положения аминокислот пронумерованы в соответствии с индексом ЕС.

В одном аспекте изобретения мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащиеся в противоопухолевом агенте, фармацевтической композиции, комбинации или наборе по настоящему изобретению или используемые в способе или при применении по настоящему изобретению, дополнительно включают

(iii) Fc-домен, который проявляет пониженную аффинность при связывании с гамма-рецептором Fc человека по сравнению с природным Fc-доменом человеческого IgG1,

5 где Fc-домен дополнительно проявляет более высокую аффинность при связывании FcRn с FcRn человека по сравнению с природным Fc-доменом человеческого IgG1.

10 В одном аспекте изобретения мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы, содержащиеся в противоопухолевом агенте, фармацевтической композиции, комбинации или наборе по настоящему изобретению или используемые в способе или при применении по настоящему изобретению, дополнительно включают

(iii) Fc-домен, который проявляет пониженную аффинность при связывании с гамма-рецептором Fc человека по сравнению с природным Fc-доменом человеческого IgG1,

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

где положения аминокислот пронумерованы в соответствии с индексом ЕС.

20 В одном аспекте изобретения химиотерапевтический агент и мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная выше, используются в комбинации в противоопухолевом агенте, фармацевтической композиции, комбинации, наборе, способе или при применении по настоящему изобретению. В одном из вариантов препарат платины и мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная выше, используются в комбинации. В 25 конкретном варианте карбоплатин или цисплатин и мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная выше, используются в комбинации. В некоторых вариантах алкалоид и мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная выше, используются в комбинации. В некоторых вариантах осуществления растительный алкалоид и мультиспецифичная 30 антигенсвязывающая молекула, описанная выше, используются в комбинации. В некоторых вариантах ингибитор топоизомеразы и мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная выше, используются в комбинации. В некоторых вариантах иринотекан и мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная выше, используются в комбинации. В некоторых вариантах

антиметаболит и мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная выше, используются в комбинации. В некоторых вариантах осуществления гемцитабин и мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная выше, используются в комбинации.

5 В одном аспекте изобретения ингибитор иммунной контрольной точки и мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная выше, используются в комбинации в противоопухолевом агенте, фармацевтической композиции, комбинации, наборе, способе или при применении по настоящему изобретению. В некоторых вариантах антитело против PD-L1 и
10 мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная выше, используются в комбинации.

В одном объекте изобретения ингибитор PARP и мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная выше, используются в комбинации в противоопухолевом агенте, фармацевтической композиции, комбинации, наборе,
15 способе или при применении по настоящему изобретению. В некоторых вариантах олапариб и мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная выше, используются в комбинации.

Fc-область с пониженной активностью связывания Fc-рецептора (Fc-гамма-рецептора)

20 В некоторых вариантах Fc-домен мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул, описанных в данном контексте, проявляет пониженную аффинность при связывании с Fc-рецептором по сравнению с природным Fc-доменом IgG1. В одном таком варианте Fc-домен (или мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащая указанный Fc-
25 домен) проявляет менее 50%, предпочтительно менее 20%, более предпочтительно менее 10% и наиболее предпочтительно менее 5% аффинности при связывании с Fc-рецептором по сравнению с природным Fc-доменом IgG1 (или мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулой, содержащей природный Fc-домен IgG1). В одном варианте Fc-домен (или
30 мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащая указанный Fc-домен) в основном не связывается с Fc-рецептором. В конкретном варианте Fc-рецептор представляет собой Fc-гамма-рецептор. В одном варианте рецептор Fc представляет собой Fc-рецептор человека. В одном варианте Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте Fc-

рецептор представляет собой активирующий человеческий Fc-гамма-рецептор, более конкретно человеческий Fc-гамма RIIIa, Fc-гамма RI или Fc-гамма RIIa, наиболее конкретно человеческий Fc-гамма RIIIa.

5 В некоторых вариантах Fc-домен мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы содержит одну или несколько аминокислотных мутаций, которые снижают аффинность при связывании Fc-домена с Fc-рецептором. Обычно одна и та же мутация одной или нескольких аминокислот присутствует в каждой из двух субъединиц Fc-домена. В одном варианте аминокислотная мутация снижает аффинность при связывании Fc-домена с Fc-рецептором. В одном варианте 10 аминокислотная мутация снижает аффинность при связывании Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз или по меньшей мере в 10 раз. В вариантах, где присутствует более одной аминокислотной мутации, которая снижает аффинность при связывании Fc-домена с Fc-рецептором, комбинация этих аминокислотных мутаций может снизить 15 аффинность при связывании Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, или даже по меньшей мере в 50 раз. В одном варианте мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащая сконструированный Fc-домен, проявляет менее 20%, прежде всего менее 10%, более конкретно менее 5% аффинности при связывании с Fc-рецептором по сравнению с мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулой, содержащей 20 неинженерный Fc-домен. В конкретном варианте Fc-рецептор представляет собой Fc-гамма-рецептор. В некоторых вариантах Fc-рецептор представляет собой Fc-рецептор человека. В некоторых вариантах Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте Fc-рецептор 25 представляет собой активирующий человеческий Fc-гамма-рецептор, более конкретно человеческий Fc-гамма RIIIa, Fc-гамма RI или Fc-гамма RIIa, наиболее конкретно человеческий Fc-гамма RIIIa. Предпочтительно снижение связывания с каждым из этих рецепторов.

В одном варианте аминокислотная мутация, которая снижает аффинность 30 при связывании Fc-домена с Fc-рецептором, представляет собой аминокислотную замену. В одном варианте Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы E233, L234, L235, N297, P331 и P329. В более конкретном варианте Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы L234, L235 и P329. В некоторых вариантах Fc-

домен содержит аминокислотные замены L234A и L235A. В одном из таких вариантов Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1, прежде всего Fc-домен IgG1 человека. В одном варианте Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении P329. В более конкретном варианте аминокислотная замена
5 представляет собой P329A или P329G, предпочтительно P329G. В одном варианте Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении P329 и дополнительную аминокислотную замену в положении, выбранном из E233, L234, L235, N297 и P331. В более конкретном варианте дополнительная аминокислотная замена представляет собой E233P, L234A, L235A, L235E,
10 N297A, N297D или P331S. В конкретных вариантах Fc-домен содержит аминокислотные замены в положениях P329, L234 и L235. В более конкретных вариантах Fc-домен содержит аминокислотные мутации L234A, L235A и P329G («P329G LALA»). В одном из таких вариантов Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1, прежде всего Fc-домен IgG1 человека. Комбинация аминокислотных
15 замен «P329G LALA» почти полностью устраняет связывание гамма- Fc-рецептора (а также комплемента) с Fc-доменом человеческого IgG1, как описано в международной заявке № WO 2012/130831. В международной заявке WO 2012/130831 также описаны способы получения таких мутантных Fc-доменов и способы определения их свойств, таких как связывание Fc-рецептора или
20 эффекторные функции.

Антитела IgG4 проявляют пониженную аффинность при связывании с Fc-рецепторами и пониженные эффекторные функции по сравнению с антителами IgG1. Следовательно, в некоторых вариантах Fc-домен биспецифических антигенсвязывающих молекул, активирующих Т-клетки, описанных в данном
25 контексте, представляет собой Fc-домен IgG4, прежде всего Fc-домен человеческого IgG4. В одном варианте Fc-домен IgG4 содержит аминокислотные замены в положении S228, прежде всего аминокислотную замену S228P. Для дальнейшего снижения аффинности при связывании с рецептором Fc и/или его эффекторной функции в одном варианте Fc-домен IgG4 содержит
30 аминокислотную замену в положении L235, прежде всего аминокислотную замену L235E. В другом варианте Fc-домен IgG4 содержит аминокислотную замену в положении P329, прежде всего аминокислотную замену P329G. В конкретном варианте Fc-домен IgG4 содержит аминокислотные замены в положениях S228, L235 и P329, прежде всего аминокислотные замены S228P,

L235E и P329G. Такие мутанты Fc-домена IgG4 и их свойства связывания с гамма-Fc-рецептором описаны в международной заявке № WO 2012/130831.

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

В особенно предпочтительном варианте Fc-домен, проявляющий пониженную аффинность при связывании с Fc-рецептором по сравнению с природным Fc-доменом IgG1, представляет собой Fc-домен человеческого IgG1, содержащий аминокислотные замены L234A, L235A и N297A.

Мутантные Fc-домены можно получить с использованием делеции, замещения, вставки или модификации аминокислоты с использованием генетических или химических методов, хорошо известных в данной области техники. Генетические методы могут включать сайт-специфический мутагенез кодирующей последовательности ДНК, ПЦР, синтез генов и т.п. Правильность изменения нуклеотидов можно проверить, например, с использованием секвенирования.

Связывание с Fc-рецепторами можно легко определить, например, с помощью методов ИФА или поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием стандартного оборудования, такого как прибор VIAcore (фирмы GE Healthcare), и с использованием Fc-рецепторов, которые можно получить методом рекомбинантной экспрессии. Пригодный анализ связывания описан в данном контексте. В другом варианте аффинность при связывании Fc-доменов или активирующих клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих Fc-домен для Fc-рецепторов, можно оценить с использованием клеточных линий, которые, как известно, экспрессируют определенные Fc-рецепторы, такие как НК-клетки человека, экспрессирующие Fc-гамма-рецептор IIIa.

Fc-рецептор

Термин «Fc-рецептор» или «FcR» относится к рецептору, который связывается с Fc-областью антитела. В некоторых вариантах FcR представляет собой природный человеческий FcR. В некоторых вариантах FcR представляет собой рецептор, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов Fc гамма RI, Fc гамма RII и Fc гамма RIII, включая

аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы Fc-гамма-RII включают Fc-гамма-RIIA («активирующий рецептор») и Fc-гамма-RIIB («ингибирующий рецептор»), которые содержат сходные аминокислотные последовательности, различающиеся главным образом своими цитоплазматическими доменами. Активирующий Fc-гамма-рецептор RIIA содержит мотив активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий Fc-гамма-рецептор RIIB содержит мотив ингибирования на основе тирозина иммунорецептора (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см., например, статью Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). FcR рассматриваются, например, в статьях Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991), Capel и др., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994) и de Haas и др., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, описаны в данном контексте термином «FcR».

Термин «Fc-рецептор» или «FcR» также включает неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (см. статьи Guyer и др. *J. Immunol.*, 117:587 (1976) и Kim и др., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)) и за регуляцию гомеостаза иммуноглобулинов. Известны способы оценки связывания с FcRn (см., например, статьи Ghetie и Ward., *Immunol. Today*, 18(12):592-598 (1997), Ghetie и др., *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997), Hinton и др., *J. Biol. Chem.*, 279(8):6213-6216 (2004), международную заявку WO 2004/92219 (Hinton и др.).

Связывание с FcRn человека *in vivo* и период полувыведения в плазме полипептидов, связывающих FcRn человека с высоким сродством, можно анализировать, например, на трансгенных мышах или трансфицированных линиях клеток человека, экспрессирующих FcRn человека, или на приматах, которым вводят полипептиды с вариантом области Fc. В международной заявке WO 2000/42072 (Presta) описаны варианты антител с повышенным или пониженным связыванием с FcR. См. также, например, статью Shields и др., *J. Biol. Chem.*, 9(2):6591-6604 (2001).

Fc-гамма-рецептор

Термин «Fc-гамма-рецептор» относится к рецептору, способному связываться с Fc-доменом моноклональных антител IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, и включает все члены, принадлежащие к семейству белков, преимущественно

кодируемых геном Fc-гамма-рецептора. У человека это семейство включает Fc-гамма RI (CD64), включая изоформы Fc-гамма RIa, Fc-гамма RIb и Fc-гамма RIc, Fc-гамма RII (CD32), включая изоформы Fc-гамма RIIa (включая аллотипы H131 и R131), Fc-гамма RIIb (включая Fc-гамма RIIb-1 и Fc-гамма RIIb-2) и Fc-гамма RIIc и Fc-гамма RIII (CD16), включая изоформу Fc-гамма RIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и Fc-гамма RIIIb (включая аллотипы Fc-гамма RIIIb-NA1 и Fc-гамма RIIIb-NA2), а также все неидентифицированные человеческие Fc-гамма-рецепторы, изоформы Fc-гамма-рецепторов и их аллотипы. Однако Fc-гамма-рецептор не ограничивается приведенными примерами. Не ограничиваясь ими, Fc-гамма-рецептор включает рецепторы, полученные от человека, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Fc-гамма-рецептор можно получить из любых организмов. Мышиный Fc-гамма-рецептор включает, не ограничиваясь ими, Fc-гамма RI (CD64), Fc-гамма RII (CD32), Fc-гамма RIII (CD16) и Fc-гамма RIII-2 (CD16-2), а также все неидентифицированные мышинные рецепторы, Fc-гамма-рецепторы, изоформы Fc-гамма-рецепторов и их аллотипы. Такие предпочтительные Fc-гамма-рецепторы включают, например, человеческие Fc-гамма RI (CD64), Fc-гамма RIIA (CD32), Fc-гамма RIIВ (CD32), Fc-гамма RIIIA (CD16) и/или Fc-гамма RIIВ (CD16). Полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RI указаны под номером доступа RefSeq NM_000566.3 и номером доступа RefSeq NP_000557.1 соответственно, полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RIIA указаны под номером доступа RefSeq BC020823.1 и номером доступа RefSeq AAN20823.1 соответственно, полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RIIВ указаны под номером доступа RefSeq BC146678.1 и номером доступа RefSeq AAI46679.1 соответственно, полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RIIIA указаны под номером доступа RefSeq BC033678.1 и номером доступа RefSeq AAN33678.1 соответственно, а также полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RIIВ указаны под номером доступа RefSeq BC128562.1 и номером доступа RefSeq AAI28563.1 соответственно. Обладает ли Fc-гамма-рецептор активностью при связывании с Fc-доменом моноклонального антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, можно оценить методом скрининга ALPHA (Amplified Luminescent Proximity

Homogeneous Assay), методом BIACORE на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и другими методами (см. статью Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103(11), 4005-4010 (2006)), кроме описанных выше форматов FACS и ИФА.

5 Вместе с тем, термин «Fc-лиганд» или «эффекторный лиганд» относится к молекуле и предпочтительно к полипептиду, который связывается с Fc-доменом антитела, образуя комплекс Fc/Fc-лиганд. Молекулу можно получить из любых организмов. Связывание Fc-лиганда с Fc предпочтительно индуцирует одну или несколько эффекторных функций. Такие Fc-лиганды включают, но не ограничиваясь только ими, Fc-рецепторы, Fc-гамма-рецептор, Fc-альфа-рецептор, Fc-бета-рецептор, FcRn, C1q и C3, маннан-связывающий лектин, 10 рецептор маннозы, белок А стафилококка, белок G стафилококка и вирусные Fc-гамма-рецепторы. Fc-лиганды также включают гомологи Fc-рецептора (FcRH) (см. статью Davis и др., Immunological Reviews, 190, 123-136 (2002)), которые представляют собой семейство Fc-рецепторов, гомологичных Fc-гамма-рецептору. Fc-лиганды также включают неидентифицированные молекулы, 15 которые связываются с Fc.

Активность связывания Fc-гамма-рецепторов

Нарушение связывающей активности Fc-домена с любым из рецепторов Fc-гамма, Fc-гамма RI, Fc-гамма RIIA, Fc-гамма RIIIB, Fc-гамма RIIIA и/или Fc-гамма RIIIB можно оценить с использованием описанных выше форматов FACS 20 и ELISA, а также с помощью ALPHA-скрининга (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) и метода BIACORE на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (см. статью Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103(11), 4005-4010 (2006)).

25 ALPHA-скрининг проводят по технологии ALPHA по описанному ниже принципу с использованием двух типов гранул: донорных и акцепторных. Люминесцентный сигнал детектируют только тогда, когда молекулы, связанные с гранулами-донорами, биологически взаимодействуют с молекулами, связанными с гранулами-акцепторами, и когда две гранулы расположены в 30 непосредственной близости. Возбуждаемый лазерным лучом фотосенсибилизатор в донорной грануле преобразует кислород вокруг гранулы в возбужденный синглетный кислород. Когда синглетный кислород диффундирует вокруг гранул-доноров и достигает расположенные в непосредственной близости гранулы-акцепторы, внутри акцепторных гранул индуцируется

хемилюминесцентная реакция. Эта реакция в конечном итоге приводит к излучению света. Если молекулы, связанные с гранулами-донорами, не взаимодействуют с молекулами, связанными с гранулами-акцепторами, синглетный кислород, вырабатываемый гранулами-донорами, не достигает гранул-акцепторов и хемилюминесцентная реакция не происходит.

Например, меченная биотином антигенсвязывающая молекула или антитело иммобилизуют на донорных гранулах, а меченный глутатион-S-трансферазой (GST) Fc-гамма-рецептор иммобилизуют на акцепторных гранулах. В отсутствие антигенсвязывающей молекулы или антитела, содержащего конкурентный мутантный Fc-домен, Fc-гамма-рецептор взаимодействует с антигенсвязывающей молекулой или антителом, содержащим Fc-домен дикого типа, в результате индуцируя сигнал в диапазоне от 520 до 620 нм. Антигенсвязывающая молекула или антитело, содержащая немеченый мутантный Fc-домен, конкурирует с антигенсвязывающей молекулой или антителом, содержащим Fc-домен дикого типа, за взаимодействие с Fc-гамма-рецептором.

Относительную аффинность связывания можно определить методом количественной оценки снижения флуоресценции в результате конкуренции. Известны способы биотинилирования антигенсвязывающих молекул или антител, таких как антитела, с использованием сульфо-NHS-биотина или подобных агентов. Пригодные способы включения метки GST в Fc-гамма-рецептор включают такие методы, как слияние полипептидов, кодирующих Fc-гамма-рецептор, и GST в рамке считывания, экспрессию слитого гена с использованием клеток с введенным вектором, несущим этот ген, и последующую очистку с использованием колонки с глутатионом. Индуцированный сигнал предпочтительно можно анализировать, например, при подборе данных в «модели конкуренции за один сайт», основанной на нелинейном регрессионном анализе, с использованием такого программного обеспечения, как GRAPHPAD PRISM (от фирмы GraphPad, Сан-Диего).

Одно из веществ с целью наблюдения за его взаимодействием иммобилизовали в качестве лиганда на тонком слое золота на сенсорном чипе. Когда свет падает на тыльную поверхность сенсорного чипа, так что полное отражение происходит на границе между тонким слоем золота и стеклом, интенсивность отраженного света частично снижается в определенной области

(сигнал SPR). Другое вещество для наблюдения за их взаимодействием вводили в качестве аналита на поверхность сенсорного чипа. Масса молекулы иммобилизованного лиганда увеличивается, когда аналит связывается с лигандом. В результате изменяется показатель преломления растворителя на поверхности сенсорного чипа. Изменение показателя преломления вызывает позиционный сдвиг сигнала SPR (и наоборот, диссоциация сдвигает сигнал обратно в исходное положение). В системе Biacore величина сдвига, описанная выше (то есть изменение массы на поверхности сенсорного чипа), отображается на вертикальной оси, и таким образом изменение массы в течение времени отображается в виде измеренных данных (сенсорграммы). Кинетические параметры (константа скорости ассоциации (k_a) и константа скорости диссоциации (k_d)) определяли по кривой сенсограммы, а аффинность (KD) определяли по отношению между этими двумя константами. В методах BIACORE предпочтительно используют анализ ингибирования. Примеры такого анализа ингибирования описаны в статье Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103(11), 4005-4010 (2006).

Получение и очистка мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул

В некоторых вариантах мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы представляют собой изолированные мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы.

Мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы, описанные в данном контексте, содержат два различных антигенсвязывающих фрагмента (например, «первый антигенсвязывающий фрагмент» и «второй антигенсвязывающий фрагмент»), слитые с одной или другой из двух субъединиц Fc-домена, таким образом, две субъединицы Fc-домена обычно состоят из двух неидентичных полипептидных цепей. Рекомбинантная коэкспрессия этих полипептидов и последующая димеризация приводят к нескольким возможным комбинациям двух полипептидов. Таким образом, чтобы улучшить выход и чистоту мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул при рекомбинантном продуцировании целесообразно провести модификацию Fc-домена мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, способствующую ассоциации требуемых полипептидов.

Соответственно, в конкретных вариантах Fc-домен мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, описанной в данном контексте, содержит

модификацию, способствующую ассоциации первой и второй субъединицы Fc-домена. Наиболее протяженный участок белок-белкового взаимодействия между двумя субъединицами Fc-домена IgG человека расположено в домене СНЗ Fc-домена. Таким образом, в одном варианте указанная модификация расположена в домене СНЗ Fc-домена.

В конкретном варианте указанная модификация представляет собой так называемую модификацию «выступ во впадину», включающую модификацию «выступ» в одной из двух субъединиц Fc-домена и модификацию «впадина» в другой из двух субъединиц Fc-домена. Технология «выступ во впадину» описана, например, в патентах США 5731168, 7695936, в статьях Ridgway и др., Prot. Eng., 9, 617-621 (1996) и Carter, J. Immunol. Meth., 248, 7-15 (2001). Обычно способ включает введение выступающей части («выступ») на границе раздела первого полипептида и соответствующей полости («впадина») на границе раздела второго полипептида, так что выступающую часть можно расположить во впадине таким образом, чтобы способствовать образованию гетеродимеров и затруднить образование гомодимеров. Выступающие части создают при замене небольших боковых цепей аминокислот на границе раздела первого полипептида более крупными боковыми цепями (например, боковыми цепями тирозина или триптофана). Компенсирующие полости идентичного или подобного выступающим частям размера создают на границе раздела второго полипептида при замене больших боковых цепей аминокислот на более мелкие (например, на боковые цепи аланина или треонина).

Соответственно, в конкретном варианте в домене СНЗ первой субъединицы Fc-домена мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком с большим объемом боковой цепи, при этом образуется выступающая часть домена СНЗ первой субъединицы, который расположен в полости в домене СНЗ второй субъединицы, и в домене СНЗ второй субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком с меньшей боковую цепью меньшего размера, при этом образуется полость внутри домена СНЗ второй субъединицы, в которой можно расположить выступающую часть внутри домена СНЗ первой субъединицы.

Выступающую часть и полость можно создать при преобразовании нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, например с использованием сайт-специфического мутагенеза или пептидного синтеза.

В конкретном варианте в домене СН3 первой субъединицы Fc-домена остаток треонина в положении 366 заменен остатком триптофана (T366W), а в домене СН3 второй субъединицы Fc-домена остаток тирозина в положении 407 заменен остатком валина (Y407V). В одном варианте во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток треонина в положении 366 заменен остатком серина (T366S), а остаток лейцина в положении 368 заменен остатком аланина (L368A).

В еще одном варианте в первой субъединице Fc-домена дополнительно остаток серина в положении 354 заменен остатком цистеина (S354C), а во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток тирозина в положении 349 заменен на остаток цистеина (Y349C). Введение этих двух остатков цистеина приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя субъединицами Fc-домена, что дополнительно стабилизирует димер (см. статью Carter, J. Immunol. Methods, 248, 7-15 (2001)).

В других вариантах для модификации мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению можно использовать другие методы ускорения ассоциации между Н-цепями и между L- и Н-цепями, которые характеризуются требуемыми комбинациями.

Например, для ассоциации мультиспецифичных антител (см. международную заявку WO2006/106905) можно применять способы подавления нежелательной ассоциации Н-цепи за счет введения электростатического отталкивания на границе второй консервативной области или третьей консервативной области Н-цепи антитела (СН2 или СН3).

В способе подавления непредусмотренной ассоциации Н-цепи за счет введения электростатического отталкивания на границе раздела СН2 или СН3 примеры аминокислотных остатков, контактирующих на границе раздела другой консервативной области Н-цепи, включают области, соответствующие остаткам в положениях 356, 439, 357, 370, 399 и 409 в области СН3 (согласно нумерации ЕС).

Более конкретно, примеры включают антитело, содержащее два типа Н-цепей СН3 областей, в которых от одной до трех пар аминокислотных остатков в

первой N-цепи из области СНЗ, выбранных из пар аминокислотных остатков, указанных ниже (1) - (3) пар, несут одинаковый тип заряда: (1) аминокислотные остатки, содержащиеся в области СНЗ N-цепи в положениях согласно нумерации ЕС 356 и 439, (2) аминокислотные остатки, содержащиеся в области СНЗ N-цепи в положениях согласно нумерации ЕС 357 и 370 и (3) аминокислотные остатки, содержащиеся в области СНЗ N-цепи в положениях согласно нумерации ЕС 399 и 409.

Кроме того, антитело может представлять собой антитело, в котором пары аминокислотных остатков во второй области СНЗ N-цепи, которая отличается от первой области СНЗ N-цепи, упомянутой выше, выбраны из вышеупомянутых пар аминокислотных остатков (1) - (3), где от одной до трех пар аминокислотных остатков, которые соответствуют вышеупомянутым парам аминокислотных остатков (1) - (3), несущих заряды того же типа в первой упомянутой выше области СНЗ N-цепи, несут противоположные заряды от соответствующих аминокислотных остатков в первой области СНЗ N-цепи, упомянутой выше.

Каждый из аминокислотных остатков, указанных выше как (1) - (3), во время ассоциации приближаются друг к другу. Специалистам в данной области техники представляются очевидными положения, которые соответствуют вышеупомянутым аминокислотным остаткам (1) - (3), в требуемой области СНЗ N-цепи или консервативной области N-цепи с использованием гомологичного моделирования и с использованием программного обеспечения (выпускаемого фирмами), а аминокислотные остатки в этих положениях также можно соответствующим образом модифицировать.

В упомянутых выше антителах «заряженные аминокислотные остатки» предпочтительно выбирают, например, из аминокислотных остатков, включенных в любую из следующих групп:

- (а) глутаминовая кислота (E) и аспарагиновая кислота (D) и
- (б) лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H).

В вышеупомянутых антителах словосочетание «несущие одинаковый заряд» означает, например, что все из двух или более аминокислотных остатков выбраны из аминокислотных остатков, включенных в любую из групп (а) и (б), упомянутых выше. Словосочетание «несущие противоположные заряды» означает, например, что когда по меньшей мере один из аминокислотных

остатков из двух или более аминокислотных остатков выбран из аминокислотных остатков, включенных в одну из упомянутых выше групп (а) и (б), остальные аминокислотные остатки выбраны из аминокислотных остатков, включенных в другую группу.

5 В предпочтительном варианте антитела, упомянутые выше, могут характеризоваться наличием первой области СНЗ Н-цепи и второй области СНЗ Н-цепи, сшитых дисульфидными связями.

10 В настоящем изобретении аминокислотные остатки, которые подвергаются модификации, включают, но не ограничиваются вышеупомянутыми аминокислотными остатками переменных областей антитела или консервативных областей антитела. Специалистам в данной области техники представляется очевидным идентифицировать аминокислотные остатки, которые образуют поверхность раздела в мутантных полипептидах или гетеромультимерах, за счет гомологичного моделирования и т. п. подходов с
15 использованием известного программного обеспечения, а аминокислотные остатки в этих положениях затем можно модифицировать для регулирования ассоциации.

Кроме того, другие известные методы также можно использовать для формирования мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул,
20 содержащихся в противоопухолевом агенте, фармацевтической композиции, комбинации или в наборе по настоящему изобретению, или используемых в способе или при применении по настоящему изобретению. Ассоциацию полипептидов с различными последовательностями можно эффективно индуцировать с использованием комплементарной ассоциации СНЗ, с
25 использованием сконструированного при обмене цепей домена СНЗ, полученного при замене части одной из Н-цепи в СНЗ антитела на соответствующую последовательность, полученную из IgA, и при введении соответствующей полученной из IgA последовательности в комплементарную часть другой Н-цепи СНЗ (см. книгу Protein Engineering Design & Selection, 23;
30 195-202 (2010)). Этот известный метод также можно использовать для эффективного получения исследуемых мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул.

Кроме того, для образования мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул можно использовать технологии получения антител с использованием

ассоциации антитела CH1 и CL и ассоциации VH и VL, как описано в международных заявках WO 2011/028952, WO2014/018572 и в статье Nat. Biotechnol., февраль, 32(2):191-8 (2014), технологии получения биспецифичных антител с использованием отдельно приготовленных моноклональных антител в комбинации (Fab Arm Exchange), как описано в международных заявках WO2008/119353 и WO2011/131746, технологии регулирования ассоциации между CH3 тяжелой цепи антитела, как описано в международных заявках WO2012/058768 и WO2013/063702, технологии получения мультиспецифичных антител, состоящих из двух типов легких цепей и одного типа тяжелой цепи, как описано в международной заявке WO2012/023053, технологии получения мультиспецифичных антител с использованием двух штаммов бактериальных клеток, которые индивидуально экспрессируют одну из цепей антитела, содержащего одну H-цепь и одну L-цепь, как описано в книге Christoph и др. (Nature Biotechnology, том 31, стр. 753-758 (2013)).

В другом варианте даже когда исследуемую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу невозможно эффективно сформировать, мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению можно получить при отделении и очистке исследуемой мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы от продуцируемых молекул. Например, сообщалось о способе, позволяющем очистить два типа гомомерных форм и исследуемое гетеромерное антитело с помощью ионообменной хроматографии за счет придания различия в изоэлектрических точках при введении аминокислотных замен в переменные области двух типов H-цепей (см. международную заявку WO2007114325). В настоящее время в качестве метода очистки гетеромерных антител описаны способы с использованием белка А для очистки гетеродимерного антитела, содержащего H-цепь мышинового IgG2a, которая связывается с белком А, и H-цепь крысиного IgG2b, которая не связывается с белком А (см. международные заявки WO98050431 и WO95033844). Кроме того, гетеродимерное антитело можно эффективно очищать как таковое с использованием H-цепей, включающих замену аминокислотных остатков в положениях согласно нумерации ЕС 435 и 436, которые представляют собой сайт связывания IgG с белком А, на Туг, His или такие аминокислоты, которые обеспечивают различную аффинность к белку А, или с использованием H-цепей с отличающейся аффинностью к белку А, с

целью изменения взаимодействия каждой из Н-цепей с белком А, а затем использовать колонку с белком А.

Кроме того, Fc-область, в которой С-концевая гетерогенность Fc-области улучшена, можно пригодным образом использовать в качестве Fc-области по
5 настоящему изобретению. Более конкретно, в настоящем изобретении предлагаются Fc-области, полученные в результате делеции глицина в положении 446 и лизина в положении 447, как указано согласно нумерации ЕС, из аминокислотных последовательностей двух полипептидов, составляющих Fc-область, полученную из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

10 Мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы, полученные, как описано в данном контексте, можно очищать методами, известными в данной области техники, такими как высокоэффективная жидкостная хроматография, ионообменная хроматография, гель-электрофорез, аффинная хроматография, эксклюзионная хроматография и т. п. Фактические условия, используемые для
15 очистки конкретного белка, частично зависят от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность, гидрофильность и т. д., и представляются очевидными специалистам в данной области техники. Для очистки аффинной хроматографией можно использовать антитело, лиганд, рецептор или антиген, с которым связывается мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула.
20 Например, для очистки с использованием аффинной хроматографии мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению можно использовать носитель с белком А или белком G. Последовательную аффинную хроматографию на белках А или G и эксклюзионную хроматографию можно использовать для выделения мультиспецифичной антигенсвязывающей
25 молекулы. Чистоту мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы можно определить любым из множества хорошо известных аналитических методов, включая гель-электрофорез, жидкостную хроматографию высокого давления и т. п.

Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность

30 Термин «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, NK-клетках, нейтрофилах и макрофагах), дает возможность этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически

связываться с антигенсодержащей клеткой-мишенью и впоследствии убивать клетку-мишень цитотоксинами. Первичные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют только Fc-гамма RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc-гамма RI, Fc-гамма RII и Fc-гамма RIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках суммирована в таблице 3 на с. 464 в статье Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Для оценки активности ADCC исследуемой молекулы можно провести анализ ADCC *in vitro*, как описано в патентах США № 5500362 или 5821337 или патенте США № 6737056 (Presta). Пригодные эффекторные клетки для таких анализов включают PBMC и NK-клетки. В другом варианте или дополнительно активность ADCC исследуемой молекулы можно оценить *in vivo*, например, на животной модели, как описано в статье Clynes и др., *PNAS (США)*, 95:652-656 (1998).

Комплементзависимая цитотоксичность

Термин «комплементзависимая цитотоксичность» или «CDC» относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Активацию классического пути комплемента инициируют при связывании первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связаны с родственным им антигеном. Для оценки активации комплемента можно проводить анализ CDC, например, как описано в статье Gazzano-Santoro и др., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996). Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области (полипептиды с различными вариантами Fc-области) и повышенной или пониженной способностью связывания C1q описаны, например, в патентах США № 6194551 В1 и WO 1999/51642. См. также, например, статью Idusogie и др., *J. Immunol.*, 164: 4178-4184 (2000).

T-клеточно-зависимая клеточная цитотоксичность

Термин «T-клеточно-зависимая клеточная цитотоксичность» или «TDCC» относится к форме цитотоксичности, при которой антигенсвязывающая молекула связывается как с антигеном, экспрессируемым на клетке-мишени, так и с другим антигеном, экспрессируемым на T-клетке, при этом T-клетка перенаправляется ближе к клетке-мишени, поскольку цитотоксичность против клетки-мишени индуцируется T-клеткой. Способ оценки T-клеточно-зависимой клеточной цитотоксичности, анализ TDCC *in vitro*, также описан в разделе

«Измерение Т-клеточно-зависимой клеточной цитотоксичности» в настоящем изобретении.

Измерение Т-клеточно-зависимой клеточной цитотоксичности

В варианте, в котором антигенсвязывающая молекула связывается как с
5 CLDN6, так и с CD3/CD137, способы, описанные ниже, предпочтительно
используют в качестве метода оценки или определения Т-клеточно-зависимой
клеточной цитотоксичности (TDCC), вызванной контактированием с
антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению с клетками,
10 экспрессирующими CLDN6, с которыми связывается антигенсвязывающий сайт
в антигенсвязывающих молекулах по настоящему изобретению. Способы оценки
или определения цитотоксической активности *in vitro* включают способы
определения активности цитотоксических Т-клеток или тому подобное.
Проявление антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению
15 активности, вызывающей клеточную цитотоксичность, опосредованную Т-
клетками, можно детектировать известными методами (см., например, книгу
«Current protocols in Immunology», глава 7. Immunologic studies in humans,
редактор John E., Coligan и др., John Wiley & Sons, Inc., 1993). В анализе
цитотоксичности в качестве контрольной антигенсвязывающей молекулы
используют антигенсвязывающую молекулу, которая способна связываться с
20 антигеном, отличающимся от CLDN6, и который не экспрессируется в клетках, а
также CD3/CD137. Контрольную антигенсвязывающую молекулу анализируют
таким же образом. Затем активность оценивают в ходе проверки: проявляет ли
антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению более сильную
цитотоксическую активность, чем активность контрольной антигенсвязывающей
25 молекулы.

В то же время противоопухолевую эффективность *in vivo* оценивают или
определяют, например, с помощью следующей процедуры. Клетки,
экспрессирующие антиген, с которым связывается антигенсвязывающий сайт в
антигенсвязывающей молекуле по настоящему изобретению, трансплантируют
30 внутрикожно или подкожно животному, не являющемуся человеком. Затем,
начиная со дня трансплантации или после него, тестируемую
антигенсвязывающую молекулу вводят в вену или брюшную полость каждый
день или с интервалом в несколько дней. Размер опухоли измеряют с течением
времени. Различие в изменении размеров опухоли можно определить как

цитотоксическую активность. Как и в анализе *in vitro*, вводят контрольную антигенсвязывающую молекулу. Можно считать, что антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению обладает цитотоксической активностью, когда размер опухоли снижается в группе, которой вводили

5 антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению, по сравнению с группой, которой вводили контрольную антигенсвязывающую молекулу.

Метод МТТ и измерение захвата клетками меченного изотопом тимидина предпочтительно используют для оценки или определения воздействия контактирования с антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению
10 для подавления роста клеток, экспрессирующих антиген, с которым связывается антигенсвязывающий сайт в антигенсвязывающей молекуле.

В то же время те же самые методы, описанные выше для оценки или определения цитотоксической активности *in vivo*, предпочтительно можно использовать для оценки или определения активности по подавлению роста
15 клеток *in vivo*.

TDCC антитела или антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению можно оценить любым пригодным способом, известным в данной области техники. Например, TDCC можно измерить с помощью анализа высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH). В этом анализе клетки-мишени
20 (например, клетки, экспрессирующие CLDN6) инкубируют с Т-клетками (например, PBMC) в присутствии исследуемого антитела или антигенсвязывающей молекулы, а активность LDH, которая высвобождается из клеток-мишеней, убитых Т-клетками, измеряют с использованием пригодного реагента. Обычно цитотоксическую активность рассчитывают как процент
25 активности LDH, являющейся результатом инкубации с антителом или антигенсвязывающей молекулой, относительно к активности LDH, являющейся результатом 100% уничтожения клеток-мишеней (например, лизированных обработкой Тритоном-Х). Если цитотоксическая активность, рассчитанная, как
указано выше, повышается, то можно считать, что тестируемое антитело или
30 антигенсвязывающая молекула характеризуется более высокой TDCC.

Дополнительно или в другом варианте, например, TDCC также можно измерить с помощью анализа ингибирования роста клеток в реальном времени. В этом анализе клетки-мишени (например, клетки, экспрессирующие CLDN6) инкубируют с Т-клетками (например, PBMC) в присутствии тестируемого

антитела или антигенсвязывающей молекулы на 96-луночном планшете и рост клеток-мишеней регистрируют способами, известными в данной области техники, например, с использованием пригодного анализатора (например, анализатора клеток в реальном времени xCELLigence). Степень ингибирования роста клеток (CGI, %) определяют по значению клеточного индекса в соответствии со следующей формулой $CGI (\%) = 100 - (CIAb \times 100 / CINoAb)$. «CIAb» представляет собой значение клеточного индекса для лунок с антителом или антигенсвязывающей молекулой в определенное время осуществления эксперимента, а «CINoAb» представляет собой среднее значение клеточного индекса для лунок без антитела или антигенсвязывающей молекулы. Если уровень CGI антитела или антигенсвязывающей молекулы является высоким, то есть имеет значительное положительное значение, то можно считать, что антитело или антигенсвязывающая молекула обладает активностью TDCC.

В одном аспекте антитело или антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению обладает активностью по активации Т-клеток. Активацию Т-клеток можно анализировать способами, известными в данной области техники, такими как метод с использованием сконструированной линии Т-клеток, которая экспрессирует репортерный ген (например, ген люциферазы) в ответ на его активацию (например, линия репортерных клеток Jurkat/NFAT-RE (T Cell Activation Bioassay, фирмы Promega)). В этом методе клетки-мишени (например, клетки, экспрессирующие CLDN6) культивируют с Т-клетками в присутствии тестируемого антитела или антигенсвязывающей молекулы, а затем уровень или активность продукта экспрессии репортерного гена измеряют пригодными методами как индекс активации Т-клеток. Когда репортерный ген представляет собой ген люциферазы, люминесценцию, возникающую в результате реакции между люциферазой и ее субстратом, можно измерить как индекс активации Т-клеток. Если активация Т-клеток, измеренная, как описано выше, повышается, то можно считать, что тестируемое антитело или антигенсвязывающая молекула характеризуется более высокой активностью по активации Т-клеток.

В одном аспекте мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или антитело по настоящему изобретению проявляет цитотоксическую активность, равную или превышающую (то есть не меньшую) цитотоксическую активность мультиспецифичного антитела, используемого в качестве контроля. Измерение и

сравнение цитотоксической активности, а также определение проявления молекулой или антителом цитотоксической активности, равной или превышающей (то есть не меньшую) активность контроля, можно проводить как описано выше в разделе «Измерение Т-клеточно-зависимой цитотоксичности». В некоторых вариантах мультиспецифичное антитело, используемое в качестве контроля, представляет собой мультиспецифичное антитело с той же структурой, что и мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула или антитело по настоящему изобретению, за исключением того, что первый антигенсвязывающий фрагмент может связываться только с CD3. В некоторых вариантах мультиспецифичное антитело, используемое в качестве контроля, представляет собой мультиспецифичное антитело (CS3348), содержащее антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с рецепторным комплексом Т-клеток, который представляет собой фрагмент, содержащий тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 192, и антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с CLDN6, который представляет собой фрагмент, содержащий тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195.

20 Фармацевтическая композиция

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу или антитело по настоящему изобретению. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция по настоящему изобретению индуцирует Т-клеточно-зависимую цитотоксичность, другими словами, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представляет собой терапевтический агент, индуцирующий цитотоксичность. В некоторых вариантах фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют для лечения и/или профилактики рака. В некоторых вариантах фармацевтическую композицию по настоящему изобретению используют для лечения и/или профилактики CLDN6-положительного рака или CLDN6-экспрессирующего рака, включая рак яичников, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак яичка, рак молочной железы, рак шейки матки, рак пищевода, рак поджелудочной железы,

карциному желчного протока, рак почки, рак головы и шеи, рак толстой кишки, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидно-рабдоидную опухоль (AT/RT), а также другие CLDN6-положительные раковые заболевания или раковые заболевания, экспрессирующие CLDN6. В некоторых вариантах

5 фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представляет собой супрессор клеточного роста (ингибитор клеточного роста). В некоторых вариантах фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представляет собой

10 противораковый агент. В некоторых вариантах фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представляет собой агент, индуцирующий цитотоксичность, активатор иммунного ответа против раковых клеток или опухолевых тканей, содержащих раковые клетки, противораковый терапевтический агент или противораковый профилактический агент.

При необходимости фармацевтическую композицию по настоящему

15 изобретению, терапевтический агент для индуцирования цитотоксичности, супрессор клеточного роста, агент, индуцирующий цитотоксичность, активатор иммунного ответа против раковых клеток или опухолевых тканей, содержащих раковые клетки, агент для лечения рака, агент для профилактики рака или противораковый агент по настоящему изобретению можно вводить в состав с

20 различными типами антигенсвязывающих молекул или антител. Например, цитотоксическое действие против клеток, экспрессирующих антиген, можно усилить с помощью смеси множества мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул или антител по настоящему изобретению.

Фармацевтические композиции, содержащие мультиспецифичную

25 антигенсвязывающую молекулу или антитело, как описано в данном контексте, получают при смешивании такой антигенсвязывающей молекулы или антитела, характеризующегося желаемой степенью чистоты, с одним или более необязательных фармацевтически приемлемых носителей (см. книгу Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е издание, Osol, A. ред., (1980)) в виде

30 лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители в основном нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают, но не ограничиваясь только ими, буферные вещества, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин, консерванты (такие

как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол), низкомолекулярные (содержащие менее 5 приблизительно 10 остатков) полипептиды, белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин, моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины, хелатирующие агенты, такие как 10 ЭДТА, сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит, солеобразующие противоионы, такие как натрий, металлокомплексы (например, комплексы Zn-белок) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Типичные фармацевтически приемлемые носители в данном контексте дополнительно включают интерстициальные 15 агенты для диспергирования лекарственного средства, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины гиалуронидазы человека PH-20, такие как gHuPH20 (HYLENEX™ фирмы Baxter International, Inc.). Некоторые типичные sHASEGP и способы их применения, включая gHuPH20, описаны в патентах США 20 № 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном объекте sHASEGP комбинируют с одной или несколькими дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

Типичные лиофилизированные составы антител описаны в патенте США № 6267958. Водные составы антител включают составы, описанные в патентах 25 США № 6171586 и WO2006/044908, причем последние составы включают гистидин-ацетатный буферный раствор.

Состав, описанный в данном контексте, также может содержать более одного активного ингредиента, необходимого для лечения конкретного симптома, предпочтительно с дополнительными активностями, которые не 30 оказывают неблагоприятного влияния друг на друга. Такие активные ингредиенты должным образом присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для достижения поставленной цели.

При необходимости антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению можно инкапсулировать в микрокапсулы

(микрокапсулы, изготовленные из гидроксиметилцеллюлозы, желатина, полиметилметакрилата и т. п.) и превращать в компоненты коллоидных систем для доставки лекарственных средств (липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) (например, см. книгу «Remington's Pharmaceutical Science», 16-е издание, Oslo, ред., (1980)). Более того, известны способы получения агентов в качестве агентов замедленного высвобождения, и их можно применять с антигенсвязывающими молекулами по настоящему изобретению (см. статьи J. Biomed. Mater. Res., 15, 267-277 (1981), Chemtech., 12, 98-105 (1982), патент США № 3773719, европейские патентные заявки (EP) № EP58481 и EP133988, статью Biopolymers, 22, 547-556 (1983)).

При необходимости векторы, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению, можно вводить в организм субъектов для экспрессии антигенсвязывающих молекул или антител по настоящему изобретению непосредственно в организме субъекта. Примером векторов, которые можно использовать, является аденовирус, но не ограничиваясь только им. Также можно вводить молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению, непосредственно в организм субъекта или переносить молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению, методом электропорации в организм субъекта, или вводить клетки, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению для экспрессии и секреции в организме субъекта, для непрерывной экспрессии и секреции антигенсвязывающих молекул или антител по настоящему изобретению в организме субъекта.

Фармацевтические композиции, агенты, блокирующие рост клеток, или противораковые средства по настоящему изобретению можно вводить пациентам перорально или парентерально. Предпочтительно их вводят парентерально, и прежде всего такие способы введения включают инъекцию, назальное введение, транспульмональное введение и чрескожное введение. Инъекции включают, например, внутривенные инъекции, внутримышечные инъекции, внутрибрюшинные инъекции и подкожные инъекции. Например, фармацевтические композиции, терапевтические средства для индукции

клеточной цитотоксичности, средства, блокирующие рост клеток или противораковые средства по настоящему изобретению можно вводить местным или системным способом с помощью инъекции. Кроме того, соответствующие способы введения можно выбрать в соответствии с возрастом и симптомами пациента. Вводимую дозу можно выбрать, например, в диапазоне от 0,0001 мг до 1000 мг на кг массы тела на каждое введение. В другом варианте дозу можно выбрать, например, в диапазоне от 0,001 мг/организм до 100000 мг/организм пациента. Однако доза фармацевтической композиции по настоящему изобретению не ограничивается этими дозами.

10 Предпочтительно фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу или антитело, как описано в данном контексте. В одном аспекте композиция представляет собой фармацевтическую композицию, предназначенную для применения с целью индукции клеточной цитотоксичности. В другом аспекте
15 композиция представляет собой фармацевтическую композицию, предназначенную для применения при лечении или профилактике рака. Предпочтительно раковая опухоль представляет собой опухоль, экспрессирующую CLDN6. Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно использовать для лечения или профилактики рака. Таким образом, в настоящем изобретении предлагается способ лечения или
20 профилактики рака, в котором мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу или антитело, как описано в данном контексте, вводят пациенту, нуждающемуся в таком лечении.

В настоящем изобретении также предлагаются способы повреждения
25 клеток, экспрессирующих CLDN6 или при CLDN6-положительном раке, или блокировки роста клеток за счет контактирования клеток, экспрессирующих CLDN6, с антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению, которая связывается с CLDN6. Выбор клеток, с которыми связывается антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, специально не
30 ограничен, при условии, что они экспрессируют CLDN6. Прежде всего по настоящему изобретению является предпочтительным рак, экспрессирующий CLDN6, или CLDN6-положительный рак, включающие рак яичников, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак яичка, рак молочной железы, рак шейки

матки, рак пищевода, рак поджелудочной железы, холангиокарциному, рак почки, рак головы и шеи, рак толстой кишки, рак мочевого пузыря или атипичную тератоидную рабдоидную опухоль (AT/RT).

Согласно настоящему изобретению «контактирование» можно
5 осуществлять, например, при добавлении антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению в культуральную среду клеток, экспрессирующих CLDN6, культивируемых *in vitro*. В этом случае добавляемую
антигенсвязывающую молекулу можно использовать в соответствующей форме, такой как раствор или твердое вещество, полученное лиофилизацией или
10 подобным образом. Когда антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению добавляют в виде водного раствора, раствор может представлять собой чистый водный раствор, содержащий только антигенсвязывающую молекулу, или раствор, содержащий, например, описанное выше поверхностно-активное вещество, эксципиент, краситель, ароматизатор, консервант,
15 стабилизатор, буферное вещество, суспендирующий агент, изотонизирующий агент, связующее вещество, дезинтегратор, смазывающее вещество, активатор текучести и корректирующее вещество. Добавленная концентрация специально не ограничивается, однако конечная концентрация в культуральной среде предпочтительно находится в диапазоне от 1 пг/мл до 1 г/мл, более
20 предпочтительно от 1 нг/мл до 1 мг/мл и еще более предпочтительно от 1 мкг/мл до 1 мг/мл.

В другом варианте настоящего изобретения «контактирование» также можно осуществлять при введении животным, отличающимся от человека, которым были трансплантированы клетки, экспрессирующие CLDN6, *in vivo*,
25 или животным с раковыми клетками, эндогенно экспрессирующими CLDN6. Способ введения может представлять собой пероральный или парентеральный способ, причем парентеральное введение является особенно предпочтительным. Прежде всего способ парентерального введения включает инъекцию, назальное введение, пульмональное введение и чрескожное введение. Инъекции включают,
30 например, внутривенные инъекции, внутримышечные инъекции, внутрибрюшинные инъекции и подкожные инъекции. Например, фармацевтические композиции, терапевтические агенты для индукции клеточной цитотоксичности, средства, блокирующие рост клеток, или противоопухолевые средства по настоящему изобретению можно вводить

локальным или системным способом инъекции. Кроме того, пригодный метод введения можно выбрать в соответствии с возрастом и симптомами животного-субъекта. Когда антигенсвязывающую молекулу вводят в виде водного раствора, раствор может представлять собой чистый водный раствор, содержащий только антигенсвязывающую молекулу, или раствор, содержащий, например, описанное выше поверхностно-активное вещество, эксципиент, краситель, ароматизатор, консервант, стабилизатор, буферное вещество, суспендирующий агент, изотонизирующий агент, связующее вещество, дезинтегратор, смазывающее вещество, активатор текучести и корректирующее вещество. Вводимую дозу можно выбрать, например, в диапазоне от 0,0001 до 1000 мг на кг массы тела для каждого введения. В другом варианте дозу можно выбрать, например, в диапазоне от 0,001 до 100000 мг/организм для каждого пациента. Однако доза антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению не ограничивается этими примерами.

15 Фармацевтический состав и фармацевтическая композиция

Термин «фармацевтический состав» или «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться состав.

20 Фармацевтически приемлемый носитель

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту фармацевтического состава, отличающемуся от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничивается только ими, буферное вещество, эксципиент, стабилизатор или консервант.

25 Лечение

В данном контексте термин «лечение» (и его грамматические варианты, такие как «лечить» или «проводить лечение») относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение заболевания у индивидуума, который проходит курс лечения, и его можно проводить либо для профилактики, либо во время протекания клинической патологии. Требуемые эффекты лечения включают, но не ограничиваются только ими, предотвращение

развития или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых
прямых или косвенных патологических последствий заболевания,
предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования
заболевания, улучшение или временное облегчение патологического состояния и
5 ремиссия или улучшенный прогноз. В некоторых вариантах
антигенсвязывающие молекулы или антитела по настоящему изобретению
используют для задержки развития заболевания или замедления
прогрессирования заболевания.

В некоторых вариантах настоящее изобретение относится к способам
10 предотвращения резистентности к химиотерапии рака или предотвращения
рецидива или метастазирования рака, прежде всего в ходе или после лечения
рака, включая лечение рака способами по настоящему изобретению. В
некоторых вариантах термин «лечение» по настоящему изобретению означает,
что введение одного агента или комбинированная терапия с использованием
15 противоопухолевого агента или фармацевтической композиции по настоящему
изобретению уменьшает число раковых клеток у индивидуумов, подавляет
пролиферацию раковых клеток, уменьшает размер опухоли, подавляет
инфильтрацию раковых клеток в периферические органы, подавляет
метастазирование раковых клеток или облегчает различные симптомы,
20 вызванные раком. Кроме того, в некоторых вариантах термин «предотвращение»
по настоящему изобретению означает подавление роста числа раковых клеток
вследствие репопуляции раковых клеток, число которых снижено,
ингибирование репопуляции раковых клеток, пролиферация которых подавлена,
и ингибирование повторного увеличения размера опухоли, который был снижен.

25 Рак

Термины «рак» и «раковый» относятся или описывают физиологическое
состояние млекопитающих, которое обычно характеризуется неконтролируемым
ростом/пролиферацией клеток.

Используемый в данном контексте термин «рак» относится не только к
30 эпителиальным злокачественным новообразованиям, таким как рак яичников
или рак желудка, но также к неэпителиальным злокачественным
новообразованиям, включая гематопэтические раковые заболевания, такие как
хронический лимфоцитарный лейкоз или лимфома Ходжкина. В данном
контексте термины «рак», «карцинома», «опухоль», «новообразование» и т.п. не

отличаются друг от друга и являются взаимозаменяемыми. Кроме того, в варианте осуществления в данном контексте термины включают первичный рак, прогрессирующий рак, метастатический рак, рецидивирующий рак или их комбинацию.

5 В некоторых вариантах рак представляет собой CLDN6-экспрессирующий или CLDN6-положительный рак, который включает рак яичников, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак яичка, рак молочной железы, рак шейки матки, рак пищевода, рак поджелудочной железы, холангиокарциному, рак
10 почки, рак головы и шеи, рак толстой кишки, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидную рабдоидную опухоль (AT/RT), а также другие CLDN6-положительные раковые заболевания или раковые заболевания, экспрессирующие CLDN6.

Опухоль

15 Термин «опухоль» относится к росту и пролиферации всех неопластических клеток, как злокачественных, так и доброкачественных, а также всех предраковых и раковых клеток и тканей. Используемые в данном контексте термины «рак», «раковый», «клеточно-пролиферативное нарушение», «пролиферативное нарушение» и «опухоль» не являются взаимоисключающими.

Метастазирование

20 Термин «метастазирование» относится к миграции раковых клеток из того места, где они впервые возникли, в другие органы за счет проникновения в кровеносные или лимфатические сосуды и течения с током крови и лимфы, а затем пролиферации в органах, куда они мигрировали. Термин
25 «диссеминация» относится к отделению раковых клеток от органа, в котором развился рак, и затем распространению этих клеток в проксимальном пространстве внутри тела, например, в грудной полости или брюшной полости. В некоторых вариантах термин «метастазирование в брюшину» относится к перитонеальному диссеминационному и распространению раковых клеток в
30 брюшине, покрывающей брюшную полость. Например, термин «рак яичника с метастазами в брюшину» означает, что клетки рака яичников продвигаются из яичника в брюшину за счет внетазового перитонеального метастазирования и распространяются таким образом, что они рассыпаны по брюшине. Раковые

клетки опухоли, метастазировавшей в брюшину, присутствуют, например, в перитонеальной жидкости пациента.

В некоторых вариантах рак представляет собой рак с метастазами в брюшину. Кроме того, в некоторых вариантах рак представляет собой перитонеально диссеминированный рак.

Комбинированные методы лечения

Описанную выше мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу можно вводить в комбинации с одним или множеством других агентов при лечении. Например, описанную в данном контексте мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу можно вводить одновременно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. Кроме того, описанную в данном контексте мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу можно вводить до или после введения по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента.

При использовании в данном контексте, термин «использование в комбинации» в отношении применения метода лечения относится к использованию более одного терапевтического метода или терапевтических агентов. Использование термина «комбинирование» не ограничивает порядок, в котором терапевтические методы или терапевтические агенты вводят субъекту. Терапевтический метод или агент можно применять до, одновременно или после применения второго терапевтического метода или агента. Предпочтительно терапевтические методы или агенты вводят субъекту в порядке, в количестве и/или в пределах временного интервала, которые обеспечивают совместное действие терапевтических методов или агентов. В конкретных вариантах терапевтические способы или агенты вводят субъекту в порядке, количестве и/или в пределах временного интервала, которые обеспечивают более сильное благоприятное действие по сравнению с тем, когда их вводят соответствующим образом отдельными способами, или прежде всего когда их вводят индивидуально. Предпочтительно, большее преимущество представляет собой синергетический эффект.

Термин «терапевтический агент» охватывает любой агент, вводимый для лечения симптома или заболевания у индивидуума, нуждающегося в таком лечении. Такой дополнительный терапевтический агент может содержать любые активные ингредиенты, пригодные для конкретного оказания, подлежащего

лечению, предпочтительно такие ингредиенты, которые обладают дополнительной активностью и не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. В некоторых вариантах дополнительный терапевтический агент представляет собой иммуномодулирующий агент, цитостатический агент, ингибитор клеточной адгезии, цитотоксический агент, активатор клеточного апоптоза или агент, повышающий чувствительность клеток к индукторам апоптоза. В конкретном варианте дополнительный терапевтический агент представляет собой противораковый агент, например, разрушитель микротрубочек, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы, интеркалятор ДНК, алкилирующий агент, гормональную терапию, ингибитор киназы, антагонист рецептора, активатор апоптоза опухолевых клеток или антиангиогенный агент.

Такие другие агенты надлежащим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые проявляют эффективность для намеченной цели. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества используемых мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул, типа расстройства или лечения и других факторов, обсуждавшихся выше. Мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы обычно используют в тех же дозировках и в способах введения, как описано в данном контексте, или приблизительно от 1 до 99% доз, описанных в данном контексте, или в любой дозе и при любом способе введения, которые эмпирически/клинически определены как пригодные.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения комбинированная терапия по настоящему изобретению обеспечивает способ повреждения клеток, подавления пролиферации клеток, активации иммунитета против раковых клеток или опухолевых тканей, содержащих раковые клетки, лечения рака или предотвращения рака, где способ включает введение описанной выше мультиспецифичной молекулы антигена с эффективным количеством по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента. В некоторых вариантах комбинированная терапия по настоящему изобретению характеризуется более высоким эффектом повреждения клеток, подавления пролиферации клеток, активации иммунитета против раковых клеток или опухолевых тканей, содержащих раковые клетки, лечения рака или предотвращения рака по сравнению с монотерапией с использованием вышеуказанной мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы или других

противораковых агентов. В другом варианте комбинированная терапия по настоящему изобретению характеризуется синергическим эффектом или аддитивным эффектом, заключающимся в повреждении клеток, подавлении пролиферации клеток, активации иммунитета против раковых клеток или опухолевых тканей, содержащих раковые клетки, лечении рака или предотвращении рака.

В некоторых вариантах термин «эффективное количество» по настоящему изобретению относится к дозе описанной выше мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и/или других терапевтических средств, которые эффективны для лечения или профилактики заболевания у индивидуума. Заболевание специально не ограничивается, но предпочтительно представляет собой рак. Тип рака конкретно не ограничен, но предпочтительно представляет собой опухоль, содержащую раковые клетки, экспрессирующие CLDN6.

Кроме того, словосочетание «введение эффективного количества по меньшей мере одного агента, индуцирующего TGF β » относится к введению количества агента, индуцирующего TGF β , достаточного для индукции TGF β в исследуемой клетке.

Кроме того, словосочетание «введение эффективного количества по меньшей мере одного агента, индуцирующего экспрессию CLDN6» относится к введению количества агента, индуцирующего экспрессию CLDN6, достаточного для индукции экспрессии CLDN6 в исследуемой клетке.

Такие комбинированные методы лечения, описанные выше, включают комбинированное введение (когда два или более типов терапевтических агентов содержатся в одной и той же или отдельных композициях) и отдельное введение. В случае отдельного введения, введение мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, описанной в данном контексте, может происходить одновременно с введением дополнительного терапевтического агента и/или адъюванта или в разное время. Более конкретно, введение молекулы мультиспецифичного антигена можно осуществлять до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента и/или адъюванта. Описанные в данном контексте мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы также можно использовать в сочетании с лучевой терапией.

В некоторых вариантах при лечении рака или профилактике рака с помощью по меньшей мере одного другого противоракового средства комбинированная терапия по настоящему изобретению предлагает способы усиления терапевтического эффекта или профилактического эффекта по меньшей мере одного иного противоракового средства при использовании мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, описанной выше. В другом варианте при лечении рака или профилактике рака с помощью мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, описанной выше, комбинированная терапия по настоящему изобретению предлагает способы усиления терапевтического эффекта или профилактического эффекта мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы при использовании по меньшей мере одного агента, выбранного из группы, состоящей из другого противоракового агента, агента, индуцирующего TGF β , и агента, индуцирующего экспрессию CLDN6. В данном контексте усиление терапевтического эффекта или профилактического эффекта относится, например, к повышению эффективности скорости излечения, уменьшению количества противоракового агента, который вводят для лечения и/или к сокращению периода лечения противораковым средством, но не ограничивается этим. В другом варианте комбинированная терапия по настоящему изобретению предлагает способы продления периода выживания без прогрессирования у индивидуумов, способ, включающий введение эффективных количеств описанной выше мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного агента, выбранного из группы, состоящей из другого противоракового агента, агента, индуцирующего TGF β , и агента, индуцирующего экспрессию CLDN6.

В некоторых вариантах комбинированная терапия по настоящему изобретению включает введение описанной выше мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного другого противоракового средства. Мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один другой противораковый агент можно вводить любым пригодным способом, известным в данной области техники. Например, мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один другой противораковый агент можно вводить параллельно (то есть одновременно) и/или последовательно (то есть в разные моменты времени).

Например, когда мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и два или более типов других противоопухолевых агентов (например, первый другой противоопухолевый агент и второй другой противоопухолевый агент) используют в комбинации, мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и два или более типов других противоопухолевых агентов вводят в любом порядке. Например, каждую из мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул и каждый из двух или более типов других противоопухолевых агентов можно вводить последовательно (то есть все в разные моменты времени), мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и первый другой противоопухолевый агент можно вводить одновременно, а второй другой противоопухолевый агент можно вводить до или после одновременного введения, или первый и второй другие противоопухолевые агенты можно вводить одновременно, а мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу можно вводить до или после одновременного введения. В некоторых вариантах, когда мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один другой противоопухолевый агент вводят последовательно (то есть в разные моменты времени), интервал введения мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента специально не ограничен, и интервал можно установить с учетом таких факторов, как способ введения и лекарственная форма. Интервал введения составляет, например, от 0 до 168 ч, предпочтительно от 0 до 72 ч, более предпочтительно от 0 до 24 ч и еще более предпочтительно от 0 до 12 ч, но не ограничивается этим.

Кроме того, в некоторых вариантах комбинированная терапия по настоящему изобретению включает введение описанной выше мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного агента, индуцирующего TGF β . Мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один агент, индуцирующий TGF β , можно вводить любым пригодным способом, известным в данной области техники. Кроме того, в некоторых вариантах комбинированная терапия по настоящему изобретению включает введение описанной выше мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного агента, индуцирующего экспрессию CLDN6. Мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей

мере один агент, индуцирующий экспрессию CLDN6, можно вводить любым пригодным способом, известным в данной области техники.

В некоторых вариантах описанную выше мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один другой противоопухолевый агент вводят одновременно. В некоторых вариантах мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят периодически (то есть через промежутки времени). В некоторых вариантах мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят перед введением по меньшей мере одного другого противоопухолевого средства. В некоторых вариантах мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят после введения по меньшей мере одного другого противоопухолевого средства.

В некоторых вариантах по меньшей мере один другой противоопухолевый агент вводят периодически (то есть с промежутками). В некоторых вариантах по меньшей мере один другой противоопухолевый агент вводят перед введением мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы. В некоторых вариантах по меньшей мере один другой противоопухолевый агент вводят после введения мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы.

В некоторых вариантах мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы, описанные в данном контексте, и противоопухолевые средства, которые известны или описаны в данном контексте, можно использовать в описанных выше методах комбинированного лечения с использованием мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного другого противоопухолевого средства.

Кроме того, в некоторых вариантах мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы, описанные в данном контексте, и агенты, индуцирующие TGF β , которые известны или описаны в данном контексте, можно использовать в описанных выше методах комбинированного лечения с использованием мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного агента, индуцирующего TGF β .

Кроме того, в некоторых вариантах мультиспецифичные антигенсвязывающие молекулы, описанные в данном контексте, и агенты, индуцирующие экспрессию CLDN6, которые известны или описаны в данном контексте, можно использовать в описанных выше методах комбинированного

лечения с использованием мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного агента, индуцирующего экспрессию CLDN6.

В некоторых вариантах дополнительный метод лечения можно реализовать в дополнение к описанным выше методам комбинированного лечения с использованием мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента. В некоторых вариантах способ лечения, включенный в комбинированное лечение по настоящему изобретению, может включать дополнительное введение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы и/или по меньшей мере одного другого противоопухолевого средства.

Неограничивающий вариант настоящего изобретения относится к фармацевтическим композициям и к фармацевтическим композициям, содержащим описанную выше мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, по меньшей мере, один другой противоопухолевый агент или комбинацию мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента. Фармацевтические композиции представляют собой агенты, индуцирующие цитотоксичность, блокаторы клеточного роста (ингибиторы роста клеток), активаторы иммунного ответа против раковых клеток или опухолевых тканей, содержащих раковые клетки, противоопухолевые терапевтические агенты или агенты для профилактики рака. В некоторых вариантах фармацевтические композиции и подобные композиции по настоящему изобретению можно использовать в комбинированной терапии по настоящему изобретению. В некоторых вариантах фармацевтические композиции и подобные композиции по настоящему изобретению являются высокоэффективными для повреждения клеток, подавления пролиферации клеток, активации иммунитета против раковых клеток или опухолевых тканей, содержащих раковые клетки, для лечения или профилактики рака благодаря комбинированному использованию описанной выше мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы по меньшей мере с одним другим противоопухолевым агентом по сравнению с монотерапией с использованием мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы или по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента. В другом варианте фармацевтические композиции по настоящему изобретению характеризуются синергическими эффектами или аддитивными воздействиями на повреждаемые

клетки, на подавление пролиферации клеток, активацию иммунитета против раковых клеток или опухолевых тканей, содержащих раковые клетки, лечение или профилактику рака, благодаря комбинированному применению выше описанных мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента. В некоторых вариантах введение по меньшей мере одного дополнительного противоопухолевого агента усиливает противоопухолевые эффекты описанных выше мультиспецифичных антигенсвязывающих молекул. Кроме того, в некоторых вариантах введение описанной выше мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы усиливает противоопухолевые эффекты по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента.

В некоторых вариантах фармацевтические композиции и подобные композиции по настоящему изобретению, «содержащие комбинацию мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента» относятся к фармацевтическим композициям и подобным композициям, в которых описанная выше мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула и по меньшей мере один другой противоопухолевый агент объединены для использования при одновременном, раздельном и/или последовательном введении при лечении или профилактике заболевания. Например, фармацевтические композиции и подобные композиции по настоящему изобретению можно перерабатывать в форму комбинированного препарата, содержащего как мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, так и по меньшей мере один другой противоопухолевый агент. В другом варианте, например, в качестве фармацевтических композиций и подобных композиций по настоящему изобретению фармацевтический агент, содержащий мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, и фармацевтический агент, содержащий по меньшей мере один другой противоопухолевый агент, можно предоставить отдельно, и эти фармацевтические агенты можно использовать одновременно или последовательно. Заболевание специально не ограничивается, но предпочтительно представляет собой рак.

В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагаются фармацевтические композиции и подобные композиции для использования в комбинации по меньшей мере с одним агентом, выбранным из группы,

состоящей из другого противоопухолевого агента, агента, индуцирующего TGF β , и агента, индуцирующего экспрессию CLDN6, композиции, содержащие описанную выше мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу в качестве активного ингредиента. В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагаются фармацевтические композиции и подобные композиции для применения в сочетании с описанной выше мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулой, композиции, содержащие по меньшей мере один другой противоопухолевый агент в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагаются фармацевтические композиции и подобные композиции для усиления терапевтических эффектов по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента при лечении рака по меньшей мере с одним другим противоопухолевым агентом при объединении описанной выше мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы с другим противоопухолевым агентом.

В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагаются фармацевтические композиции и подобные композиции для усиления терапевтических эффектов описанной выше мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы при лечении рака с помощью мультиспецифичного антитела при комбинировании других противоопухолевых агентов с мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулой.

В некоторых вариантах в настоящем изобретении предлагается применение описанной выше мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и/или других противоопухолевых агентов для получения фармацевтических композиций и подобных композиций, содержащих в качестве активных ингредиентов мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и/или по меньшей мере один другой противоопухолевый агент.

В настоящем изобретении содержание в качестве активных ингредиентов описанной выше мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и/или по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента означает содержание мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и/или по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента в качестве основных активных ингредиентов, и не ограничивает пропорциональное содержание мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и/или по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента.

В некоторых вариантах мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, описанная в данном контексте, и по меньшей мере один другой противоопухолевый агент, который известен или описан в данном контексте, можно использовать в описанных выше фармацевтических композициях и подобных композициях.

В данном контексте термин «по меньшей мере один другой противоопухолевый агент» означает один, два, три, четыре, пять или более типов противоопухолевых агентов.

В данном контексте термины «по меньшей мере один другой противоопухолевый агент» или «другие противоопухолевые агенты» означают, что противоопухолевый агент содержит в качестве активного ингредиента вещество, отличающееся от описанной в данном контексте мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы. Более конкретно, когда используется словосочетание «другие противоопухолевые агенты», оно уточняет только, что противоопухолевый агент содержит в качестве активного ингредиента или активных ингредиентов вещество или вещества, отличающиеся от мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы, и не ограничивается агентом, в котором мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, используемая в комбинации по меньшей мере с одним другим противоопухолевым агентом, используется в качестве противоопухолевого агента. Например, противоопухолевые агенты, фармацевтические композиции, комбинации, наборы, способы или применения, характеризующиеся совместным применением (комбинированным применением) мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы по меньшей мере с одним другим противоопухолевым агентом, охватывают варианты, в которых противоопухолевый агент, отличающийся по меньшей мере от одного другого противоопухолевого агента, не используется, и в этом случае включены варианты, в которых мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула используется, например, в качестве усилителя, сопутствующего лекарственного средства или добавки по меньшей мере к одному другому противоопухолевому агенту.

В неограничивающем варианте настоящего изобретения описанный выше по меньшей мере один другой противоопухолевый агент включает, но не ограничивается только ими, аналоги азотистого иприта, алкилсульфонаты,

этиленимины, нитрозомочевины, эпоксиды, другие алкилирующие агенты, аналоги фолиевой кислоты, аналоги пурина, аналоги пиримидина, другие антиметаболиты, алкалоиды барвинка розового или их аналоги, производные подофиллотоксина, аналоги камптотекана, производные колхицина, таксаны, другие алкалоиды или растительные алкалоиды или природные вещества, ингибиторы топоизомеразы, актиномицины, антрациклины или родственные вещества, другие цитотоксические антибиотики, препараты платины (соединения платины), метилгидразины, ингибиторы киназы, ингибиторы ангиогенов, гормональные агенты, ингибиторы ферментов модификации ДНК, иммуностимуляторы, ингибиторы протеасом, ферменты, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы ферментов модификации ДНК, цитокиновые препараты, ретиноиды, ингибиторы иммунных контрольных точек, ингибиторы индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), активаторы костимулирующих молекул, активаторы природных клеток-киллеров, ингибиторы полиАДФ-рибозополимеразы (PARP), моноклональные антитела, другие агенты направленного молекулярного действия и другие противоопухолевые агенты. В неограничивающем варианте по меньшей мере один другой противоопухолевый агент по настоящему изобретению включает, но не ограничивается ими, антитела, описанные в международных заявках WO2015/174439 и WO2015/156268.

В некоторых вариантах термин «молекула иммунных контрольных точек» по настоящему изобретению относится к молекуле, которая экспрессируется на иммунокомпетентных клетках (включая Т-клетки) или раковых клетках и связывается с лигандом для передачи сигналов иммунокомпетентным клеткам для подавления иммунного ответа. Примеры молекул иммунных контрольных точек и их лигандов включают, но не ограничиваются только ими, такие молекулы, как PD-1, CTLA-4, TIM3, LAG3, PD-L1, PD-L2, BTLA, VISTA, HVEM, HVEML1, HVEML2, HVEML3, HVEML4, HVEML5, HVEML6, HVEML7, HVEML8, HVEML9, HVEML10, HVEML11, HVEML12, HVEML13, HVEML14, HVEML15, HVEML16, HVEML17, HVEML18, HVEML19, HVEML20, HVEML21, HVEML22, HVEML23, HVEML24, HVEML25, HVEML26, HVEML27, HVEML28, HVEML29, HVEML30, HVEML31, HVEML32, HVEML33, HVEML34, HVEML35, HVEML36, HVEML37, HVEML38, HVEML39, HVEML40, HVEML41, HVEML42, HVEML43, HVEML44, HVEML45, HVEML46, HVEML47, HVEML48, HVEML49, HVEML50, HVEML51, HVEML52, HVEML53, HVEML54, HVEML55, HVEML56, HVEML57, HVEML58, HVEML59, HVEML60, HVEML61, HVEML62, HVEML63, HVEML64, HVEML65, HVEML66, HVEML67, HVEML68, HVEML69, HVEML70, HVEML71, HVEML72, HVEML73, HVEML74, HVEML75, HVEML76, HVEML77, HVEML78, HVEML79, HVEML80, HVEML81, HVEML82, HVEML83, HVEML84, HVEML85, HVEML86, HVEML87, HVEML88, HVEML89, HVEML90, HVEML91, HVEML92, HVEML93, HVEML94, HVEML95, HVEML96, HVEML97, HVEML98, HVEML99, HVEML100. В некоторых вариантах «ингибитор иммунных контрольных точек» по настоящему изобретению относится к фармацевтическому агенту, который подавляет связывание между молекулой иммунных контрольных точек и ее лигандом и тем самым ингибирует передачу сигнала, опосредованную молекулой иммунных контрольных точек.

В некоторых примерах термин «ингибирование PARP» по настоящему изобретению относится к подавлению восстановления одноцепочечного разрыва за счет ингибирования поли(АДФ-рибозо)-полимеразы (PARP), прежде всего PARP-1 и PARP-2. Ингибитор PARP представляет собой фармацевтический агент, характеризующийся наличием функции подавления восстановления одноцепочечного разрыва за счет ингибирования PARP. Известно, что при некоторых видах рака, таких как рак молочной железы и рак яичников, наблюдаются аномалии в восстановлении двухцепочечного разрыва из-за мутации гена BRCA, а ингибитор PARP относится к фармацевтическому агенту, обладающему противоопухолевым действием из-за синтетической летальности в отношении этих типов рака.

В неограничивающем варианте по настоящему изобретению предлагаются фармацевтические композиции и подобные композиции, в которых по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой химиотерапевтический агент, ингибитор иммунных контрольных точек, ингибитор PARP, агонистический агент, активирующий Т-клетки и/или ангиогенный ингибитор или, более конкретно, по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой один или множество противоопухолевых агентов, выбранных из группы, состоящей из химиотерапевтических агентов, ингибиторов иммунных контрольных точек, ингибиторов PARP, агонистических агентов, активирующих Т-клетки, и ангиогенных ингибиторов. В случае, когда используют множество других противоопухолевых агентов, их можно выбрать из противоопухолевых агентов одинакового типа или из противоопухолевых агентов различных типов. Например, два или более агентов можно выбрать из химиотерапевтических агентов, или один или более агентов можно выбрать из химиотерапевтических агентов и ингибиторов иммунных контрольных точек соответственно. Выбор производят аналогичным образом, когда множество агентов выбирают из других типов противоопухолевых агентов.

В неограничивающем варианте по настоящему изобретению по меньшей мере один другой противоопухолевый агент включает агент, который усиливает экспрессию CLDN6 в клетках. Примеры клеток, в которых экспрессия CLDN6 повышается, включают раковые клетки, клетки опухолевых тканей и/или клетки вблизи опухолевых тканей. Иными словами, по меньшей мере один другой

противоопухолевый агент включает агенты, введение которых приводит к вызыванию или усилению экспрессии CLDN6 в раковых клетках, клетках опухолевых тканей и/или клетках вблизи опухолевых тканей.

Агент, который усиливает экспрессию CLDN6 в клетках, можно
 5 идентифицировать с использованием анализа изменения экспрессии CLDN6 до и после введения агента в исследуемую клеточную линию. Например, когда изменение уровня экспрессии CLDN6 до и после введения агента в исследуемую
 10 линию клеток анализируют с помощью обычных методов, таких как количественная ПЦР, FACS и вестерн-блоттинг, и наблюдают увеличение уровня экспрессии CLDN6, то этот агент идентифицируют как агент, который усиливает экспрессию CLDN6 в клетках.

Более подробно, например, агент добавляют к линии раковых клеток, РНК очищают из выделенных клеток, а затем проводят синтез кДНК, ПЦР в реальном
 15 времени с использованием кДНК в качестве матриц и с использованием CLDN6-специфичных праймеров, и экспрессию CLDN6 сравнивают и анализируют относительно экспрессии клеток, к которым агент не добавляли. В другом варианте, например, агент добавляют к линии раковых клеток, клетки окрашивают антителом против CLDN6, а CLDN6, экспрессируемый на
 20 клеточной мембране, сравнивают и анализируют с использованием проточного цитометра относительно клеток, к которым агент не добавляли. В другом случае, например, агент добавляют к линии раковых клеток и используют лизат клеток для сравнения и анализа экспрессии CLDN6 методом вестерн-блоттинга с использованием антитела против CLDN6 по сравнению с клетками, в которые не вводили агент. Каждую из этих методик можно выполнить с помощью
 25 общеизвестных протоколов (<https://www.cellsignal.jp/learn-and-support/protocols/protocol-western> (фирмы CST), <https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/pdfs/prt2.pdf> (фирмы TaKaRa Bio), <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html> (фирмы ThermoFisher)).
 30

Примеры агента, который усиливает экспрессию CLDN6 в раковых клетках, включают карбоплатин, цисплатин, иринотекан, гемцитабин и другие химиотерапевтические агенты.

В неограничивающем варианте по настоящему изобретению по меньшей мере один другой противоопухолевый агент включает агент, который индуцирует экспрессию TGF- β в клетках. Примеры клеток, в которых индуцируется экспрессия TGF- β , включают раковые клетки, клетки опухолевых тканей и/или клетки вблизи опухолевых тканей. То есть по меньшей мере один другой противоопухолевый агент включает агенты, введение которых приводит к индукции или усилению экспрессии TGF- β в раковых клетках, клетках опухолевых тканей и/или клетках вблизи опухолевых тканей. Например, по меньшей мере один другой противоопухолевый агент индуцирует экспрессию TGF- β 1 в раковых клетках. Кроме того, например, введение по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента индуцирует экспрессию TGF- β 1 в опухолевых тканях. Более того, например, введение по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента индуцирует экспрессию TGF- β 1 вблизи опухолевых тканей.

Агент, который усиливает экспрессию TGF- β в раковых клетках, можно идентифицировать, например, при добавлении агента к линии раковых клеток и с помощью анализа изменения экспрессии TGF- β . Например, когда изменение уровня экспрессии TGF- β до и после введения агента в исследуемую клеточную линию анализируют с помощью обычного метода, такого как количественная ПЦР и ИФА, измерение концентрации TGF- β , секретируемого в клеточный супернатант, и наблюдается увеличение уровня экспрессии TGF- β , то агент идентифицируют как агент, который усиливает экспрессию TGF- β в клетках.

Более подробно к линии раковых клеток добавляют агент, РНК очищают из выделенных клеток, а затем выполняют синтез кДНК, проводят ПЦР в реальном времени с использованием синтезированных кДНК в качестве матриц и с использованием специфичных для TGF- β праймеров, и экспрессию TGF- β сравнивают и анализируют относительно экспрессии клеток, к которым агент не добавляли. В другом варианте агент добавляют к линии раковых клеток, концентрацию TGF- β , секретируемого в супернатанте культуры раковых клеток, измеряют с помощью ИФА, и концентрацию сравнивают и анализируют по сравнению с концентрацией в клетках, к которым агент не добавляли. Каждый из этих методов является общеизвестным и его можно осуществлять по общеизвестным протоколам (например, <https://www.cellsignal.jp/learn-and-support/protocols/protocol-western> (фирмы CST), Human/Mouse/Rat/Porcine/Canine

TGF-beta 1 Quantikine ELISA (https://www.rndsystems.com/products/human-mouse-rat-porcine-canine-tgf-beta-1-quantikine-elisa_db100b (фирмы R & D system)).

5 Примеры агента, который индуцирует экспрессию TGF- β 1 в раковых клетках, включают доксорубин, паклитаксел, карбоплатин, цисплатин, иринотекан, гемцитабин и другие химиотерапевтические агенты, а также излучение.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения химиотерапевтические средства включают, но не ограничиваются только ими, антиметаболиты, алкалоиды, антрациклины и препараты платины.

10 Предпочтительные примеры антиметаболита включают, но не ограничиваются только ими, эноцитабин, капецитабин, кармофур, гемцитабин, цитарабин, тегафур, тегафур/урацил, неларабин, фторурацил, флударабин, пеметрексед, пентостатин и метотрексат. Примеры особенно предпочтительных антиметаболитов включают гемцитабин.

15 Примеры алкалоидов включают растительные алкалоиды.

Предпочтительные примеры растительных алкалоидов включают, но не ограничиваются только ими, иринотекан, этопозид, собузоксан, доцетаксел, ногитекан, паклитаксел, винорелбин, винкристин, виндезин и винбластин.

20 Примеры особенно предпочтительных растительных алкалоидов включают ингибиторы топоизомеразы. Примеры особенно предпочтительных растительных алкалоидов включают паклитаксел и иринотекан.

25 Предпочтительные примеры препаратов платины включают, но не ограничиваются только ими, оксалиплатин, карбоплатин, цисплатин и недаплатин. Примеры особенно предпочтительных препаратов платины включают карбоплатин и цисплатин.

30 В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения предпочтительные примеры ингибиторов иммунных контрольных точек включают, но не ограничиваются только ими, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против CTLA-4, антитела против TIM3 и антитела против LAG3. Примеры антител против PD-1 включают пембролизумаб (регистрационный номер CAS: 1374853-91-4), ниволумаб (регистрационный номер CAS: 946414-94-4), MEDI0680, PDR001, BGB-A317, REGN2810, SHR-1210, PF-0680159I и различные известные антитела против PD-1. Примеры антител против PD-L1 включают атезоизумаб (регистрационный номер CAS:

1380723-44-3), авелумаб (регистрационный номер CAS: 1537032-82-8), дурвалумаб (регистрационный номер CAS: 1428935-60-7), MDX- 11 05 и различные известные антитела против PD-L1. Примеры антител против CTLA-4 включают ипилимумаб (регистрационный номер CAS: 477202-00-9),
5 тремелимумаб (регистрационный номер CAS: 745013-59-6) и различные известные антитела против CTLA-4. Примеры антител против TIM3 включают MBG452 и различные известные антитела против TIM3. Примеры антител против LAG3 включают BMS-986016s LAG525 и различные известные антитела против LAG3. Примеры особенно предпочтительных ингибиторов иммунных
10 контрольных точек включают антитела против PD-L1.

В неограничивающем варианте настоящего изобретения предпочтительные примеры ингибитора PARP включают олапариб, рукапариб, нирапариб, велипариб, памипариб и талазопариб. Примеры особенно предпочтительных ингибиторов PARP включают олапариб.

15 В качестве неограничивающего варианта по настоящему изобретению примеры агонистического агента, активирующего Т-клетки, включают, но не ограничиваются только ими, агонистические антитела к суперсемейству рецепторов TNF (TNFRSF) и агонистические антитела к костимулирующим молекулам. Молекулы-мишени «агонистических антител к суперсемейству
20 рецепторов TNF» специально не ограничиваются, при условии, что они являются факторами, активирующими клетки, экспрессирующие суперсемейство рецепторов TNF (например, Т-клетки и НК-клетки), но предпочтительно являются факторами, принадлежащими к «суперсемейству TNF» или «суперсемейству рецепторов TNF». В качестве факторов, принадлежащих к
25 «суперсемейству TNF» или «суперсемейству рецепторов TNF», известны лиганды, характеризующиеся тримерной структурой, и рецепторы с тримерной структурой, с которыми связываются лиганды, которые способствуют активации различных иммунных клеток (см. статью *Nat. Rev. Immunol.* , 12, 339-51 (2012)). Примеры факторов, принадлежащих к суперсемейству TNF или суперсемейству
30 рецепторов TNF, включают CD137, CD137L, CD40, CD40L, OX40, OX40L, CD27, CD70, HVEM, LIGHT, RANK, RANKL, CD30, CD153, GITR, GITRL, TNFRSF25 и TL1A. Предпочтительные факторы включают, например, CD137. Примеры антител-агонистов CD137 включают урелумаб (регистрационный номер CAS: 934823-49-1), PF-05082566 и различные известные антитела-агонисты CD137.

Примеры факторов, принадлежащих к костимулирующим молекулам, включают TMIGD2, HHLA2, ICOS, ICOS-лиганд, CD28, CD80 и CD86. Примеры антител-агонистов OX40 включают MOXR0916, MEDI6469, MEDI0562, MEDI6383, PF-04518600s GSK-3174998 и различные известные антитела-агонисты OX40. Примеры антител-агонистов CD40 включают RG-7876, ADC-1013, SEA-CD40, APX005M, дацетузумаб и различные известные антитела-агонисты CD40. Примеры антител-агонистов GITR включают AMG228, АМК-1248, МК-4166, BMS-986156s TRX518 и различные известные антитела-агонисты GITR. Примеры антител-агонистов CD27 включают варлилумаб (регистрационный номер CAS: 1393344-72-3) и различные известные антитела-агонисты CD27.

В неограничивающем варианте по настоящему изобретению пригодные примеры ангиогенных ингибиторов включают, но не ограничиваются только ими, антитела VEGFR2. В некоторых примерах ангиогенные ингибиторы по настоящему изобретению предотвращают обширный рост кровеносных сосудов (ангиогенез), необходимый для выживания опухолей. Например, ангиогенез, стимулируемый опухолевыми клетками для удовлетворения их растущих потребностей в питании и кислороде, можно заблокировать при воздействии на различные молекулы. Примеры ангиогенных ингибиторов включают бевацизумаб, сорафениб, эверолимус, темсиролимус и различные известные ангиогенные ингибиторы.

В данном контексте термин «способ индуцирования TGF- β » означает способ индуцирования TGF- β в клетках. Прежде всего этот способ означает способ индуцирования TGF- β 1, TGF- β 2 и/или TGF- β 3 в клетках при введении дозы. Термин «способ индуцирования TGF- β » включает введение «агента, индуцирующего TGF- β ». Осуществление «способа индуцирования TGF- β » на клеточной линии усиливает экспрессию TGF- β .

Термин «агент, индуцирующий TGF- β » означает агент, который индуцирует TGF- β в клетках. Прежде всего этот агент индуцирует TGF- β 1, TGF- β 2 и/или TGF- β 3 в клетках при его введении. Добавление агента, индуцирующего TGF- β , к клеточной линии усиливает экспрессию TGF- β .

Агент, индуцирующий TGF- β , можно идентифицировать, например, при добавлении агента к клеточной линии и с помощью анализа изменения экспрессии TGF- β . Например, когда изменение уровня экспрессии TGF- β до и

после введения агента в исследуемую клеточную линию анализируют с помощью обычного метода, такого как количественная ПЦР и ИФА при измерении концентрации TGF- β , секретируемого в клеточный супернатант, и наблюдают увеличение уровня экспрессии TGF- β , то агент идентифицируют как агент, который усиливает экспрессию TGF- β в клетках.

Прежде всего агент добавляют к клеточной линии, РНК очищают из выделенных клеток, а затем осуществляют синтез кДНК, проводят ПЦР в реальном времени с использованием синтезированных кДНК в качестве матриц и с использованием TGF- β -специфичных праймеров, и экспрессию TGF- β сравнивают и анализируют относительно экспрессии клеток, к которым агент не добавляли. В другом варианте агент добавляют к клеточной линии, концентрацию TGF- β , секретируемого в супернатанте клеточной культуры, измеряют методом ИФА, и эту концентрацию сравнивают и анализируют по сравнению с концентрацией в клетках, к которым агент не добавляли. Каждый из этих методов является широко известным и его можно осуществлять по общеизвестным протоколам (например, <https://www.cellsignal.jp/learn-and-support/protocols/protocol-western> (фирмы CST), Human/Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF-beta 1 Quantikine ELISA (https://www.rndsystems.com/products/human-mouse-rat-porcine-canine-tgf-beta-1-quantikine-elisa_db100b) (фирмы R & D system)).

В данном контексте термин «агент, индуцирующий экспрессию CLDN6» означает агент, который индуцирует экспрессию CLDN6 в клетках. Прежде всего этот метод означает метод повышения уровня CLDN6 в клетках при введении дозы.

Прежде всего, например, агент добавляют к клеточной линии, РНК очищают из выделенных клеток, а затем выполняют синтез кДНК, проводят ПЦР в реальном времени с использованием синтезированных кДНК в качестве матриц и с использованием CLDN6-специфичных праймеров, и экспрессию CLDN6 сравнивают и анализируют относительно экспрессии клеток, к которым агент не добавляли. В другом варианте, например, агент добавляют к линии раковых клеток, клетки окрашивают антителом против CLDN6 и с помощью проточного цитометра сравнивают и анализируют CLDN6, экспрессируемый на клеточной мембране, по сравнению с CLDN6 в клетках, к которым агент не добавляли. В другом варианте, например, агент добавляют к клеточной линии, а лизат клеток используют для сравнения и анализа экспрессии CLDN6 методом вестерн-

блоттинга с использованием антитела против CLDN6 по сравнению с клетками, к которым агент не добавляли. Каждый из этих методов можно осуществить по общеизвестным протоколам (например, <https://www.cellsignal.jp/learn-and-support/protocols/protocol-western> (фирмы CST), <https://www.takara-bio.co.jp/research/prt/pdfs/prt2.pdf> (фирмы TaKaRa Bio), [https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-анаанализ/cell-анаанализ-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescent/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html](https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-anaанализ/cell-анаанализ-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescent/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html) (фирмы ThermoFisher)).

5
10
Примеры агента, индуцирующего экспрессию CLDN6, включают, но не ограничиваются только ими, карбоплатин, цисплатин, иринотекан, гемцитабин и другие химиотерапевтические агенты.

В некоторых вариантах можно использовать любой по меньшей мере из одного другого противоопухолевого агента по настоящему изобретению, и агент специально не ограничен при условии, что терапевтические или
15 профилактические эффекты другого противоопухолевого агента усиливаются или терапевтические или профилактические эффекты мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы повышаются, когда его используют в сочетании с мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению. В конкретном варианте терапевтический или профилактический
20 эффект представляет собой противоопухолевый эффект.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения комбинированная терапия по изобретению может включать, но не ограничиваясь только ими, описанную выше мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, по меньшей мере, один другой терапевтический агент,
25 иммуномодулирующий агент, вакцину для лечения рака, адоптивную Т-клеточную терапию и удаление клеток Treg. Примеры предпочтительной вакцины для лечения рака включают, но не ограничиваются только ими, вакцины из цельных опухолевых клеток, вакцины из опухолевых антигенов, векторные вакцины, онколитические вирусные вакцины и вакцины из
30 дендритных клеток. В дополнение к описанным выше терапевтическим методам можно проводить мультимодальную терапию, которая включает комбинированное использование хирургического вмешательства, лучевой терапии и тому подобные.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения комбинированную терапию по настоящему изобретению можно осуществлять при объединении описанной выше мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы с цитокиновой терапией, в которой цитокин используют в качестве усилителя противоопухолевого иммунного ответа, и примеры таких терапевтических способов включают, но не ограничиваются только ими, цитокины, такие как IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, GM-CSF, IFN α (интерферон- α), IFN α -2b, IFN β и IFN γ .

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения предлагается агент, индуцирующий цитотоксичность, блокатор роста клеток, ингибитор роста клеток, активатор иммунного ответа, терапевтический противоопухолевый агент или агент для профилактики рака, включающий описанную выше фармацевтическую композицию.

В некоторых вариантах термин «индивидуум», которому вводят описанную выше мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и/или другие противоопухолевые агенты, означает человека или млекопитающее, отличающееся от человека, например, млекопитающее, такое как лошадь, крупный рогатый скот, собака, овца или кошка. Предпочтительно индивидуум является человеком. Индивидуум включает пациента (включая человека или млекопитающее, не являющееся человеком). В некоторых вариантах индивидуум представляет собой пациента, носящего раковые клетки или опухолевые ткани, содержащие раковые клетки. Раковые клетки или опухолевые ткани, содержащие раковые клетки, которые являются мишенями противораковых агентов или комбинированной терапии по настоящему изобретению, специально не ограничены, при условии, что они экспрессируют CLDN6. Предпочтительными клетками, экспрессирующими CLDN6, по настоящему изобретению или, более конкретно, CLDN6-положительными клетками являются раковые клетки. Более предпочтительные примеры типов рака включают, но не ограничиваются только ими, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак желудка, рак пищевода, рак печени, рак молочной железы, рак толстого кишечника (включая рак толстой кишки и рак прямой кишки), эмбрионально-клеточную опухоль (герминому), рак яичка, рак матки, рак шейки матки, холангиокарцинома, рак почки, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы (аденокарцинома протоков поджелудочной железы (PDAC)), рак

мочевого пузыря и атипичную тератоидную рабдоидную опухоль (АТ/РТ). Более предпочтительные примеры типов рака включают, но не ограничиваются только ими, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидную рабдоидную опухоль.

В некоторых вариантах пациентами являются пациенты, которые прошли курс терапии мультиспецифичным антителом и/или каким-либо противоопухолевым агентом до проведения описанной выше комбинированной терапии с использованием мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и дополнительных противоопухолевых агентов. В некоторых вариантах пациентами являются пациенты, для которых нельзя применять стандартные терапевтические методы, или пациенты, у которых стандартные терапевтические методы не эффективны. В некоторых вариантах у пациентов установлен диагноз рака на ранней стадии или рака на конечной стадии.

Кроме того, в некоторых вариантах типы рака, на которые направлена терапия противоопухолевыми агентами или комбинированная терапия с использованием фармацевтических композиций по настоящему изобретению, предпочтительно представляют собой типы рака, при которых число антигенов CLDN6 на клеточной поверхности из расчета на клетку составляет 100 или более, более предпочтительно, типы рака, при которых число антигенов CLDN6 на поверхности клеток из расчета на клетку составляет 200 или более, 300 или более, 400 или более, 500 или более, 600 или более, 700 или более, 800 или более, 900 или более, 1000 или более, 1200 или более, 1400 или более, 1600 или более, 1800 или более или 2000 или более, или даже более предпочтительно, типы рака, при которых количество антигенов CLDN6 на клеточной поверхности из расчета на клетку составляет 3000 или более, 4000 или более, 5000 или более, 6000 или более, 7000 или более, 8000 или более, 9000 или более, 10000 или более, 20000 или более, 30000 или более, 40000 или более или 50000 или более.

Число антигенов CLDN6 на клеточной поверхности из расчета на клетку можно соответствующим образом определить с использованием способов, описанных в данном контексте или известных специалистам в данной области техники, например, при расчете связывающей способности антитела (АВС) CLDN6 на клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии с использованием QIFIKIT (от фирмы DAKO). Число антигенов CLDN6 на

поверхности клеток из расчета на клетку в образце ткани, выделенном из кандидата-мишени, можно определить, чтобы оценить, может ли кандидат являться мишенью, против которой вводят противоопухолевый агент или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению. В образце, в котором количество антигенов CLDN6 на клеточной поверхности из расчета на клетку соответствует критерию, описанному выше, мишенью, из которой получен образец, может являться мишень, против которой вводят противораковый агент или фармацевтическую композицию (при комбинированной терапии) по настоящему изобретению.

В неограничивающем варианте настоящего изобретения противораковые агенты по настоящему изобретению можно использовать для лечения пациентов, которые не чувствительны к лечению другими противоопухолевыми агентами.

Например, противоопухолевые агенты по настоящему изобретению можно использовать для лечения пациентов, которые не чувствительны к лечению химиотерапевтическими агентами. Терапию с использованием противоопухолевых агентов по настоящему изобретению можно проводить у пациентов с CLDN6-положительным раком, у которых введение химиотерапевтического агента не показало требуемой эффективности лекарственного средства или привело к рецидиву рака, или у которых рак оказался резистентным к химиотерапевтическому агенту. Другими словами, терапию с использованием противоопухолевых агентов по настоящему изобретению можно проводить в отношении CLDN6-положительного рака, который уже лечили терапевтическим способом с использованием химиотерапевтического агента.

Например, противораковые агенты по настоящему изобретению можно использовать для лечения пациентов, резистентных к лечению ингибиторами иммунных контрольных точек. Терапию с использованием противоопухолевых агентов по настоящему изобретению можно проводить, например, у пациентов с диагнозом CLDN6-положительного рака, у которых введение ингибитора иммунных контрольных точек не привело к достижению требуемой эффективности лекарственного средства или привело к рецидиву рака, или у которых обнаружена резистентность к ингибитору иммунных контрольных точек. Другими словами, терапию с использованием противоопухолевых агентов по настоящему изобретению можно проводить для лечения CLDN6-

положительного рака, который уже лечили терапевтическим способом с использованием ингибитора иммунных контрольных точек.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции (при комбинированной терапии) по настоящему изобретению можно использовать для лечения пациентов, у которых обнаружена резистентность к лечению другими противоопухолевыми агентами.

Например, фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно использовать для лечения пациентов, резистентных к лечению химиотерапевтическими агентами. Терапию с использованием фармацевтических композиций по настоящему изобретению можно проводить у пациентов с диагнозом CLDN6-положительного рака, у которых введение химиотерапевтического агента не привело к достижению требуемой эффективности лекарственного средства или привело к рецидиву рака, или у которых рак оказался резистентным к химиотерапевтическому агенту. Другими словами, терапию с использованием фармацевтических композиций по настоящему изобретению можно проводить в отношении CLDN6-положительного рака, который уже лечили терапевтическим способом с использованием химиотерапевтического агента. Предпочтительные примеры дополнительных противораковых средств, содержащихся в фармацевтических композициях, включают химиотерапевтические агенты, но не ограничиваются только ими.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции (при комбинированной терапии) по настоящему изобретению можно использовать для лечения пациентов, у которых установлена резистентность к лечению противоопухолевым агентом по настоящему изобретению. Например, терапию с использованием фармацевтических композиций (при комбинированной терапии) по настоящему изобретению можно проводить у пациентов с диагнозом CLDN6-положительного рака, у которых установлена резистентность к противоопухолевому агенту по настоящему изобретению после введения противоопухолевого агента или у которых введение противоопухолевого агента по настоящему изобретению не привело к требуемой эффективности лекарственного средства или рак у которых оказался резистентным к противоопухолевому агенту по настоящему изобретению. Другими словами,

терапию с использованием фармацевтических композиций (при комбинированной терапии) по настоящему изобретению можно проводить в отношении CLDN6-положительного рака, который уже лечили терапевтическим способом с использованием противоопухолевого агента по настоящему изобретению. Предпочтительные примеры дополнительных противоопухолевых агентов, содержащихся в фармацевтических композициях, включают ингибиторы иммунных контрольных точек и химиотерапевтические агенты, но не ограничиваются только ими.

Что касается CLDN6-положительного рака (когда подтверждена экспрессия CLDN6), специалисты в данной области техники могут соответствующим образом исследовать и определить положительную реакцию на CLDN6, с использованием методов, известные специалистам в данной области техники, таких как иммуногистохимическое окрашивание, проточная цитометрия или гибридизация *in situ*.

В одном варианте CLDN6-положительный рак, который ранее лечили противоопухолевыми агентами, отличающимися от противоопухолевых агентов по настоящему изобретению, представлен в качестве примеров CLDN6-положительного рака с резистентностью к другим противоопухолевым агентам. Например, CLDN6-положительный рак, который ранее лечили препаратами платины, представлен в качестве примеров CLDN6-положительного рака, резистентного к препаратам платины, а CLDN6-положительный рак, который ранее лечили ингибитором иммунных контрольных точек, представлен в качестве примеров резистентного к ингибитору иммунных контрольных точек CLDN6-положительного рака. Термин «резистентный/резистентность» можно заменить на «не поддающийся лечению».

Например, CLDN6-положительный рак, рецидив которого наблюдался после проведения терапии, включающей препарат платины, относится к CLDN6-положительному раку, который ранее лечили препаратом платины. CLDN6-положительный рак, рецидив которого наблюдался после проведения терапии, включающей ингибитор иммунных контрольных точек, относится к CLDN6-положительному раку, ранее подвергнувшемуся лечению ингибитором иммунных контрольных точек.

В данном контексте значение термина «резистентный/резистентность», используемого в данном контексте, не ограничивается при условии, что у клеток

или индивидуумов отсутствует ответная реакция (или проявляется нечувствительность) на лечение заболевания или терапию и/или они находятся в состоянии, когда их способность генерировать значительный ответ (например, частичный и/или полный ответ) снижается. Например, словосочетание «раковые заболевания, характеризующиеся устойчивостью к другим противоопухолевым агентам», может означать, что устойчивость развивается после лечения противоопухолевым агентом, отличающимся от противоопухолевого агента по настоящему изобретению. Например, хотя терапия может оказаться эффективной на ранних стадиях, рак может в конечном итоге приобрести резистентность к терапии при повторении лечения, а в некоторых случаях больше не наблюдается регрессия рака или даже он прогрессирует в присутствии других противоопухолевых агентов.

Кроме того, другие примеры CLDN6-позитивного рака, резистентного к другим противоопухолевым агентам, включают типы рака, который рецидивирует после терапии после введения противоопухолевого агента, отличающегося от противоопухолевого агента по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предлагаются наборы для использования в способе по настоящему изобретению, которые содержат антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению или антигенсвязывающую молекулу, полученную способом по настоящему изобретению. Наборы можно упаковывать в смеси с дополнительным фармацевтически приемлемым носителем или средой или с инструкцией по применению, описывающей, как использовать наборы, и тому подобными компонентами.

В другом аспекте изобретения предлагается изделие, содержащее материалы, пригодные для лечения, профилактики и/или диагностики расстройств, описанных выше. Изделие содержит контейнер и этикетку на контейнере или инструкцию по применению, прилагаемую к контейнеру. Пригодные контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и пакеты с раствором для внутривенного введения. Контейнеры можно изготавливать из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер может содержать собственно композицию или комбинацию с другой композицией, эффективной для лечения, профилактики и/или диагностики симптомов, и может содержать стерильное отверстие для доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором или флакон для

внутривенного введения, оснащенный пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный ингредиент в композиции представляет собой мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению. На этикетке или в инструкции по применению указано, что композицию применяют для лечения выбранных симптомов. Более того, промышленное изделие может включать (а) первый контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция содержит мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению и (б) второй контейнер с содержащейся в нем композицией, где композиция содержит дополнительный цитотоксический агент (по меньшей мере, один другой противоопухолевый агент или первый другой противоопухолевый агент, если по меньшей мере один из нескольких типов других противоопухолевых агентов используют в комбинации) или другой терапевтический агент. Изделие может дополнительно включать (в) третий контейнер с содержащейся в нем композицией, причем композиция содержит дополнительный цитотоксический агент (второй другой противоопухолевый агент, когда в комбинации используются несколько типов дополнительных противораковых агентов) или иного рода терапевтический агент. Изделие по этому варианту настоящего изобретения может дополнительно содержать инструкцию по применению, в которой указано, что композицию можно использовать для лечения конкретных симптомов. В другом варианте или дополнительно изделие может содержать второй (или третий, или четвертый) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буферный раствор, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Изделие может дополнительно включать другие материалы, которые могут потребоваться с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферные растворы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Инструкция по применению

Термин «инструкция по применению» используют для обозначения письменного объяснения, обычно включенного в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, и содержит информацию о показаниях, применении, дозировке, способе введения, комбинированной терапии, противопоказаниях

и/или предупреждениях, касающихся применения таких терапевтических продуктов.

В некоторых вариантах настоящего изобретения предлагается набор, содержащий (1) мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, описанную выше, (2) контейнер и (3) инструкцию или этикетку, на которых
5 указано, что мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула и по меньшей мере один тип противоопухолевого агента вводят в комбинации индивидууму для лечения рака у индивидуума.

В других вариантах настоящего изобретения предлагается набор, содержащий (1) по меньшей мере ещё один противоопухолевый агент, (2)
10 контейнер и (3) инструкцию или этикетку, на которых указано, что по меньшей мере ещё один противоопухолевый агент и по меньшей мере один тип описанной выше мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы вводят в комбинации индивидууму для лечения рака у индивидуума.

В других вариантах настоящего изобретения предлагается набор, содержащий (1) мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, описанную выше, (2) по меньшей мере один другой противоопухолевый агент, (3) контейнер и (4) инструкцию или этикетку, на которых указано, что
15 мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и по меньшей мере один другой противоопухолевый агент вводят в комбинации индивидууму для
20 лечения рака у индивидуума.

В некоторых вариантах набор дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. Предпочтительно набор может дополнительно содержать стерильный разбавитель, хранящийся в отдельном дополнительном контейнере.
25 Более конкретно, набор может дополнительно включать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буферный раствор, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы.

Набор по настоящему изобретению может дополнительно включать другие
30 материалы, требуемые с коммерческой точки зрения и точки зрения пользователя, включая другие буферные растворы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы. Набор может дополнительно содержать инструкцию по комбинированной терапии для лечения или профилактики рака.

В некоторых вариантах в наборе по настоящему изобретению в контейнер можно загрузить мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу и/или противоопухолевый агент.

5 В некоторых вариантах осуществления термин «инструкция» относится к письменной инструкции, обычно включенной в коммерческие упаковки фармацевтического препарата, и может содержать информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно применения фармацевтического препарата.

10 В некоторых вариантах набор по настоящему изобретению предлагается, например, в виде коммерческой упаковки для терапевтического продукта.

Наборы могут представлять собой наборы, которые используются исключительно с целью комбинированного применения мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению и по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента, однако наборы могут являться 15 наборами, которые используются для других целей, при условии, что они используются для комбинированного применения мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению и по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента. Например, при условии, что в инструкции или на этикетке набора по настоящему изобретению указано 20 комбинированное введение индивидууму, в инструкции или на этикетке можно указывать на другие варианты осуществления изобретения, например, на использование мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы или по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента как такового.

В настоящем описании, когда используется термин «и/или», он обозначает 25 любую комбинацию каждого из описываемых терминов, указанных до и после слов «и/или». В частности, например, «А, В и/или С» включает следующие семь вариантов: (i) А, (ii) В, (iii) С, (iv) А и В, (v) А и С, (vi) В и С и (vii) А, В и С.

В настоящем изобретении существительное может относиться к одному, двум или более (то есть, по меньшей мере, к одному) грамматических объектов, 30 на которые ссылаются в данном контексте. Например, термин «компонент» относится к одному компоненту или к двум или более компонентам.

Специалисты в данной области техники представляется очевидным, что любые комбинации одного или нескольких описанных в данном контексте вариантов изобретения также включены в настоящее изобретение, при условии,

что они не являются технически несовместимыми, исходя из общих технических знаний специалистов в данной области техники.

Все документы, процитированные в данном контексте, включены в данное описание в качестве ссылки.

5 В следующем разделе представлены примеры способов и композиций по настоящему изобретению. Следует понимать, что на практике можно реализовать различные другие варианты осуществления изобретения, с учетом общего описания, приведенного выше.

Примеры

10 Пример 1

Экспрессия CLDN6 в различных раковых тканях

Экспрессию CLDN6 сравнивали в различных раковых тканях на основании данных Атласа генома рака (TCGA).

15 Как представлено на фиг. 1, экспрессия CLDN6 повышается при раке яичников, аденокарциноме легких (немелкоклеточный рак легкого, NSCLC), эмбрионально-клеточной опухоли (герминоме) и раке матки. Кроме того, хотя заболеваемость оказалась невысокой, экспрессию CLDN6 наблюдали при холангиокарциноме, раке шейки матки, раке молочной железы, раке толстого кишечника (рак толстой кишки и рак прямой кишки), раке печени, раке почки, 20 раке пищевода, раке поджелудочной железы, раке желудка, раке мочевого пузыря, раке головы и шеи (раке верхних отделов аэродигестивного тракта) и т.п.

Пример 2

25 Скрининг вариантов созревания аффинности, полученных из родительского Dual-Fab H183L072, для улучшения цитотоксичности in vitro в отношении опухолевых клеток

2.1. Последовательность вариантов созревания аффинности.

Для увеличения аффинности связывания родительского Dual-Fab H183L072 (тяжелая цепь: с последовательностью SEQ ID NO: 90, легкая цепь: с 30 последовательностью SEQ ID NO: 142) было создано более 1000 вариантов Dual-Fab с использованием H183L072 в качестве матрицы при введении одной или нескольких мутаций в вариабельной области. Антитела экспрессировали с использованием системы Expi293 (от фирмы Invitrogen) и очищали с помощью белка А с последующей гель-фильтрацией, когда гель-фильтрация была

необходима. Последовательности 15 представленных вариантов с множественными мутациями перечислены в таблице 1, а кинетику связывания оценивали при 25°C и/или 37°C с использованием прибора Biacore T200 (от фирмы GE Healthcare), как описано ниже в примере 2.2.2.

Таблица 1

Наименование варианта	Наименование VH	Наименование VL	Последовательности SEQ ID NOs							
			VH	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	VL	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
H183/L072	dBBDu183H	dBBDu072L	90	103	116	129	142	147	152	157
H0868L0581	dBBDu183H0868	dBBDu072L0581	91	104	117	130	143	148	153	158
H1550L0918	dBBDu183H1550	dBBDu072L0918	92	105	118	131	144	149	154	159
H1571L0581	dBBDu183H1571	dBBDu072L0581	93	106	119	132	143	148	153	158
H1610L0581	dBBDu183H1610	dBBDu072L0581	94	107	120	133	143	148	153	158
H1610L0939	dBBDu183H1610	dBBDu072L0939	94	107	120	133	145	150	155	160
H1643L0581	dBBDu183H1643	dBBDu072L0581	95	108	121	134	143	148	153	158
H1647L0581	dBBDu183H1647	dBBDu072L0581	96	109	122	135	143	148	153	158
H1649L0581	dBBDu183H1649	dBBDu072L0581	97	110	123	136	143	148	153	158
H1649L0943	dBBDu183H1649	dBBDu072L0943	97	110	123	136	146	151	156	161
H1651L0581	dBBDu183H1651	dBBDu072L0581	98	111	124	137	143	148	153	158
H1652L0943	dBBDu183H1652	dBBDu072L0943	99	112	125	138	146	151	156	161
H1673L0943	dBBDu183H1673	dBBDu072L0943	100	113	126	139	146	151	156	161
H1673L0581	dBBDu183H1673	dBBDu072L0581	100	113	126	139	143	148	153	158
H2591L0581	dBBDu183H2591	dBBDu072L0581	101	114	127	140	143	148	153	158
H2594L0581	dBBDu183H2594	dBBDu072L0581	102	115	128	141	143	148	153	158
CD3ε	CD3εVH	CD3εVL	162				163			
CD137	CD137VH	CD137VL	164				165			

2.2. Информация о кинетике связывания вариантов с созревшей аффинностью

2.2.1. Экспрессия и очистка CD3 и CD137 человека

Гамма- и эпсилон-субъединицы комплекса CD3 человека (линкер CD3_{eg} человека) были связаны с помощью 29-мерного линкера, а метка Flag была слита с С-концевым фрагментом гамма-субъединицы (с последовательностью SEQ ID NO: 169). Эту конструкцию временно экспрессировали с использованием клеточной линии FreeStyle293F (от фирмы Thermo Fisher). Кондиционированную среду, экспрессирующую линкер CD3_{eg} человека, концентрировали с использованием колонки, заполненной смолами Q HP (от фирмы GE Healthcare), а затем наносили на колонку для аффинной хроматографии с меткой FLAG. Фракции, содержащие линкер CD3_{eg} человека, собирали и затем подвергали гель-фильтрации на колонке Superdex 200 (от фирмы GE Healthcare), уравновешенной буферным раствором 1x D-PBS. Фракции, содержащие линкер CD3_{eg} человека, затем объединяли и хранили при -80°C.

Внеклеточный домен CD137 человека (ECD) (с последовательностью SEQ ID NO: 179) содержащий гексагистидин (His-метку) и акцепторный пептид биотина (BAP) в его С-концевом фрагменте временно экспрессировали с использованием клеточной линии FreeStyle293F (от фирмы Thermo Fisher). Кондиционированную среду, экспрессирующую ECD CD137 человека, наносили на колонку HisTrap HP (от фирмы GE Healthcare) и элюировали буфером, содержащим имидазол (от фирмы Nacalai). Фракции, содержащие ECD CD137 человека, собирали и затем подвергали гель-фильтрации на колонке Superdex 200 (от фирмы GE Healthcare), уравновешенной буферным раствором 1x D-PBS. Фракции, содержащие ECD CD137 человека, затем объединяли и хранили при -80°C.

2.2.2. Определение аффинности к CD3 и CD137 человека

Аффинность связывания антител Dual-Fab (Dual-Ig) к CD3 человека оценивали при 25°C с использованием прибора Biacore T200 (от фирмы GE Healthcare). Античеловеческий Fc (от фирмы GE Healthcare) иммобилизовали на всех проточных ячейках сенсорного чипа CM4 с использованием набора для конденсации аминов (от фирмы GE Healthcare). Антитела удерживались на поверхности анти-Fc-сенсора, затем через проточную кювету вводили рекомбинантный человеческий CD3 или CD137. Все антитела и аналиты

готовили в буферном растворе ACES pH 7,4, содержащем 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0,05% Твин 20 и 0,005% NaN₃. Поверхность сенсора регенерировали после каждого цикла с помощью 3M MgCl₂. Аффинность связывания определяли при обработке и аппроксимации данных к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation, версия 2.0 (от фирмы GE Healthcare). Анализ аффинности связывания CD137 проводили в тех же условиях, за исключением того, что устанавливали температуру анализа 37°C. Аффинность связывания антител Dual-Fab с рекомбинантными человеческими CD3 и CD137 представлена в таблице 2 (термин E используется для представления K_{on}, K_{off}, а значения KD в таблице означают «10 в степени» и, например, 3.54E+04 = 3.54*10⁴).

Таблица 2

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

Пример 3

15 Рентгеноструктурный анализ кристаллической структуры комплекса H0868L0581/hCD137

3.1. Подготовка антитела для сокристаллического анализа

H0868L581 выбрали для сокристаллического анализа с белком hCD137.

Бивалентное антитело временно трансфицировали и экспрессировали с

использованием системы экспрессии Expi293 (от фирмы Thermo Fisher Scientific). Культуральные супернатанты собирали и антитела выделяли с использованием очистки супернатантов с помощью аффинной хроматографии на системе MabSelect SuRe (от фирмы GE Healthcare) с последующей гель-фильтрационной хроматографией с использованием колонки Superdex200 (от фирмы GE Healthcare).

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

Внеклеточный домен человеческого CD137, слитый с Fc через расщепляемый фактором Ха линкер (CD137-FFc, с последовательностью SEQ ID NO: 166), экспрессировали в клетках HEK293 в присутствии кифуненина. CD137-FFc из культуральной среды очищали с помощью аффинной хроматографии (на колонке HiTrap MabSelect SuRe от фирмы GE Healthcare) и эксклюзионной хроматографии (на колонке HiLoad 16/600 Superdex 200 pg от фирмы GE Healthcare). Fc расщепляли фактором Ха, и полученный внеклеточный домен CD137 дополнительно очищали с помощью тандемно соединенной гель-фильтрационной колонки (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg от фирмы GE Healthcare) и колонки с белком А (HiTrap MabSelect SuRe 1 ml от фирмы GE Healthcare), и затем очищали с использованием Бензамидин-сефарозной смолы (от фирмы GE Healthcare). Фракции, содержащие внеклеточный домен CD137, объединяли и хранили при -80°C.

3.3. Получение Fab-фрагмента H0868L0581 и контрольного антитела против CD137

Антитела для анализа кристаллической структуры временно трансфицировали и экспрессировали с использованием системы экспрессии Expi293 (от фирмы Thermo Fisher Scientific). Культуральные супернатанты собирали и антитела очищали из супернатантов с помощью аффинной хроматографии на смоле MabSelect SuRe (от фирмы GE Healthcare) с последующей гель-фильтрационной хроматографией с использованием колонки Superdex200 (от фирмы GE Healthcare). Fab-фрагменты H0868L0581 и известного контрольного антитела против CD137 (далее называемого 137Ctrl, характеризующегося тяжелой цепью с последовательностью SEQ ID NO: 167, легкой цепью с последовательностью SEQ ID NO: 168) получали обычным способом с использованием ограниченного расщепления эндопротеазой Lys-C

(от фирмы Roche), с последующим нанесением на колонку с белком А (MabSlect SuRe от фирмы GE Healthcare) для удаления фрагментов Fc, и с использованием катионообменной колонки (HiTrap SP HP от фирмы GE Healthcare) и колонки для гель-фильтрации (Superdex200 16/60 от фирмы GE Healthcare). Фракции, содержащие Fab-фрагмент, объединяли и хранили при -80°C .

3.4. Получение комплекса H0868L0581 Fab, 137Ctrl и CD137 человека

Очищенный CD137 смешивали с эндогликозидазой F1, слитой с GST-меткой (собственной разработки), для дегликозилирования с последующей очисткой CD137 с использованием гель-фильтрационной колонки (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg от фирмы GE Healthcare) и колонки с белком А (HiTrap MabSelect SuRe 1 ml от фирмы GE Healthcare). Очищенный CD137 смешивали с H0868L0581 Fab. Комплекс очищали с помощью гель-фильтрации на колонке (Superdex 200 Enhance 10/300 GL от фирмы GE Healthcare) и затем очищенный комплекс H0868L0581 Fab и CD137 смешивали с 137Ctrl. Третичный комплекс очищали гель-фильтрационной хроматографией (на колонке Superdex200 с размерностью насадки 10/300 от фирмы GE Healthcare), с использованием колонки, уравновешенной буферным раствором 25 мМ HEPES, pH 7,3 и 100 мМ NaCl.

3.5. Кристаллизация

Очищенные комплексы концентрировали до концентрации приблизительно 10 мг/мл и кристаллизацию проводили методом диффузии паров в сидячей капле при 21°C . Резервуарный раствор включал 0,1 М трис-гидрохлорид, pH 8,5, 25,0 об.% монометилового эфира полиэтиленгликоля 550.

3.6. Сбор данных и определение структуры

Данные по рентгеноструктурному анализу были получены с помощью системы X06SA на синхротроне SLS. Во время измерений кристалл постоянно находился в потоке азота при температуре -178°C для поддержания его в замороженном состоянии, а всего получили 1440 рентгенограмм с помощью детектирующей системы Eiger X16M (от фирмы DECTRIS), подсоединенной к каналу для прохождения пучка, каждый раз поворачивая кристалл на $0,25^{\circ}$ градуса. Определение параметров ячейки, индексацию дифракционных пятен и обработку дифракционных данных, полученных на рентгенограммах, проводили с помощью программного обеспечения autoPROC (см. статью Acta. Cryst., D67: 293-302 (2011)), программного обеспечения XDS Package (см. статью Acta.

Cryst., D66: 125-132 (2010)) и платформы AIMLESS (см. статью Acta Cryst., D69: 1204-1214 (2013)), и в результате получили данные о дифракционной интенсивности дифракции с разрешением до 3,705 ангстрем. Статистика кристаллографических данных представлена в таблице 3.

5 Структуру определяли с использованием молекулярной замены и программы Phaser (см. статью J. Appl. Cryst., 40: 658-674 (2007)). Модель поиска получали на основе опубликованной кристаллической структуры (код PDB: 4NKI и 6MI2). Модель строили с помощью программы Coot (см. статью Acta Cryst., D66: 486-501 (2010)) и уточняли с помощью программного обеспечения Refmac5 (см. статью Acta Cryst., D67: 355-367 (2011)) и программы PHENIX (см. 10 статью Acta Cryst., D66: 213-221 (2010)). Кристаллографический фактор достоверности (R) для данных дифракционной интенсивности в диапазоне 77,585–3,705 ангстрем составил 22,33 % при значении R-фактора свободного отложения 27,50 %. Статистика уточнения структуры представлена в таблице 3.

15 Таблица 3

Рентгеновские данные и статистика по их уточнению	
Собранные данные	
Пространственная группа	<i>C2</i>
Элементарная ячейка	
<i>a, b, c</i> (Å)	233,795, 74,019, 81,986
α, β, γ (°)	90,000, 108,858, 90,000
Разрешение (Å)	77,585-3,705
Полное внутреннее отражение	99,488
Уникальное отражение	14,221
Завершенность (наивысшее разрешение рентгенограммы) (%)	99,2 (99,7)
R_{merge}^a (наивысшее разрешение рентгенограммы)	0,161 (1,052)
Уточнения	
Разрешение (Å)	48,822-3,705
Отражения	14,195
R-фактор ^b (R_{free}^b) (%)	22,33 (27,50)
Среднеквадратичное отклонение от идеального значения	0,003
По длине связи (Å)	
По углу связи (°)	0,618

a - $R_{merge} = \sum hkl \sum j |I_j(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum hkl \sum j I_j(hkl)$, где $I_j(hkl)$ и $\langle I(hkl) \rangle$ являются интенсивностями измерения j и средней интенсивностью отражения с индексами hkl , соответственно.

б - R-фактор = $\sum hkl |F_{расчитанный}(hkl) - F_{наблюдаемый}(hkl)| / \sum hkl |F_{наблюдаемый}(hkl)|$, где $F_{наблюдаемый}$ и $F_{расчитанный}$ представляют собой наблюдаемые и рассчитанные структурные множители амплитуд соответственно.

в - R_{free} рассчитан с учетом 5%-ого случайного отражения.

3.7. Идентификация сайтов взаимодействия H0868L0581 Fab и CD137

Кристаллическую структуру третичного комплекса H0868L0581 Fab, 137Ctrl и CD137 определяли с разрешением 3,705 ангстрем. На фиг. 2 и 3 эпитоп контактной области Fab H0868L0581 картирован в аминокислотной последовательности CD137 и в кристаллической структуре соответственно. Эпитоп включает аминокислотные остатки CD137, которые содержат один или несколько атомов, расположенных на расстоянии 4,5 ангстрем от любой части H0868L0581 Fab в кристаллической структуре. Кроме того, на фиг. 2 и 3 выделен эпитоп в пределах 3,0 ангстрем.

Как показано на фиг. 2 и 3, по данным кристаллической структуры было установлено, что L24-N30 в CRD1 в составе CD137 связан в кармане, образованном между тяжелой цепью и легкой цепью Fab H0868L0581, прежде всего, L24-S29, глубоко утоплены таким образом, что N-конец CD137 ориентирован вглубь кармана. Кроме того, N39-I44 в CRD1 и G58-I64 в CRD2 в составе CD137 распознаны как тяжелая цепь CDR в составе H0868L0581 Fab. CRD представляет собой название доменов, разделенных структурой, образованной Cys-Cys, называемой эталонным CRD, как описано в международной заявке WO2015/156268.

Мы идентифицировали антитело против человеческого CD137, которое распознает N-концевую область, прежде всего L24-N30 человеческого CD137, а также определили, что антитело против этой области может активировать CD137 на клетках.

Пример 4

Получение триспецифического антитела против CLDN6/Dual-Fab

Триспецифические антитела, одно плечо которых направлено на клаудин-6, а другое плечо с функцией двойной направленности - на CD3 и CD137, получали с использованием технологий FAST-Ig (см. международную заявку WO2013065708) или CrossMab (фиг. 4). Антиген-мишень каждой области Fv в триспецифических антителах показан в таблице 4. Правило наименования каждой цепи показано на фиг. 4, а последовательности SEQ ID NO показаны в таблице 5. Последовательность каждой варибельной области показана в таблице 6.

Fc-область являлась сайленсированным и дегликозилированным рецептором Fc-гамма-R. Мутации Act5 (M428L, N434A, Q438R, S440E),

усиливающие FcRn, использовали для улучшения фармакокинетики (PK) антител. Сконструированные компоненты, внесенные в каждое антитело, представлены в таблицах 7-1 и 7-2, а элементы конструкций FAST06, FAST22 и FAST30 представлены в таблице 8. Все антитела экспрессировали в виде 5 триспецифической формы с помощью временной экспрессии в клетках Expi293 (от фирмы Invitrogen) и очищали, как описано в эталонном примере 1.

Таблица 4

Наименования антител и Fv-фрагментов

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

Таблица 5

Наименования антител и последовательности SEQ ID NO

Код антитела	Наименование антитела	Последовательности SEQ ID NO			
		Цепь 1	Цепь 2	Цепь 3	Цепь 4
Ab01	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG13251326	41	50	54	68
Ab02	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG13251326	41	50	55	68
Ab03	CLDN6AE25/DualAE05-SG14001326	42	51	56	69
Ab04	CLDN6AE25/DualAE15-SG14001326	42	51	57	69
Ab05	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1386k1385hV11	44	52	60	70
Ab06	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1386k1385hV11	44	52	61	70
Ab07	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG14051406	45	50	62	68
Ab08	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG14051406	45	50	63	68
Ab09	CLDN6AE25/DualAE05-SG14071406	46	51	64	69
Ab10	CLDN6AE25/DualAE15-SG14071406	46	51	65	69
Ab11	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1384k1383hV11	47	52	66	70
Ab12	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1384k1383hV11	47	52	67	70
Ab13	CLDN6AE25/DualAE05-SG13251326	48	53	56	71
Ab14	CLDN6AE25/DualAE15-SG13251326	48	53	57	71
Ab15	CLDN6AE25/DualAE05-SG14051406	49	53	64	71
Ab16	CLDN6AE25/DualAE15-SG14051406	49	53	65	71
Ab17	xCLDN6AE25/DualAE05-xSG1350k1349hV11	43	52	58	70
Ab18	xCLDN6AE25/DualAE15-xSG1350k1349hV11	43	52	59	70

Таблица 6

Наименования Fv, VH, VL и их CDR1-3 последовательности SEQ ID NO

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

Таблица 7-1

Сконструированные компоненты, введенные в каждое антитело

Код антитела	Наименование антитела	Улучшение связывания FcRn	Спаривание Н- и L-цепей	Спаривание тяжелой цепи
Ab01	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG13251326		FAST22	S3
Ab02	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG13251326		FAST22	S3
Ab03	CLDN6AE25/DualAE05-SG14001326		FAST6	S3
Ab04	CLDN6AE25/DualAE15-SG14001326		FAST6	S3
Ab05	xCLDN6AE25/DualAE05- xSG1386k1385hV11		Cross-mab	Выступ во впадину
Ab06	xCLDN6AE25/DualAE15- xSG1386k1385hV11		Cross-mab	Выступ во впадину
Ab07	CLDN6AE25EK/DualAE05KE-SG14051406	Act5 (+)	FAST22	S3
Ab08	CLDN6AE25EK/DualAE15KE-SG14051406	Act5 (+)	FAST22	S3
Ab09	CLDN6AE25/DualAE05-SG14071406	Act5 (+)	FAST6	S3
Ab10	CLDN6AE25/DualAE15-SG14071406	Act5 (+)	FAST6	S3
Ab11	xCLDN6AE25/DualAE05- xSG1384k1383hV11	Act5 (+)	Cross-mab	Выступ во впадину
Ab12	xCLDN6AE25/DualAE15- xSG1384k1383hV11	Act5 (+)	Cross-mab	Выступ во впадину
Ab13	CLDN6AE25/DualAE05-SG13251326		FAST30	S3
Ab14	CLDN6AE25/DualAE15-SG13251326		FAST30	S3
Ab15	CLDN6AE25/DualAE05-SG14051406	Act5 (+)	FAST30	S3

Таблица 7-2

Продолжение таблицы 7-1

Код антитела	Наименование антитела	Улучшение связывания FcRn	Спаривание Н- и L-цепей	Спаривание тяжелой цепи
Ab16	CLDN6AE25/DualAE15-SG14051406	Act5 (+)	FAST30	S3
Ab17	xCLDN6AE25/DualAE05- xSG1350k1349hV11		Cross-mab	Выступ во впадину
Ab18	xCLDN6AE25/DualAE15- xSG1350k1349hV11		Cross-mab	Выступ во впадину

Таблица 8

5 Элементы FAST-Ig-конструирования в переменных областях

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

Пример 5Анализ FACS специфичности в отношении семейства CLDN

Аминокислотные последовательности CLDN3, CLDN4, CLDN6 и CLDN9 являются высококонсервативными. По этой причине мы исследовали

5 специфичность связывания CLDN6 на примере CLDN6, связывающего Fv, содержащего 65HQ39E в качестве VH и 54L0532Q38K в качестве VL, с помощью анализа FACS. hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF и hCLDN9/BaF инкубировали в присутствии биспецифичного антитела anti-CLDN6/CD3 (CS2961), содержащего CLDN6-связывающий Fv CLDN6AE25EK и CD3-

10 связывающий Fv (вариабельная область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 184, вариабельная область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 185) в концентрации 15 мкг/мл. В качестве контроля окрашивания использовали другое биспецифичное антитело anti-CLDN6/CD3 (6PHU3/TR01) и антитело, не обладающее способностью связываться с CLDN6 (KLH/TR01).

15 Антитела 6PHU3/TR01 и KLH/TR01 содержат один и тот же CD3-связывающий Fv (вариабельная область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 188, вариабельная область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 189). CLDN6-связывающий Fv в составе 6PHU3/TR01 содержит вариабельную область

20 тяжелой цепи, представленную последовательностью SEQ ID NO: 190, и вариабельную область легкой цепи, представленную последовательностью SEQ ID NO: 191. Антитело KLH/TR01 содержит KLH-связывающий Fv (вариабельная область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 186, вариабельная область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 187).

Связывание каждого антитела определяли с помощью конъюгированного с

25 Alexa Fluor 488 IgG человека (от фирмы Invitrogen). Мертвые клетки отделяли окрашиванием с помощью eFlour 780 (от фирмы Invitrogen).

Как представлено на фиг. 5, CS2961 проявляет лучшую специфичность по отношению к CLDN6 по сравнению с 6PHU3/TR01.

Пример 6

30 Оценка Т-клеточно-зависимой клеточной цитотоксичности биспецифичных антител против CLDN6/CD3 и триспецифичных антител против CLDN6/Dual-Fab

На фиг. 6 представлена Т-клеточно-зависимая клеточная цитотоксичность биспецифического антитела (CS3348) против CLDN6/CD3 и пяти триспецифичных антител против CLDN6/Dual-Fab (PPU4134, PPU4135, PPU4136,

PPU4137 и PPU4138) против NIH:OVCAR-3 (линия клеток рака яичников с высокой экспрессией CLDN6) и A2780 и COV413A (линии клеток рака яичников с низкой экспрессией CLDN6). Последовательности антител представлены в таблице 9.

5 Таблица 9

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

Клеточную цитотоксичность оценивали с помощью анализа LDH (определение уровня лактатдегидрогеназы) с использованием клеток РВМС человека. 15000 клеток-мишеней и 150000 клеток РВМС человека (E/T = 10) высевали в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном и инкубировали с различными концентрациями антител в течение ночи при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Гибель клеток-мишеней оценивали с помощью набора для определения цитотоксичности по уровню LDH (от фирмы Takara Bio). Цитотоксическую активность (%) каждого антитела рассчитывали по следующей формуле.

15
$$\text{Цитотоксическая активность (\%)} = (A - B - C) \times 100 / (D - C),$$
 где «А» представляет среднее значение поглощения в лунках, обработанных антителом и РВМС, «В» представляет среднее значение поглощения в лунках только с эффекторными клетками РВМС, «С» представляет среднее значение поглощения в лунках только с необработанными клетками-мишенями, и «D» представляет собой среднее значение поглощения в лунках с клетками-мишенями, лизированными тритоном-X. При этом цитотоксичность, определенную в лунке, содержащей РВМС и клетки-мишени без антител, устанавливали на 0%. Все триспецифичные антитела против CLDN6/Dual-Fab проявляли Т-клеточно-зависимую клеточную цитотоксичность в отношении 25 клеток, экспрессирующих CLDN6.

Пример 7Получение дважды гуманизированной мыши CD137/CD3

Штамм нокинской (KI) мышинной линии с CD137 человека получали при замене эндогенной геномной области Cd137 мыши на геномную последовательность CD137 человека с использованием эмбриональных стволовых клеток мыши. Мышей с заменой фрагмента EDG на человеческий CD3 использовали в качестве штамма, в котором все три компонента CD3-комплекса — CD3e, CD3d и CD3g — заменяли их аналоги, CD3E, CD3D и CD3G человека (см. статью Scientific. Rep., 8: 46960 (2018)). Дважды гуманизированный CD137/CD3 мышинный штамм получали при скрещивании нокинских (KI) мышей с последовательностью CD137 человека со штаммом мышей, характеризующимся наличием замещенных EDG на CD3 человека.

Пример 8

15 Оценка эффективности in vivo триспецифичных антител против CLDN6/Dual-Fab на hCD3/hCD137 мышах

Антитела, полученные, как описано в примере 4, оценивали по их эффективности in vivo с использованием опухоленесущих моделей.

Для оценки эффективности in vivo использовали дважды гуманизированных CD3/CD137 мышей, представленных в примере 6, которые далее названы «мышами hCD3/hCD137». Клетки, которые характеризовались стабильной экспрессией человеческого CLDN6, трансплантировали мышам hCD3/hCD137, и мышам hCD3/hCD137 с подтвержденным образованием опухоли лечили при введении антител.

25 Более конкретно, при оценке эффективности антител в качестве лекарственных средств с использованием опухоленесущих моделей, проводили приведенные ниже тесты. Клетки, экспрессирующие CLDN6 (1×10^6 клеток), трансплантировали в паховую подкожную область мышам hCD3/hCD137. День трансплантации определяли как день 0. В день 9 после трансплантации мышам рандомизировали в группы в соответствии с их массой тела и размером опухоли. В день рандомизации антитела вводили внутривенно в хвостовую вену в дозе 6 мг/кг. Антитела вводили только один раз. Объем опухоли и массу тела измеряли с помощью системы противоопухолевого тестирования (ANTES версия 7.0.0.0) каждые 3-4 дня.

Другой метод оценки эффективности *in vivo* заключался в том, что клетки, экспрессирующие CLDN6, трансплантировали в правый бок мышей hCD3/hCD137. В день 9 мышей рандомизировали в группы в зависимости от объема опухоли и массы тела и вводили внутривенно носитель или антитела, как описано в примере 3. Объем опухоли измеряли дважды в неделю. Для анализа IL-6 у мышей отбирали кровь через 2 ч после лечения. Образцы плазмы анализировали с помощью панели Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Th1 в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Пример 9

Исследование цитотоксической активности *in vitro* с использованием анализа высвобождения лактатдегидрогеназы

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

В качестве клеток-мишеней использовали линию клеток NUGC-3 рака желудка человека (из коллекции JCRB), линию клеток PA-1 тератокарциномы человека (из коллекции ATCC), линию клеток SNG-M рака матки человека (JCRB), линию клеток NEC8 опухоли зародышевых клеток яичка человека (JCRB), линию клеток NEC14 опухоли желточного мешка человека (JCRB), линию клеток CHLA-02-ATRT атипичной тератоидной рабдоидной опухоли человека (ATCC), линию клеток HT-1197 рака мочевого пузыря человека (ATCC) и линию клеток OUMS-23 рака толстой кишки человека (JCRB), которые экспрессируют CLDN6 человека.

После промывки замороженных РВМС (CTL – цитотоксические лимфоциты) промыли антиагрегатным раствором CTL и средой RPMI-1640 (от фирмы SIGMA), содержащей 10% FBS (называнной 10% FBS/RPMI), количество РВМС довели до 3×10^6 клеток/мл. Эти РВМС использовали в качестве эффекторных клеток. Клетки-мишени отбирали из культуральной колбы и высевали по 100 мкл/лунку, содержащую $1,5 \times 10^4$ клеток, в лунки прозрачного 96-луночного планшета с U-образным дном (от фирмы Corning). В лунки добавляли 50 мкл раствора человеческих РМВС ($1,5 \times 10^5$ клеток) и 50 мкл препарата антител в концентрации, выбранной из 0,004, 0,04, 0,4, 4 или 40 нМ соответственно. После инкубации в течение ночи при 37°C планшет центрифугировали и 100 мкл культурального супернатанта из каждой лунки

переносили в новый прозрачный 96-луночный планшет с плоским дном. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл реагента для детектирования LDH (раствор красителя, содержащий катализатор, от фирмы TaKaRa), затем планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Поглощение при 490 нм и 620 нм измеряли с помощью анализатора EnVision (от фирмы PerkinElmer, Япония).

Цитотоксическая активность (%) = $(A - B - C) \times 100 / (D - C)$, где «А» представляет среднее значение поглощения в лунках, обработанных антителом и РВМС, «В» представляет среднее значение поглощения в лунках только с эффекторными клетками РВМС, «С» представляет среднее значение поглощения в лунках только с необработанными клетками-мишенями, и «D» представляет собой среднее значение поглощения в лунках с клетками-мишенями, лизированными тритоном-Х. Среднее значение поглощения лунок с культуральной средой вычитали из всех значений поглощения. Кроме того, цитотоксичность, рассчитанную в лунке, содержащей РВМС и клетки-мишени без антител, устанавливали на 0%. Триспецифичные антитела anti-CLDN6/Dual-Fab характеризовались Т-клеточно-зависимой клеточной цитотоксичностью против всех использованных клеточных линий.

Результаты показаны на фиг. 8.

Пример 10

Анализ блокировки роста клеток в реальном времени (с использованием анализатора xCELLigence)

Блокировку Т-клеточно-зависимого роста клеток, опосредованную триспецифичными антителами anti-CLDN6/Dual-Fab, оценивали с помощью анализа пролиферации клеток с использованием прибора xCELLigence RTCA MP (от фирмы ACEA Biosciences).

В качестве клеток-мишеней использовали линию клеток рака яичников человека NIH:OVCAR-3 (из коллекции ATCC) и линию клеток рака легких человека NCI-H1435 (ATCC), которые экспрессируют CLDN6 человека.

У здоровых взрослых добровольцев с помощью шприца, в который предварительно вводили 500 мкл 1000 ЕД/мл раствора гепарина (от фирмы NovoNordisk), отбирали 50 мл периферической крови. В периферическую кровь, поровну разделенную на четыре равные части при разведении буферным раствором PBS (-), вводили 15 мл среды Ficoll-Paque PLUS и центрифугировали

в пробирке для отделения лимфоцитов Leucosep (от фирмы Greiner Bio-One). После центрифугирования отделяющей пробирки (2150 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре) отделяли слой фракции моноклеарных клеток периферической крови (далее названных РВМС). После однократной промывки РВМС средой RPMI-1640 Medium (от фирмы SIGMA), содержащей 10% FBS (названной 10% FBS/RPMI), содержание РВМС доводили до 4×10^5 клеток/мл. Эти РВМС использовали в качестве эффекторных клеток.

1×10^4 клеток-мишеней высевали в лунки планшета E-Plate 96 (от фирмы Roche Diagnostics) из расчета 100 мкл/лунку. После культивирования в течение ночи добавляли 2×10^4 Т-клеток в смеси с антителом в концентрации, выбранной из ряда 0,004, 0,04, 0,4, 4 или 40 нМ, по 50 мкл/лунку соответственно. Рост клеток контролировали каждые 15 мин с помощью прибора xCELLigence в течение 72 ч во время инкубации планшетов. Степень блокировки роста клеток (CGI:%) определяли по значению клеточного индекса в соответствии с формулой, представленной как $CGI (\%) = 100 - (CI_{Ab} \times 100 / CI_{NoAb})$. « CI_{Ab} » представляет собой значение клеточного индекса в лунках с антителом в определенный момент эксперимента, а « CI_{NoAb} » представляет собой среднее значение клеточного индекса в лунках без антитела в одно и то же время эксперимента.

Результаты свидетельствуют о том, что все триспецифичные антитела anti-CLDN6/Dual-Fab блокировали рост клеточных линий раковых клеток, экспрессирующих CLDN6 (OVCAR-3 и NCI-H1435), дозозависимым образом.

Результаты представлены на фиг. 9.

Пример 11

Активация Т-клеток в клеточных линиях NFAT-luc2 Jurkat, сокультивируемых с опухолевыми клетками, экспрессирующими CLDN6

Активацию Т-клеток при связывании CD3 триспецифичными антителами anti-CLDN6/Dual-Fab измеряли с помощью системы анализа люциферазы с использованием клеток GloResponse NFAT-luc2 Jurkat (от фирмы Promega, J1601) в качестве эффекторных клеток. В качестве клеток, эндогенно экспрессирующих клаудин-6, использовали клеточную линию рака яичника человека OVCAR-3 (из коллекции ATCC) и клеточную линию аденокарциномы легкого NCI-H1435 (ATCC). В качестве CLDN6-негативных клеток использовали линию клеток рака мочевого пузыря человека 5637 (ATCC).

Анализ проводили, как указано ниже. Сначала описанные выше линии раковых клеток отбирали из культурального флакона и добавляли по 25 мкл/лунку (2×10^4 клеток) в лунки белого 96-луночного планшета с плоским дном (от фирмы Coster, #3917). Затем добавляли 1×10^5 репортерной клеточной линии Jurkat/NFAT-RE в смеси с антителом в концентрации, выбранной из ряда 0,003, 0,03, 0,3, 3 или 30 нМ, в количестве 25 мкл/лунку соответственно. После культивирования в течение ночи при 37°C добавляли реагент Bio-Glo (от фирмы Promega, #G7941) по 75 мкл/лунку с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем измеряли люминесценцию, возникающую в результате активации клеток Jurkat, с помощью анализатора EnSpire (от фирмы PerkinElmer, Япония). Кратность люминесценции в каждой лунке рассчитывали при сравнении лунок с антителом и без него.

Результаты оценки способности активировать сигнал NFAT триспецифичных антител anti-CLDN6/Dual-Fab и CS3348 с использованием линий клеток человека, экспрессирующих CLDN6 (OVCAR3 и NCI-H1435), и CLDN6-негативной клеточной линии (5637) в качестве клеток-мишеней представлены на фиг. 10.

В присутствии клаудин-6-положительных клеточных линий наблюдали активацию NFAT всеми антителами дозозависимым образом. С другой стороны, почти никакой активации не наблюдали даже при высокой концентрации антитела в присутствии клаудин-6-негативной клеточной линии 5637.

Пример 12

Активация NF каппа В в линии Jurkat, экспрессирующей 4-1BB человека, и репортерной клеточной линии люциферазы, сокультивируемой с опухолевыми клетками, экспрессирующими CLDN6

Активацию NF каппа В благодаря связыванию CD137 с помощью триспецифичных антител anti-CLDN6/Dual-Fab оценивали с использованием линии GloResponse™ NF каппа В luc2/4-1BB Jurkat (от фирмы Promega, CS196004). В качестве клеток, эндогенно экспрессирующих клаудин-6, использовали линию клеток рака яичников человека OVCAR-3 (из коллекции ATCC) и линию клеток аденокарциномы легких NCI-H1435 (ATCC). В качестве CLDN6-негативных клеток использовали линию клеток рака мочевого пузыря человека 5637 (ATCC).

Анализ проводили, как указано ниже. Сначала описанные выше линии раковых клеток отбирали из культуральной колбы и добавляли по 25 мкл/лунку ($2,5 \times 10^4$ клеток) в лунки белого 96-луночного планшета с плоским дном (от фирмы Coster, #3917). Затем переносили 5×10^4 клеток репортерной клеточной линии NF kappa B luc2/4-1BB Jurkat и смешивали с 25 мкл среды, содержащей титрованные антитела. Аналитические планшеты инкубировали при 37°C в течение 6 ч, затем добавляли реагент Bio-Glo (от фирмы Promega, #G7941) по 75 мкл/лунку с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем измеряли люминесценцию, возникающую в результате активации клеток Jurkat, с помощью анализатора EnVision (от фирмы PerkinElmer, Япония). Кратность люминесценции в каждой лунке рассчитывали при сравнении лунок с каждым антителом (0,003, 0,3, 0,3, 3 и 30 нМ) и без антитела.

Результаты оценки способности активировать сигнал NF каппа В триспецифичных антител anti-CLDN6/Dual-Fab и CS3348 с использованием линий клеток человека, экспрессирующих CLDN6 (OVCAR3 и NCI-H1435), и CLDN6-негативной клеточной линии (5637) в качестве клеток-мишеней представлены на фиг. 11.

В присутствии клаудин-6-положительных клеточных линий наблюдали активацию NF каппа В всеми антителами дозозависимым образом. Прежде всего гораздо большую активацию наблюдали в присутствии триспецифичных антител anti-CLDN6/Dual-Fab. С другой стороны, никакой активации не наблюдали даже при высокой концентрации антитела в присутствии клаудин-6-негативной клеточной линии 5637.

Пример 13

Исследование противоопухолевой эффективности in vivo

Противоопухолевую эффективность триспецифичных антител anti-CLDN6/Dual-Fab оценивали in vivo с использованием модели опухоленесущих мышей. Линию раковых клеток человека, экспрессирующих человеческий CLDN6 (NCI-H1435 или OV-90), трансплантировали подкожно гуманизированным мышам NOG, которым трансплантировали стволовые клетки человека, полученные из пуповинной крови (модель мышей HuNOG). Опухоленесущих мышей рандомизировали в группы лечения для введения антитела или носителя в качестве контроля (таблица 10).

После рандомизации и распределения в группы мышей в соответствии с размером опухоли и массой тела с дня 8 (NCI-H1435) или дня 16 (OV90) им после трансплантации внутривенно вводили триспецифичные антитела anti-CLDN6/Dual-Fab. Триспецифичные антитела anti-CLDN6/Dual-Fab вводили только однократно. Измеряли длину (L) и ширину (W) тела опухоли, а объем опухоли (TV) рассчитывали по формуле: $TV = (L \times W \times W) / 2$.

Противоопухолевую эффективность наблюдали в группах, в которых мышам вводили триспецифичные антитела anti-CLDN6/Dual-Fab, по сравнению с контрольной группой, в которой мышам вводили носитель (фиг. 12 и 13).

Таблица 10

Подробная информация об исследовательских группах для оценки противоопухолевой эффективности *in vivo*

а. Исследовательские группы с использованием модели мышей NCI-H1435/HuNOG.

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

б. Исследовательские группы с использованием модели мышей OV-90/HuNOG.

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

Пример 14Токсикологическое исследование триспецифичного антитела anti-CLDN6/Dual-Fab

Потенциальную токсичность антитела PPU4135 (триспецифичное антитело anti-CLDN6/Dual-Fab) оценивали в исследовании токсичности с использованием яванских макаков, при сравнении с антителом CS3348 (биспецифичное антитело anti-CLDN6/CD3). Поскольку оба антитела PPU4135 и CS3348 проявляли перекрестную реактивность с их антигенами у яванского макака, яванского макака выбрали в качестве вида животного для оценки в токсикологических исследованиях *in vivo*. Краткое изложение токсикологических исследований после однократной дозы приведено в таблице 11. Поскольку результаты токсикологических исследований оказались более чувствительными у животных-самцов, чем у самок в исследовании токсичности с использованием CS3348 (фиг. 14), для оценки токсичности, опосредованной PPU4135, использовали двух самцов. В этих исследованиях дозы устанавливали на уровне 100 (для CS3348) или 90 (для PPU4135) мкг/кг, что примерно в 2,57 раза превышало эффективную концентрацию, вызывающую 80% максимального ответа.

Таблица 11

Краткое изложение токсикологических исследований

Тип исследования	Вид	Лечение/ Период наблюдения	Животные	Доза (мкг/кг)
Токсичность однократной дозы				
[CS3348] Однократная доза	Яванские макаки (возраст от 3 до 4 лет)	Однократная в/в доза, 8 дней	1 самец и 1 самка	100
[PPU4135] Однократная доза	Яванские макаки (возраст 4 года)	Однократная в/в доза, 29 дней	2 самца	90

в/в = внутривенная

У самцов животных, которым вводили CS3348 или PPU4135, уровни воздействия в плазме были сопоставимы для группы, в которой вводили PPU4135, и группы, в которой вводили CS3348, до дня 8. Увеличение уровней

AST (аспартатаминотрансферазы), ALT (аланинаминотрансферазы) и GLDH (глутаматдегидрогеназы) (печеночные ферменты), ALP (щелочной фосфатазы), TBIL (общего билирубина), GGT (гамма-глутамилтранспептидазы) и TBA (общей желчной кислоты) (параметры гепатобилиарного повреждения) и CRP (С-реактивного белка) (маркер воспаления) регистрировали после однократного введения этих антител (фиг. 14). Хотя различия в уровнях печеночных ферментов у животных-самцов, которым вводили эти антитела, были незначительными (фиг. 14), параметры повреждения гепатобилиарной системы и повышение уровня маркеров воспаления были в значительной степени снижены после введения PPU4135, но не введения CS3348 в течение всего исследования (фиг. 14). Эти результаты свидетельствуют о том, что гепатотоксичность, опосредованная тестируемым препаратом, в основном повреждение гепатобилиарной системы, снижается при использовании триспецифичного антитела anti-CLDN6/Dual-Fab, а не при использовании биспецифичного антитела anti-CLDN6/CD3.

Пример 15

Характеризация триспецифичного антитела anti-CLDN6/Dual-Fab

Аффинность связывания триспецифичного антитела anti-CLDN6/Dual-Fab по сравнению с CLDN6 VLP (вирусоподобная частица) человека и яванского макака («супо») при pH 7,4 определяли при 25°C с использованием прибора Biacore T200 (от фирмы GE Healthcare). Антитело anti-CD81 человека (от фирмы BD Pharmingen) иммобилизовали на всех проточных ячейках сенсорного чипа С1 с использованием набора для конденсации аминов (от фирмы GE Healthcare). CLDN6 VLP человека и яванского макака захватывались поверхностью сенсора антителом anti-CD81 человека. Каждую VLP разбавляли в 5 раз буферным раствором (20 mM буферный раствор NaPhosphate, 150 mM NaCl, 0,1 мг/мл БСА, 0,005 % NaN₃, pH 7,4). Исследуемое антитело растворяли в буферном растворе (20 mM буферный раствор NaPhosphate, 150 mM NaCl, 0,1 мг/мл БСА, 0,005% NaN₃, pH 7,4). Триспецифичное антитело anti-CLDN6/Dual-Fab вводили в концентрациях 50 и 200 нМ, при этом происходила диссоциация. Поверхность сенсора регенерировали после каждого цикла с помощью 0,1% ДСН и 100 mM H₃PO₄. Как показано в таблице 12, аффинность связывания PPU4135 с CLDN6 яванского макака была сопоставима с аффинностью связывания с CLDN6 человека. Аффинность связывания определяли при обработке и сопоставлении

данных с моделью связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation, версия 2.0 (от фирмы GE Healthcare).

Аффинность связывания триспецифичного антитела anti-CLDN6/Dual-Fab по сравнению с рекомбинантным CD3eg человека и суно (гамма- и эпислон-субъединицы CD3) при pH 7,4 определяли при 25°C с использованием прибора Biacore 8K (от фирмы GE Healthcare). Аффинность связывания триспецифического антитела anti-CLDN6/Dual-Fab по сравнению с рекомбинантным CD137 человека и суно при pH 7,4 определяли при 37°C с использованием прибора Biacore 8K (от фирмы GE Healthcare). Антитело anti-Fc человека (от фирмы GE Healthcare) иммобилизовали на всех проточных ячейках сенсорного чипа CM4 с использованием набора для конденсации аминов (от фирмы GE Healthcare). Исследуемое антитело и аналиты готовили в буферном растворе ACES, pH 7,4, содержащем 20 mM ACES (N-(2-ацетамидо)-2-аминоэтансульфоукислота), 150 mM NaCl, 0,05% твин-20, 0,005% NaN₃.

Триспецифичное антитело anti-CLDN6/Dual-Fab захватывалось поверхностью сенсора анти-человеческим Fc. Уровни удерживания антител устанавливали на приблизительно 300 резонансных единиц (RU). Рекомбинантные CD3eg и CD137 добавляли в концентрациях 500 и 2000 нМ с последующей диссоциацией. Поверхность датчика регенерировали после каждого цикла с помощью 3M MgCl₂. Как указано в таблице 12, аффинность связывания PPU4135 с CD3eg и CD137 суно была сопоставима с аффинностью связывания с CD3eg и CD137 человека соответственно. Аффинность связывания определяли при обработке и сопоставлении данных с моделью связывания 1:1 с использованием программного обеспечения Biacore Insight Evaluation (от фирмы GE Healthcare).

Таблица 12

Аффинность связывания PPU4135 по отношению к антигенам человека и суно

Антиген	Аффинность		
	ka (1/M·с)	kd (1/с)	KD (M)
человеческий CLDN6	2,17E+05	7,94E-04	3,65E-09
суно CLDN6	2,18E+05	8,21E-04	3,77E-09
человеческий CD3eg	7,80E+04	2,66E-02	3,41E-07
суно CD3eg	1,01E+05	3,32E-02	3,29E-07
человеческий	1,26E+04	5,91E-04	4,68E-08

Антиген	Аффинность		
	ka (1/M·с)	kd (1/с)	KD (M)
CD137			
супо CD137	8,35E+03	1,46E-03	1,74E-07

(Термин E, используемый для представления значений ka (1/M·с), kd (1/с) и KD в таблице, означает «10 в степени» и, например, 2,17E+05 = 2,17*10⁵).

Пример 16

5 Оценка эффективности лекарственного средства in vivo на модели перитонеальной диссеминации

Чтобы оценить воздействие триспецифичного антитела anti-CLDN6/Dual-Fab CS4135 (то же антитело, что и PPU4135, представленное в таблице 9 в примере 6, описанном выше) в отношении перитонеальных метастазов рака яичников, эффективность препарата оценивали с использованием модели перитонеальной диссеминации у мышей. В качестве клеток-мишеней использовали линию клеток рака яичников человека OV-90 (из коллекции ATCC). Клетки OV-90 трансплантировали внутрибрюшинно мышам NOD/ShiJic-
 10 scid Jcl в дозе 5×10⁶ клеток/500 мкл/животное. Через три дня после трансплантации Т-клетки человека, отделенные от PBMC человека и
 15 экспансивно культивированные с использованием магнитных частиц Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (от фирмы Gibco), вводили внутривенно в дозе 3×10⁷ клеток/400 мкл. Кроме того, внутривенно вводили носитель (буферный раствор PBS, содержащий 0,05% твин-20) или раствор антител CS4135 в дозе 5
 20 мг/кг.

После трансплантации опухоли за мышами наблюдали каждые 2–7 дней и состояние мышей оценивали в соответствии с рекомендациями по гуманным критериям. Выживаемость каждой группы указана на фиг. 15.

В результате в группе, в которой мышам вводили носитель, мышей с
 25 ухудшением состояния наблюдали через 48 дней после трансплантации, и ухудшение состояния наблюдали во всех случаях через 55 дней после трансплантации. С другой стороны, в группе, в которой вводили антитело CS4135, мышей с ухудшением состояния наблюдали через 57 дней после трансплантации, а выживаемость составила 78% через 66 дней после
 30 трансплантации и 22% через 80 дней после трансплантации. Выживаемость 50% регистрировали через 71 день после трансплантации. Этот результат указывает

на терапевтическое действие антитела CS4135 на перитонеальные метастазы рака яичников.

Пример 17

5 Оценка эффективности лекарственного средства для комбинированного применения триспецифичного антитела anti-CLDN6/Dual-Fab CS4135 и химиотерапевтического агента

17.1 Изменение экспрессии CLDN6 в различных раковых клетках при лечении препаратом платины

10 Для анализа влияния лечения на экспрессию CLDN6 линию клеток рака яичников человека (NIH-OVCAR3, из коллекции ATCC), линию клеток рака легких человека (NCI-H1435, ATCC) и линию клеток рака эндометрия человека (SNG-M, из Health Science Research Resources Bank) обрабатывали цисплатином (CDDP, от фирмы Nichiiko) или карбоплатином (CBDCA, от фирмы Sandoz).

15 К каждой клеточной линии добавляли цисплатин в концентрации 0,1 мкг/мл (линия OVCAR3) или 0,6 мкг/мл (линии H1435, SNG-M) или карбоплатин в концентрации 0,5 мкг/мл (линия OVCAR3) или 5 мкг/мл (линии H1435, SNG-M), а затем культивировали в течение пяти дней. После культивирования клетки извлекали и экспрессию CLDN6 анализировали с помощью анализа FACS.

20 При анализе FACS клетки отбирали из культурального флакона и затем проводили реакцию с антителом anti-CLDN6 (AE3-20 mIgG2a, патент Японии № 5848863) или изотипическим антителом (mIgG2a, от фирмы BioLegend) в концентрации 2 мкг/мл при 4°C в течение часа. Затем реакцию с меченым Alexa Flour 488 антимиозиновым IgG (от фирмы ThermoFisher) в концентрации 10 мкг/мл проводили при 4°C в течение одного часа, а уровень экспрессии CLDN6
25 анализировали с использованием проточного цитометра (FACSVerse от фирмы BD Biosciences).

На фиг. 16 представлены результаты анализа экспрессии CLDN6 с помощью анализа FACS в каждом типе клеток, обработанных цисплатином или карбоплатином в течение 5 дней, и в каждом типе клеток, которые не
30 подвергались обработке. Было установлено, что во всех клетках цисплатин или карбоплатин вызывают увеличение экспрессии CLDN6. Таким образом, было подтверждено, что цисплатин и карбоплатин являются агентами, усиливающими экспрессию CLDN6 в раковых клетках.

Затем были проведены измерения на основе системы анализа люциферазы с использованием клеток GloResponse NFAT-luc2 Jurkat (от фирмы Promega, J1601) для анализа способности антитела CS4135 активировать Т-клетки за счет связывания CD3 в зависимости от присутствия или отсутствия воздействия химиотерапевтического агента.

Анализ проводили следующим образом. Сначала, как описано выше, клетки OVCAR3 и H1435, обработанные химиотерапевтическим агентом в течение 5 дней, отделяли из культурального флакона и высевали по 25 мкл/лунка (2×10^4 клеток) в лунки белого плоскодонного 96-луночного планшета (от фирмы Coster, # 3917). Затем добавляли 1×10^5 репортерной клеточной линии Jurkat/NFAT-RE в смеси с антителом CS4135 в концентрации, выбранной из ряда 0,003, 0,03, 0,3, 3 или 30 нМ, по 25 мкл/лунку. После культивирования в течение ночи при 37°C добавляли реагент Bio-Glo (от фирмы Promega, #G7941) в количестве 75 мкл/лунку с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем наблюдаемую люминесценцию активированных клеток Jurkat измеряли с помощью устройства EnSpire (от фирмы PerkinElmer, Япония). Усиление люминесценции в каждой лунке рассчитывали при сравнении лунок с антителом и лунок без антитела.

На фиг. 17 представлены результаты анализа способности CS4135 активировать Т-клетки за счет CD3 для клеток, обработанных цисплатином или карбоплатином в течение 5 дней, или для клеток, которые не подвергались обработке, с использованием анализа люциферазы в клетках линии Jurkat. Было подтверждено, что способность CS4135 к активации Т-клеток увеличивается по сравнению с клетками, обработанными цисплатином или карбоплатином в течение 5 дней, что свидетельствует о том, что химиотерапевтический агент может усиливать цитотоксичность CS4135.

17.2. Индукция экспрессии CLDN6 в трансплантате опухоли *in vivo* после введения карбоплатина

Клетки SNG-M (1×10^7 клеток) трансплантировали подкожно мышам линии NOD/scid (от фирмы CLEA, Япония). После приживления опухоли носитель (физиологический раствор) или карбоплатин в дозе 40 мг/кг или 80 мг/кг вводили внутривенно в день трансплантации (день 0) и через 3 дня после трансплантации (день 3), а из опухоли отбирали образцы в день 6 после трансплантации (день 6).

РНК из опухоли очищали (с помощью набора RNeasy Mini Kit, от фирмы QIAGEN), а затем проводили синтез кДНК (с применением смеси Superscript IV VILO Master Mix, от фирмы ThermoFisher). С использованием кДНК в качестве матриц, проводили ПЦР в реальном времени с использованием специфичного для CLDN6 праймера (Power SYBR™ Green Master Mix, от фирмы ThermoFisher) для анализа экспрессии CLDN6 (с использованием системы ПЦР в реальном времени QuantStudio 12K Flex, от фирмы ThermoFisher).

Последовательности праймеров для человеческого CLDN6 и праймеров для человеческой GAPDH, используемые в качестве внутреннего контроля, представлены ниже:

hCLDN6-1: GGG TGG ACG TCT TAT CAG GA (последовательность SEQ ID NO: 206)

hCLDN6-2: GAG CTC TCT TCA CCC CT (последовательность SEQ ID NO: 207)

hGAPDH-F: GAG TCC ACT GGC GTC TTC AC (последовательность SEQ ID NO: 208)

hGAPDH-R: ATC TTG AGG CTG TTG TCA TAC TT (последовательность SEQ ID NO: 209).

На фиг. 18 представлены результаты анализа экспрессии CLDN6 в опухоли с помощью количественной ПЦР для образца опухоли, взятого после двукратного введения носителя или карбоплатина в дозе 40 мг/кг или 80 мг/кг мышам с привитой опухолью SNG-M. Было подтверждено, что экспрессия CLDN6 в опухоли увеличивается в группах, в которых мышам вводили карбоплатин, по сравнению с группой, в которой вводили носитель.

17.3 Оценка противоопухолевой активности антитела CS4135 с помощью модели трансплантации ксенотрансплантата с использованием мышей huNOG

17.3.1 Получение клеточных линий и модели трансплантации ксенотрансплантата, а также способ оценки противоопухолевой активности

В данном исследовании использовали мышей NOG (huNOG) (описанных в вышеупомянутом примере 13), которым трансплантировали клеточную линию рака матки человека SNG-M и CD34-положительные клетки человека. Линию клеток SNG-M трансплантировали подкожно в правый бок мышей и через 13 дней после трансплантации мышей распределяли в группы. Индивидуумов, у которых объем опухоли достигал от 130 до 244 мм³, распределяли в группы.

Носитель 1 и CS4135 вводили в хвостовую вену мыши через 13 дней после трансплантации. В качестве носителя 1 использовали буферный раствор PBS, содержащий 0,05% твин-20. Носитель 2 и карбоплатин (от фирмы Bristol Myers Squibb Company) вводили мышам внутрибрюшинно через 13, 16 и 20 дней после трансплантации. В качестве носителя 2 использовали физиологический раствор.

Таблица 13

Группа	Число	Фармацевтический агент	Доза	День введения	Способ введения
1	8	Носитель 1 (0,05% твин-20 в PBS)	-	13	В хвостовую вену
		Носитель 2 (физиологический раствор)	-	13, 16, 20	Внутрибрюшинно
2	8	CS4135	0,5 мг/кг	13	В хвостовую вену
		Носитель 2	-	13, 16, 20	Внутрибрюшинно
3	8	Носитель 1	-	13	В хвостовую вену
		Карбоплатин	40 мг/кг	13, 16, 20	Внутрибрюшинно
4	8	CS4135	0,5 мг/кг	13	В хвостовую вену
		Карбоплатин	40 мг/кг	13, 16, 20	Внутрибрюшинно

Объем опухоли (TV) измеряли через 13, 16, 20, 23, 26 и 30 дней после трансплантации и регистрировали средний объем опухоли для каждой группы.

10 Объем опухоли рассчитывали по следующему уравнению:

Объем опухоли (мм³) = большая ось (мм) × малая ось (мм) × малая ось (мм)/2.

Блокировку роста опухоли (TGI) рассчитывали по следующему уравнению:

15 изменение TV (мм³) = объем опухоли через 30 дней после трансплантации – объем опухоли при распределении в группы.

TGI (%) = (1 – (среднее изменение TV в каждой группе / среднее изменение TV в контрольной группе, в которой вводили носитель)) × 100.

20 В результате через 30 дней после трансплантации в группе после комбинированного введения, в которой вводили антитело CS4135 и карбоплатин, TGI составляла 65%, в то время как в группе после введения

одного агента, в которой вводили антитело CS4135, и в группе после введения одного агента, в которой вводили карбоплатин, TGI составляла 35% и 44% соответственно. Таким образом, было установлено, что после комбинированного введения антитела CS4135 и карбоплатина наблюдалось более сильное
 5 противоопухолевое действие по сравнению с введением одного агента антитела CS4135 и с введением одного агента карбоплатина (фиг. 19, таблица 14).

Таблица 14

Блокировка роста опухоли через 30 дней после трансплантации
 (блокировка роста опухоли: TGI (%))

	Носитель - контроль	CS4135	Карбоплатин	CS4135 + карбоплатин
TGI	-	35	44	65

10

17.3.2 Получение клеточных линий и модели трансплантации

ксенотрансплантата, а также способ оценки противоопухолевой активности

В данном исследовании использовали мышей NOG (huNOG) (описанных в вышеупомянутом примере 13), которым трансплантировали клеточную линию
 15 рака яичника OVCAR3 и CD34-положительные клетки человека. Линию клеток OVCAR3 трансплантировали подкожно в правый бок мышей, и мышей распределяли в группы через 38 дней после трансплантации. Индивидуумов, у которых объем опухоли достигал от 119 до 210 мм³, распределяли в группы. Носитель 1 и CS4135 вводили в хвостовую вену мыши через 38 и 45 дней после
 20 трансплантации. В качестве носителя 1 использовали буферный раствор PBS, содержащий 0,05% твин-20. Растворитель 2 и карбоплатин (от фирмы Bristol Myers Squibb Company) вводили мышам внутривентриально через 38 и 45 дней после трансплантации. В качестве носителя 2 использовали физиологический раствор.

25

Таблица 15

Группа	Число	Фармацевтический агент	Доза	День введения	Способ введения
1	5	Носитель 1 (0,05% твин-20 в PBS)	-	38, 45	В хвостовую вену
		Носитель 2 (физиологический раствор)	-	38, 45	Внутрибрюшинно
2	5	CS4135	0,1 мг/кг	38, 45	В хвостовую вену

Группа	Число	Фармацевтический агент	Доза	День введения	Способ введения
		Носитель 2	-	38, 45	Внутрибрюшинно
3	5	Носитель 1	-	38, 45	В хвостовую вену
		Карбоплатин	60 мг/кг	38, 45	Внутрибрюшинно
4	5	CS4135	0,1 мг/кг	38, 45	В хвостовую вену
		Карбоплатин	60 мг/кг	38, 45	Внутрибрюшинно
5	5	CS4135	0,1 мг/кг	48, 55	В хвостовую вену
		Карбоплатин	60 мг/кг	38, 45	Внутрибрюшинно

Объем опухоли измеряли через 38, 42, 45, 48, 52 и 56 дней после трансплантации и регистрировали средний объем опухоли для каждой группы. Объем опухоли рассчитывали по следующему уравнению:

$$5 \quad \text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \text{большая ось (мм)} \times \text{малая ось (мм)} \times \text{малая ось (мм)} / 2.$$

Блокировку роста опухоли (TGI) рассчитывали по следующему уравнению: изменение TV (мм³) = объем опухоли через 56 дней после трансплантации – объем опухоли при распределении в группы.

$$10 \quad \text{TGI (\%)} = (1 - (\text{среднее изменение TV в каждой группе} / \text{среднее изменение TV в контрольной группе, в которой мышам вводили носитель})) \times 100.$$

В результате через 56 дней после трансплантации в группе после комбинированного (одновременного) введения, в которой вводили антитело CS4135 и карбоплатин, регистрировали уровень TGI 180%, в то время как в 15 группе после введения одного агента, в которой вводили CS4135, и в группе после введения одного агента, в которой вводили карбоплатин, регистрировали уровень TGI 18% и 9% соответственно. Таким образом, было установлено, что комбинированное введение антитела CS4135 и карбоплатина характеризуется 20 более сильными синергическими противоопухолевыми эффектами по сравнению с введением одного агента CS4135 и введением одного агента карбоплатина (фиг. 20, таблица 16).

Кроме того, когда CS4135 последовательно вводили после введения карбоплатина, уровень TGI через 56 дней после трансплантации составлял 180%, как и в группе, в которой одновременное вводили карбоплатин и CS4135. Таким 25 образом, было установлено, что CS4135 проявляет равную эффективность не

только при одновременном введении с карбоплатином, но и при последовательном введении после введения карбоплатина (фиг. 21, таблица 16).

Таблица 16

Уровень блокировки роста опухоли через 56 дней после трансплантации (блокировка роста опухоли: TGI (%))

	Носитель - контроль	CS4135	Карбоплатин	CS4135 + карбоплатин	Карбоплатин→ CS4135
TGI	-	18	-9	180	180

17.4 Оценка противоопухолевой активности антитела CS4135 с помощью модели трансплантации ксенотрансплантата с использованием мышей линии huNOG

17.4.1 Получение клеточных линий и модели трансплантации ксенотрансплантата, а также способ оценки противоопухолевой активности

В данном исследовании использовали мышей линии NOG(huNOG) (описанных в вышеупомянутом примере 13), которым трансплантировали клеточную линию рака яичника NIH:OVCAR-3 (OVCAR3, из коллекции ATCC) и CD34-положительные клетки человека. Линию клеток OVCAR3 трансплантировали подкожно в правый бок мышей, и мышей распределяли в группы через 39 дней после трансплантации. Индивидуумов, у которых объем опухоли достигал 160–263 мм³, распределяли в группы. Носитель 1 и CS4135 вводили в хвостовую вену мыши через 39 и 46 дней после трансплантации. В качестве носителя 1 использовали буферный раствор PBS, содержащий 0,05% твин-20. Носитель 2 и гидрохлорид иринотекана (от фирмы Sawai Pharmaceutical Co., Ltd.) вводили в хвостовую вену мыши через 39 и 46 дней после трансплантации. В качестве носителя 2 использовали физиологический раствор.

Таблица 17

Группа	Число	Лекарственный агент	Доза	День введения	Способ введения
1	5	Носитель 1 (0,05% твин-20 в PBS)	-	39, 46	В хвостовую вену
		Носитель 2 (физиологический раствор)	-	39, 46	В хвостовую вену
2	5	CS4135	0,1 мг/кг	39, 46	В хвостовую вену

Группа	Число	Лекарственный агент	Доза	День введения	Способ введения
		Носитель 2	-	39, 46	В хвостовую вену
3	5	Носитель 1	-	39, 46	В хвостовую вену
		Гидрохлорид иринотекана	25 мг/кг	39, 46	В хвостовую вену
4	5	CS4135	0,1 мг/кг	39, 46	В хвостовую вену
		Гидрохлорид иринотекана	25 мг/кг	39, 46	В хвостовую вену

Объем опухоли измеряли через 39, 42, 46, 49, 53, 57 и 60 дней после трансплантации, средний объем опухоли указан для каждой группы. Объем опухоли рассчитывали по следующему уравнению:

$$5 \quad \text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \text{большая ось (мм)} \times \text{малая ось (мм)} \times \text{малая ось (мм)} / 2.$$

Блокировку роста опухоли (TGI) рассчитывали по следующему уравнению:

изменение TV (мм³) = объем опухоли через 60 дней после трансплантации – объем опухоли при разделении на группы,

$$10 \quad \text{TGI (\%)} = (1 - (\text{среднее изменение TV в каждой группе} / \text{среднее изменение TV в контрольной группе с носителем})) \times 100.$$

В результате через 60 дней после трансплантации в группе после комбинированного введения, в которой вводили антитело CS4135 и гидрохлорид иринотекана, уровень TGI составлял 106%, в то время как в группе после введения одного препарата, в которой вводили антитело CS4135, и в группе после введения одного препарата, в которой вводили гидрохлорид иринотекана, уровни TGI составляли -2% и 65% соответственно. Кроме того, статистически значимую разницу в объемах опухолей наблюдали через 60 дней после трансплантации в группе после комбинированного введения, в которой вводили антитело CS4135 и гидрохлорид иринотекана, и в группе после введения одного агента, в которой вводили гидрохлорид иринотекана. Таким образом, было установлено, что комбинированное введение антитела CS4135 и гидрохлорида

иринотекана оказывает более сильное и синергическое противоопухолевое действие по сравнению с введением одного агента - антитела CS4135 и с введением одного агента - гидрохлорида иринотекана (фиг. 22, таблица 18).

Таблица 18

5 Уровень блокировки роста опухоли через 60 дней после трансплантации (блокировка роста опухоли: TGI (%))

	Носитель - контроль	CS4135	Гидрохлорид иринотекана	CS4135 + гидрохлорид иринотекана
TGI	-	- 2	65	106

Пример 18

10 Исследование для оценки эффективности лекарственного средства при комбинированном применении триспецифичного антитела CS4135 anti-CLDN6/Dual-Fab и ингибитора иммунных контрольных точек

18.1.1. Получение клеточных линий и сингенной модели трансплантации, а также способ оценки противоопухолевой активности

15 В данном исследовании использовали клеточную линию рака легких LLC1, вынужденно экспрессирующую клаудин 6 (CLDN6) (CLDN6-LLC1), и hCD137 KI/hCD3Tg мышей (описанную в вышеупомянутом примере 7). Клеточную линию CLDN6-LLC1 трансплантировали подкожно в правый бок мышей и мышей распределяли в группы через 7 дней после трансплантации. Индивидуумов, у которых объем опухоли достигал 262–353 мм³, распределяли в 20 группы. Носитель и CS4135 вводили в хвостовую вену мыши через 8 дней после трансплантации. В качестве носителя использовали буферный раствор PBS, содержащий 0,05% твин-20.

Таблица 19

Группа	Число n	Лекарственный агент	Доза	День введения	Способ введения
1	5	Носитель (0,05% твин-20 в PBS)	-	8	В хвостовую вену
2	5	CS4135	0,25 мг/кг	8	В хвостовую вену
3	5	Носитель	-	8	В хвостовую вену
4	5	CS4135	0,25 мг/кг	8	В хвостовую вену

Объем опухоли измеряли через 7, 10 и 14 дней после трансплантации и регистрировали средний объем опухоли для каждой группы. Объем опухоли рассчитывали по следующему уравнению:

$$5 \quad \text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \text{большая ось (мм)} \times \text{малая ось (мм)} \times \text{малая ось (мм)}/2.$$

Блокировку роста опухоли (TGI) рассчитывали по следующему уравнению: изменение TV (мм³) = объем опухоли через 14 дней после трансплантации – объем опухоли при распределении в группы.

$$10 \quad \text{TGI (\%)} = (1 - (\text{среднее изменение TV в каждой группе} / \text{среднее изменение TV в контрольной группе с носителем})) \times 100.$$

15 Результаты представлены на фиг. 23. Через 14 дней после трансплантации в группе, которой вводили CS4135, уровень TGI составил 71%. Опухоль удаляли через 10 и 14 дней после трансплантации (через 2 и 6 дней после введения соответственно (день 2 и день 6)), и число CD8-положительных Т-клеток в опухоловой ткани определяли следующим образом.

Таблица 20

Уровень блокировки роста опухоли через 14 дней после трансплантации (блокировка роста опухоли: TGI (%))

	Носитель - контроль	CS4135
TGI	-	71

20 18.1.2. Резекция опухолевых тканей мышей с трансплантированной клеточной линией CLDN6-LLC1 и получение фракции лимфоцитов

25 Удаленную опухолевую ткань взвешивали, затем выделяли фракцию лимфоцитов. Использовали фракцию лимфоцитов, полученную при разрушении ткани с использованием набора для диссоциации опухолей у мышей (от фирмы MilteNY Biotec), а затем с помощью клеточного сита. Полученную фракцию лимфоцитов опухолевого происхождения исследовали методом проточной цитометрии (FCM).

18.1.3. Расчет числа CD8-положительных Т-клеток на массу опухоли по данным анализа методом проточной цитометрии (FCM)

30 Метод FCM использовали для анализа числа Т-клеток опухолевого происхождения. Число CD8-положительных Т-клеток на массу опухоли

рассчитывали с использованием значения массы опухоли и числа CD8-положительных Т-клеток согласно данным FCM. В ходе анализа FCM использовали антитело anti-CD45 (от фирмы BD Biosciences), антитело anti-CD3 (от фирмы BioLegend), антитело anti-CD8 (от фирмы BioLegend) и антитело anti-CD4 (от фирмы BioLegend). Для измерений использовали цитофлуориметр BD LSRFortessa X-20 (от фирмы BDBiosciences).

В результате через 14 дней после трансплантации опухоли (6 дней после введения (день 6)) в группе, в которой мышам вводили CS4135, наблюдали значительное увеличение числа CD8-положительных Т-клеток на массу опухоли (фиг. 24).

18.2.1. Получение клеточных линий и модели сингенной трансплантации, а также метод оценки противоопухолевой активности

В данном исследовании использовали линию клеток рака легких LLC1, вынужденно экспрессирующую клаудин 6 (CLDN6) (CLDN6-LLC1), и hCD137 KI/hCD3Tg мышей (описанную в вышеупомянутом примере 7). Линию клеток CLDN6-LLC1 трансплантировали подкожно в правый бок мышей, и мышей распределяли в группы через 6 дней после трансплантации. Индивидуумов, у которых объем опухоли достигал 104–140 мм³, распределяли в группы. Носитель и антитело CS4135 вводили в хвостовую вену мыши через 6 дней после трансплантации. В качестве носителя использовали буферный раствор PBS, содержащий 0,05% твин-20. Носитель и антитело против мышинового PD-L1 (клетка BioX) вводили мышам внутрибрюшинно через 6, 8, 10, 12, 14 и 17 дней после трансплантации.

Таблица 21

Группа	Число	Лекарственный агент	Доза	День введения	Способ введения
1	5	Носитель (0,05% твин-20 в PBS)	-	6	В хвостовую вену
		Носитель	-	6, 8, 10, 12, 14, 17	Внутрибрюшинно
2	5	CS4135	0,2 мг/кг	6	В хвостовую вену
		Носитель	-	6, 8, 10, 12, 14, 17	Внутрибрюшинно
3	5	Носитель	-	6	В хвостовую вену
		Антитело против мышинового PD-L1	10 мг/кг	6, 8, 10, 12, 14, 17	Внутрибрюшинно

Группа	Число	Лекарственный агент	Доза	День введения	Способ введения
4	5	CS4135	0,2 мг/кг	6	В хвостовую вену
		Антитело против мышинового PD-L1	10 мг/кг	6, 8, 10, 12, 14, 17	Внутрибрюшинно

Объем опухоли измеряли через 6, 10, 12, 14 и 17 дней после трансплантации и регистрировали средний объем опухоли для каждой группы. Объем опухоли рассчитывали по следующему уравнению:

$$5 \quad \text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \text{большая ось (мм)} \times \text{малая ось (мм)} \times \text{малая ось (мм)} / 2.$$

Блокировку роста опухоли (TGI) рассчитывали по следующему уравнению: изменение TV (мм³) = объем опухоли через 17 дней после трансплантации – объем опухоли при распределении в группы.

$$10 \quad \text{TGI (\%)} = (1 - (\text{среднее изменение TV в каждой группе} / \text{среднее изменение TV в контрольной группе с носителем})) \times 100.$$

В результате через 17 дней после трансплантации в группе после комбинированного введения, в которой мышам вводили антитело CS4135 и антитело против мышинового PD-L1, уровень TGI составлял 108%, тогда как в 15 группе после введения одного агента, в которой мышам вводили антитело CS4135 и в группе после введения одного агента, в которой мышам вводили антитело против мышинового PD-L1, уровень TGI составлял 71% и -1% соответственно. Таким образом, было установлено, что комбинированное 20 введение антитела CS4135 и антитела против мышинового PD-L1 оказывает более сильный синергический противоопухолевый эффект по сравнению с введением одного агента - антитела CS4135 и одного агента - антитела против мышинового PD-L1 (фиг. 25, таблица 22).

Таблица 22

Уровень блокировки роста опухоли через 17 дней после трансплантации (блокировка роста опухоли: TGI (%))

	Носитель - контроль	CS4135	Антитело против мышинового PD-L1	CS4135 + антитело против мышинового PD-L1
Блокировка роста опухоли (TGI)	-	71	-1	108

5 Пример 19

Исследование для оценки эффективности лекарственного средства при комбинированном применении триспецифичного антитела CS4135 anti-CLDN6/Dual-Fab и ингибитора PARP

10 19.1. Исследование для оценки индукции экспрессии CLDN6 при введении ингибитора PARP

Оценивали индукцию экспрессии CLDN6 ингибитором PARP (олапарибом). Использовали линию клеток UWB1.289 рака яичников, дефицитную по BRCA1 (из коллекции ATCC) или линию клеток рака яичников BRAC1 дикого типа OV-90 (из коллекции ATCC), которые экспрессируют человеческий CLDN6.

15 Клетки-мишени (3×10^5 клеток) высевали в лунки 6-луночного планшета из расчета 3 мл/лунку. После культивирования в течение ночи добавляли олапариб в конечной концентрации 0,03, 0,1, 0,3, 1 или 3 мкМ. ДМСО добавляли в контрольную лунку. После инкубирования планшета в течение 3 дней клетки извлекали и определяли уровень экспрессии CLDN6 на поверхности клеток с
20 помощью анализа FACS с использованием антитела anti-CLDN6. Уровень флуоресценции в клетках-мишенях, извлеченных из лунок, в которые добавляли олапариб в различных концентрациях, представлен на фиг. 27, где уровень флуоресценции в клетках-мишенях, извлеченных из контрольной лунки, определен как 1.

25 В линии клеток UWB1.289 рака яичников, дефицитных по BRCA1 наблюдали зависимое от концентрации олапариба усиление индукции экспрессии CLDN6. С другой стороны, в клеточной линии OV-90 рака яичников

BRAC1 дикого типа усиление индукции экспрессии CLDN6 не наблюдали при любой концентрации олапариба.

19.2. Цитотоксическая активность триспецифичного антитела CS4135 anti-CLDN6/Dual-Fab на клетках, в которые вводили ингибитор PARP

5 Оценивали влияние усиленной индукции экспрессии CLDN6 в BRCA1-дефицитной клеточной линии рака яичников UWB1.289, вызванной ингибитором PARP (олапарибом), на цитотоксическую активность триспецифичного антитела CS4135 anti-CLDN6/Dual-Fab.

10 В качестве клеток-мишеней использовали линию UWB1.289 клеток рака яичников, дефицитную по BRCA1 (из коллекции ATCC) или линию клеток OV-90 рака яичников дикого типа BRAC1 (из коллекции ATCC), которые экспрессируют CLDN6 человека.

15 Каждую линию клеток-мишеней (3×10^5 клеток) высевали по 5 мл в культуральный флакон площадью 25 см². Для каждой линии клеток-мишеней готовили два флакона. После культивирования в течение ночи в один из двух флаконов добавляли олапариб в конечной концентрации 3 мкМ. ДМСО добавляли в другой флакон. После инкубации флаконов в течение трех дней клетки-мишени извлекали и цитотоксическую активность антитела CS4135 оценивали методом анализа высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH) с
20 использованием РВМС человека в качестве эффекторных клеток. Результаты представлены на фиг. 28.

25 В линии UWB1.289 клеток рака яичников, дефицитных по BRCA1, наблюдали усиление цитотоксичности PPU4135 при добавлении олапариба. С другой стороны, в линии OV-90 клеток рака яичников дикого типа BRAC1 добавление олапариба не влияло на цитотоксическую активность.

Пример 20

Исследование механизма действия антитела CS4135 с использованием оценки блокировки роста клеток в реальном времени (с помощью анализатора xCELLigence)

30 Механизм зависимой от Т-клеток блокировки роста, опосредованной триспецифичными антителами anti-CLDN6/Dual-Fab, оценивали методом анализа пролиферации клеток с использованием прибора xCELLigence RTCA MP (от фирмы ACEA Biosciences).

В качестве клеток-мишеней использовали клеточную линию рака толстой кишки мыши MC38/CLDN6, экспрессирующую человеческий CLDN6. Селезенки собирали в асептических условиях у трансгенных мышей hCD3 и нокинных мышей hCD3/hCD137. Селезенку измельчали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, пропускали через клеточное сито на 70 мкм, а затем центрифугировали (при 1200 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре) для выделения клеток селезенки. Выделенные клетки селезенки гемолизировали, затем выделяли индивидуальные Т-клетки с использованием гранул CD3 MicroBeads (от фирмы MilteNY Biotec) и использовали их в качестве эффекторных клеток.

Фон измеряли при добавлении культуральной среды в лунки планшета E-Plate 96 (от фирмы Roche Diagnostics) в концентрации 50 мкл/лунка, а затем высевали 5×10^3 клеток-мишеней в концентрации 50 мкл/лунку. После культивирования в течение ночи добавляли 1 нМ (конечная концентрация) CS4135 в смеси с биспецифическим антителом KLH/CD137 в концентрации, выбранной из значений 100 нМ или 500 нМ (конечная концентрация) в количестве 25 мкл/лунку соответственно. Затем добавляли $2,5 \times 10^4$ эффекторных клеток по 50 мкл/лунку. Рост клеток контролировали каждые 10 мин с помощью анализатора xCELLigence в течение 48 ч во время инкубации планшетов. Уровень блокировки роста клеток (CGI:%) определяли по значению клеточного индекса по следующей формуле:

$$-GI (\%) = 100 - (CI_{Ab} \times 100 / CI_{NoAb}),$$

где « CI_{Ab} » представляет собой значение клеточного индекса для лунок с антителом в определенный момент эксперимента, а « CI_{NoAb} » представляет собой среднее значение клеточного индекса для лунок без антитела в тот же момент эксперимента. Каждое использованное значение клеточного индекса представляло собой значение, скорректированное при установлении значения клеточного индекса в каждой лунке перед добавлением антитела и эффекторных клеток, равного 1.

При использовании Т-клеток, полученных от нокинных мышей hCD3/hCD137, было установлено, что уровень блокировки роста клеток, проявляемой антителом CS4135, если не добавляли биспецифическое антитело KLH/CD137, повышался в значительной степени по сравнению с уровнем при использовании Т-клеток, полученных от трансгенных мышей hCD3, однако

уровень блокировки роста клеток снижался в зависимости от дозы биспецифичного антитела KLH/CD137, и при добавлении 500 нМ (конечная концентрация) биспецифичного антитела KLH/CD137 уровень блокировки роста клеток снижался до того же уровня, что и при использовании Т-клеток, полученных из трансгенных мышей hCD3. Этот результат свидетельствует о том, что сигнал CD137, продуцируемый антителом CS4135, усиливает цитотоксическую активность. Результаты представлены на фиг. 28.

Пример 21

21.1. Индукция экспрессии CLDN6 химиотерапевтическими агентами

К линии клеток рака яичников человека (NIH:OVCAR-3, из коллекции ATCC) добавляли различные химиотерапевтические агенты для анализа изменения экспрессии CLDN6. Что касается клеток NIH:OVCAR-3, высеванных в лунки культуральных планшетов, то очищали РНК (с помощью набора RNeasy Mini Kit от фирмы QIAGEN) из клеток, к которым не добавляли фармацевтический агент (необработанные клетки), или из клеток, собранных через 6 дней после добавления карбоплатина (0,5 мкг /мл), цисплатина (0,1 мкг/мл), иринотекана (0,25 мкг/мл) или гемцитабина (2 нг/мл), а затем проводили синтез кДНК (с использованием смеси Superscript IV VILO Master Mix от фирмы ThermoFisher). С использованием кДНК в качестве матриц, проводили ПЦР в реальном времени с использованием CLDN6-специфических праймеров (из набора Power SYBRTMGreen Master Mix от фирмы ThermoFisher) для анализа экспрессии CLDN6 (с помощью системы QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System от фирмы ThermoFisher).

Последовательности праймеров для CLDN6 человека и праймеров для человеческой GAPDH, использованные в качестве внутреннего контроля, представлены ниже:

hCLDN6-1: GGG TGG ACG TCT TAT CAG GA (последовательность SEQ ID NO: 206),

hCLDN6-2: GAG CTC TCT TCA CCC CT (последовательность SEQ ID NO: 207),

hGAPDH-F: GAG TCC ACT GGC GTC TTC AC (последовательность SEQ ID NO: 208),

hGAPDH-R: ATC TTG AGG CTG TTG TCA TAC TT (последовательность SEQ ID NO: 209).

На фиг. 29 представлены результаты анализа экспрессии CLDN6 с помощью количественной ПЦР (qPCR) для клеток NIH:OVCAR-3, к которым не добавляли фармацевтический агент (необработанные) или к которым добавляли карбоплатин, цисплатин, иринотекан или гемцитабин. Увеличение экспрессии CLDN6 наблюдали в клетках, обработанных карбоплатином, цисплатином, иринотеканом и гемцитабином, по сравнению с клетками без добавления фармацевтического агента.

21.2. Индукция экспрессии TGF- β 1 химиотерапевтическими агентами

Затем кДНК, полученные из клеточной линии рака яичников человека (NIH:OVCAR-3, из коллекции ATCC), обработанной карбоплатином, цисплатином, иринотеканом или гемцитабином, которые использовали, как описано в примере 21.1, применяли для проведения ПЦР в реальном времени с использованием TGF- β 1-специфических праймеров (из смеси Power SYBRTMGreen Master Mix от фирмы ThermoFisher) и анализировали экспрессию TGF- β 1 (с помощью амплификатора QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System от фирмы ThermoFisher).

Ниже представлены последовательности праймеров для TGF- β 1 человека:

hTGF- β 1-F: AGTGGTTGAGCCGTGGAG (последовательность SEQ ID NO: 214),

hTGF- β 1-R: CGGTAGTGAACCCGTTGAT последовательность (SEQ ID NO: 215).

Те же праймеры, что и в вышеупомянутом примере 21.1, использовали в качестве праймеров для человеческой GAPDH, применяемой в качестве внутреннего контроля.

На фиг. 30 указаны результаты анализа экспрессии TGF- β 1 с помощью количественной ПЦР в клетках NIH:OVCAR-3, к которым не добавляли фармацевтический агент (необработанные) или к которым добавляли карбоплатин, цисплатин, иринотекан или гемцитабин. Увеличение экспрессии TGF- β 1 наблюдали в клетках, обработанных карбоплатином, цисплатином, иринотеканом и гемцитабином, по сравнению с клетками без добавления фармацевтического агента.

21.3. Индукция экспрессии CLDN6 с помощью TGF- β

В примере 21.1 было подтверждено, что обработка клеток химиотерапевтическим агентом увеличивает экспрессию CLDN6.

Кроме того, в примере 21.2 подтверждено, что наблюдается индукция экспрессии TGF- β 1 в раковых клетках после обработки химиотерапевтическими агентами. Известно также, что противораковые средства, отличающиеся от химиотерапевтических агентов, воздействие которых подтверждено, как описано в примере 21.2, индуцируют экспрессию TGF- β 1. Например, сообщалось, что химиотерапевтические агенты, такие как доксорубицин и паклитаксел, а также облучение индуцируют экспрессию TGF- β 1 в раковых клетках (см. статьи Barcellos-Hoff и др., *J. Clin. Invest.*, 93(2):892-9 (февраль 1994) и Bholra и др., *J. Clin. Invest.*, 123(3):1348-58 (март 2013)).

Таким образом, предполагалось, что TGF- β 1, индуцированный в результате обработки противораковым агентом, может влиять на экспрессию CLDN6. Соответственно, проводили анализы для определения возможности индукции фактором TGF- β 1 экспрессии CLDN6 в линии клеток рака яичников человека (NIH:OVCAR-3, из коллекции ATCC). Что касается клеток NIH:OVCAR-3, высеянных в лунки культуральных планшетов, то РНК очищали (с помощью набора RNeasy Mini Kit от фирмы QIAGEN) из необработанных клеток или из клеток, собранных через 5 дней после добавления TGF- β 1 (от фирмы R&D Systems, 10 нг/мл), а затем проводили синтез кДНК (с помощью смеси Superscript IV VILO Master Mix от фирмы ThermoFisher). С использованием кДНК в качестве матриц, проводили ПЦР в реальном времени с использованием CLDN6-специфичных праймеров (из смеси Power SYBRTMGreen Master Mix от фирмы ThermoFisher) для анализа экспрессии CLDN6 (с помощью амплификатора QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System от фирмы ThermoFisher).

Те же праймеры, описанные в вышеупомянутом примере 21.1, применяли в качестве праймеров для CLDN6 человека и праймеров для человеческой GAPDH, используемой в качестве внутреннего контроля.

На фиг. 31 представлены результаты анализа экспрессии CLDN6 с помощью количественной ПЦР в клетках NIH:OVCAR-3, которые не обрабатывали или к которым добавляли TGF- β 1. Увеличение экспрессии CLDN6 наблюдали в клетках, в которые добавляли TGF- β 1, по сравнению с необработанными клетками.

Затем проводили анализ для определения возможности индуцирования фактором TGF- β 1 экспрессии CLDN6 в других клеточных линиях рака яичников.

Помимо клеток NIH:OVCA9-3, клетки COV413A (из коллекции ECACC), COV413B (ECACC) и COV362 (ECACC) высевали в лунки культуральных планшетов и добавляли к ним TGF- β 1 в концентрации 10 нг/мл. Через четыре дня клетки извлекали и экспрессию CLDN6 анализировали с помощью анализа FACS.

В ходе анализа FACS клетки отбирали из культурального флакона для получения клеточной суспензии, эти клетки окрашивали с помощью антитела anti-CLDN6 (CS4135 mIgG1: аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи представлены в последовательностях SEQ ID NO: 210 и 211 соответственно, а нуклеотидные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи представлены в последовательностях SEQ ID NO: 212 и 213 соответственно), с включенной меткой Alexa Fluor 488 (набор для включения метки Alexa Fluor 488 в антитела от фирмы ThermoFisher Scientific), и уровень экспрессии CLDN6 анализировали с использованием проточного цитометра (FACSlyric от фирмы BD Biosciences). Антитело CS4135 mIgG1 представляет собой химерное антитело, полученное при связывании Fc-области мышиного IgG1 с Fab антитела CS4135.

На фиг. 32 показаны результаты анализа экспрессии CLDN6 методом FACS в каждом типе клеток, стимулированных TGF- β 1, и в каждом типе необработанных клеток. Во всех клетках наблюдали, что стимуляция фактором TGF- β 1 увеличивала экспрессию CLDN6. То есть было подтверждено, что TGF- β 1 является агентом, индуцирующим экспрессию CLDN6 в различных раковых клетках. Поэтому, не рассматривая какую-либо конкретную теорию, можно предположить, что агент, индуцирующий экспрессию TGF- β 1, усиливает экспрессию CLDN6, а совместное использование агента, индуцирующего экспрессию TGF- β 1, и антитела, связывающего CLDN6, обеспечивает аддитивные или синергические противораковые эффекты.

Пример 1 для сравнения

Очистка триспецифичных антител anti-CLDN6/Dual-Fab.

Вариабельные области тяжелой и легкой цепи клонировали в экспрессионных векторах, содержащих консервативные области тяжелой цепи и легкой цепи с соответствующими мутациями для гетеродимеризации.

Для препаративного получения триспецифичных антител anti-CLDN6/Dual-Fab для исследований *in vitro* и *in vivo* антитела временно экспрессировали с

использованием клеток Expi293F (от фирмы Life Technologies) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Культуральную среду, содержащую рекомбинантные антитела, сначала очищали на колонке MabSelect Sure (от фирмы GE Healthcare) и элюировали 50 мМ уксусной кислотой. Элюированные антитела нейтрализовали буферным раствором 1,5 М Трис-НСl/1 М аргинин-НСl. Элюаты ProA (полученные после обработки смолой с белком А) затем наносили на катионообменную колонку HiTrap SP-HP (от фирмы GE Healthcare) в 20 мМ фосфатно-натриевом буферном растворе, рН 6, и элюировали буферным раствором, содержащим 20 мМ фосфата натрия, 1М NaCl, рН 6. Фракции, содержащие биспецифическое антитело, объединяли и концентрировали. Для удаления высокомолекулярных и/или низкомолекулярных компонентов проводили эксклюзионную хроматографию в буферном растворе Р1 (20 мМ гистидин, 150 мМ аргинин, 162,1 мМ аспарагин, рН 6,0) с использованием колонки Superdex 200 (от фирмы GE Healthcare). Очищенные биспецифические антитела концентрировали и хранили в морозильной камере при -80°С.

Пример 2 для сравнения

Получение клеток, экспрессирующих клаудин

Клетки Ва/Ф3, экспрессирующие CLDN6 человека (hCLDN6/BaF), клетки Ва/Ф3, экспрессирующие CLDN9 человека (hCLDN9/BaF), клетки Ва/Ф3, экспрессирующие CLDN3 человека (hCLDN3/BaF), клетки Ва/Ф3, экспрессирующие CLDN4 человека (hCLDN4/BaF), клетки Ва/Ф3, экспрессирующие мышинный CLDN6 (mCLDN6/BaF), клетки Ва/Ф3, экспрессирующие мышинный CLDN9 (mCLDN9/BaF), клетки Ва/Ф3, экспрессирующие мышинный CLDN3 (mCLDN3/BaF), и клетки Ва/Ф3, экспрессирующие мышинный CLDN4 (mCLDN4/BaF), получали после трансфекции экспрессионных векторов CLDN6 человека, CLDN9 человека (с последовательностью SEQ ID NO: 198), CLDN3 человека (с последовательностью SEQ ID NO: 199), CLDN4 человека (с последовательностью SEQ ID NO: 200), CLDN6 мыши (с последовательностью SEQ ID NO: 201), CLDN9 мыши (с последовательностью SEQ ID NO: 202), CLDN3 мыши (с последовательностью SEQ ID NO: 203) и CLDN4 мыши (с последовательностью SEQ ID NO: 204) в мышиную клеточную линию ргоВ Ва/Ф3 соответственно.

Белки семейства клаудинов характеризуются наличием двух внеклеточных доменов, доступных для антител. Что касается сходства аминокислотных последовательностей внеклеточных доменов CLDN6 человека и CLDN9 человека, первый внеклеточный домен практически не отличается, а второй

5 внеклеточный домен отличается только наличием двух различных аминокислот (фиг. 18). Глутамин в положении 156 человеческого клаудина 6 (положение 156 в последовательностях SEQ ID NO: 196 или 197) заменяли на лейцин, чтобы

10 получить мутант CLDN6 человека, содержащий ту же аминокислоту, что и человеческий клаудин 9 в положении 156. Этот мутант CLDN6 человека назван hCLDN6(Q156L) (с последовательностью SEQ ID NO: 205). Трансфектант Ва/F3, стабильно экспрессирующий hCLDN6(Q156L), получали с использованием аналогичного метода, описанного выше. Созданный трансфектант Ва/F3 назван hCLDN6(Q156L)/ВаF.

Клетки-трансфектанты FreeStyleTM293-F, временно экспрессирующие

15 человеческие и мышинные CLDN3, 4, 6 и 9, получали при введении вектора, экспрессирующего CLDN человека и мыши (включая CLDN6, CLDN9, CLDN3 и CLDN4), в клетки FreeStyleTM 293-F (от фирмы Invitrogen) с использованием реагента 293fectin (от фирмы Invitrogen). Полученные клетки-трансфектанты FreeStyleTM293-F названы hCLDN3/FS293, hCLDN4/FS293, hCLDN6/FS293,

20 hCLDN9/FS293, mCLDN3/FS293, mCLDN4/FS293, mCLDN6/FS293 и mCLDN9/FS293 соответственно.

Промышленная применимость

В настоящем изобретении предлагаются противоопухолевые агенты, содержащие мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, которая

25 способна связываться с CD3 и CD137 (4-1BB), которая связывается либо с CD3, либо с CD137 и которая способна связываться с CLDN6, комбинированная терапия с использованием противоопухолевых агентов по меньшей мере с одним другим противоопухолевым агентом, и фармацевтические композиции и т. п. для применения в комбинированной терапии. Мультиспецифичные

30 антигенсвязывающие молекулы, включенные в противоопухолевые агенты, фармацевтические композиции, комбинации или наборы по настоящему изобретению или используемые в способах или при применении по настоящему изобретению, можно использовать для направления на клетки, экспрессирующие

CLDN6, для применения в иммунотерапии при лечении различных видов рака, прежде всего рака, связанного с CLDN6, такого как CLDN6-положительный рак.

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Противоопухолевый агент, содержащий в качестве активного ингредиента мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащая (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связываться с клаудином 6 (CLDN6).

2. Противоопухолевый агент, содержащий в качестве активного ингредиента любую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу из ряда (1)-(6), представленного ниже:

(1) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая содержит первую переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 11, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 17 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 23, вторую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40, третью переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19 и четвертую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37,

(2) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая содержит первую переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 9, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 15 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 21, вторую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 35 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 39, третью переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с

последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 14 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 20 и четвертую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 30, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 38,

(3) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая содержит первую переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 10, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 16 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 22, вторую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 35 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 39, третью переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 14 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 20 и четвертую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 30, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 38,

(4) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая содержит первую переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 12, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 24, вторую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40, третью переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19 и четвертую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37,

(5) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая содержит первую переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 11,

CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 17 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 23, вторую вариабельную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40, третью вариабельную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37 и четвертую вариабельную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19 и

(6) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая содержит первую вариабельную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 12, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 24, вторую вариабельную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40, третью вариабельную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37 и четвертую вариабельную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19.

3. Противоопухолевый агент по п. 1 или п. 2, где исследуемый рак является CLDN6-положительным раком.

4. Противоопухолевый агент по любому из п.п. 1-3, где исследуемый рак носит по меньшей мере к одному типу рака, выбранному из группы, включающей рак яичников, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидную рабдоидную опухоль.

5. Противоопухолевый агент по любому из п.п. 1-4, где исследуемый рак является раком, метастазировавшим в брюшную полость.

6. Фармацевтическая композиция для применения в комбинации по
5 меньшей мере с одним другим противоопухолевым агентом, где
фармацевтическая композиция содержит в качестве активного ингредиента
мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу, мультиспецифичная
антигенсвязывающая молекула, содержащая (i) первый антигенсвязывающий
фрагмент, способный связываться с CD3 и CD137 и который связывается либо с
10 CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, способный
связываться с клаудином 6 (CLDN6).

7. Фармацевтическая композиция для применения в комбинации по
15 меньшей мере с одним другим противоопухолевым агентом, где
фармацевтическая композиция содержит в качестве активного ингредиента
любую мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу из ряда (1)-(6),
представленного ниже:

(1) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая содержит
первую переменную область антитела, содержащую определяющую
20 комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 11,
CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 17 и CDR3 с последовательностью
SEQ ID NO: 23, вторую переменную область антитела, содержащую CDR1 с
последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO:
36 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40, третью переменную область
25 антитела, содержащую определяющую комплементарную область (CDR) 1 с
последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO:
13 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19 и четвертую переменную
область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 29,
CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33 и CDR3 с последовательностью
30 SEQ ID NO: 37,

(2) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая содержит
первую переменную область антитела, содержащую определяющую
комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 9,
CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 15 и CDR3 с последовательностью

SEQ ID NO: 21, вторую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 35 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 39, третью переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 14 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 20 и четвертую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 30, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 38,

10 (3) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая содержит первую переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 10, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 16 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 22, вторую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 31, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 35 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 39, третью переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 14 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 20 и четвертую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 30, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 34 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 38,

25 (4) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая содержит первую переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 12, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 24, вторую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40, третью переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарную область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19 и четвертую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 29,

CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37,

(5) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая содержит первую переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 11, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 17 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 23, вторую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40, третью переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37 и четвертую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19 и

(6) мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула, которая содержит первую переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 12, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 18 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 24, вторую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 32, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 36 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 40, третью переменную область антитела, содержащую определяющую комплементарность область (CDR) 1 с последовательностью SEQ ID NO: 29, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 33 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37 и четвертую переменную область антитела, содержащую CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 13 и CDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19.

8. Фармацевтическая композиция по п. 6 или п. 7, где исследуемый рак является CLDN6-положительным раком.

9. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 6-8, где исследуемый рак относится к любому типу рака, выбранному из группы, включающей рак

яичников, немелкоклеточный рак легкого, рак желудка, рак печени, рак эндометрия, эмбрионально-клеточную опухоль, рак толстого кишечника, рак мочевого пузыря и атипичную тератоидную рабдоидную опухоль.

5 10. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 6-9, где исследуемый рак является раком, метастазировавшим в брюшную полость.

10 11. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 6-10, где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят до, одновременно и/или после введения по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента.

15 12. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 6-11, где мультиспецифичную антигенсвязывающую молекулу вводят в опухоль, в которой экспрессия CLDN6 увеличена за счет введения по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента.

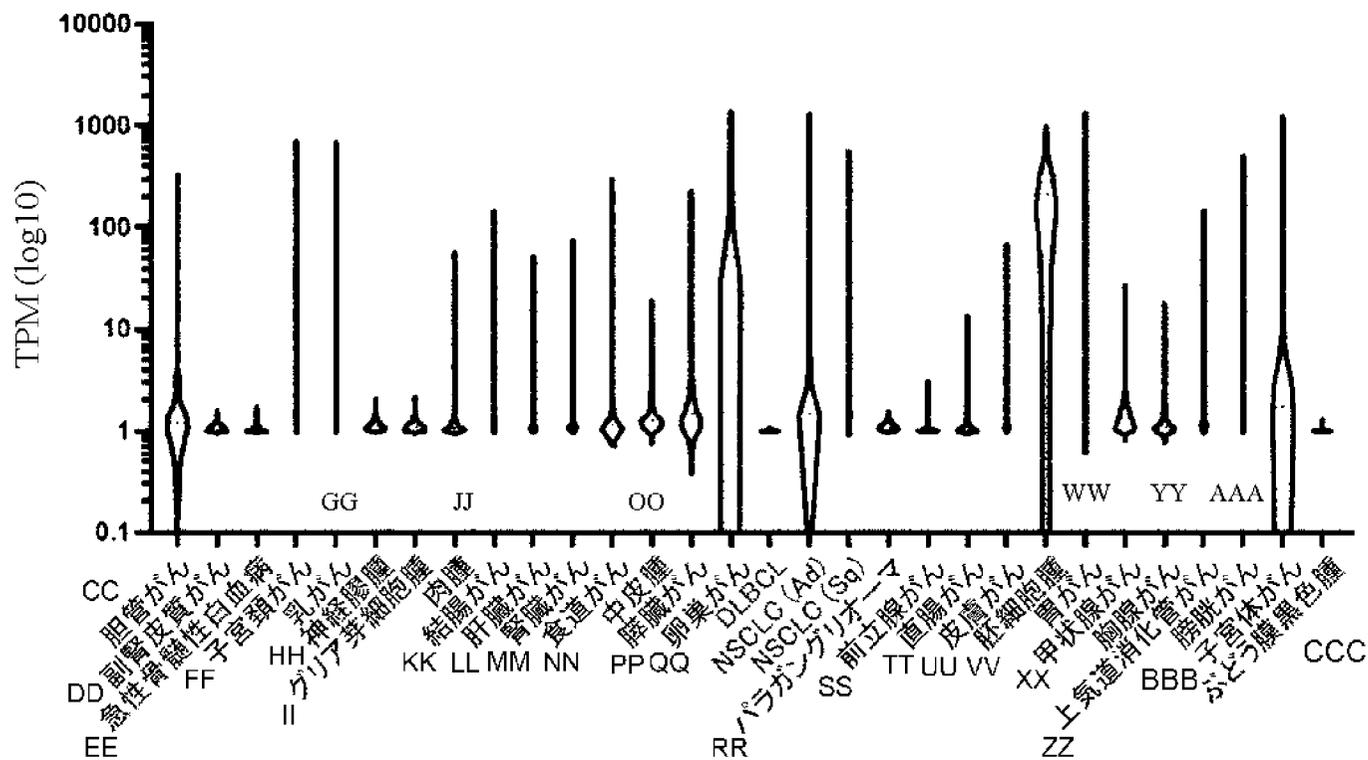
20 13. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 6-12, где по меньшей мере один другой противоопухолевый агент представляет собой по меньшей мере один агент, выбранный из группы, включающей химиотерапевтический агент, ингибитор иммунных контрольных точек и ингибитор PARP.

25 14. Индуцирующий цитотоксичность агент, супрессор клеточного роста, блокатор клеточного роста, активатор иммунного ответа, противоопухолевый терапевтический агент или агент для профилактики рака, содержащий фармацевтическую композицию по любому из п.п. 6-13.

30 15. Способ индуцирования цитотоксичности, блокировки пролиферации клеток, ингибирования пролиферации клеток, активации иммунного ответа, лечения рака или профилактики рака у индивидуума, включающий введение эффективного количества мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы и эффективного количества по меньшей мере одного другого противоопухолевого агента, где мультиспецифичная антигенсвязывающая молекула содержит (i) первый антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с CD3 и CD137

и который связывается либо с CD3, либо с CD137, и (ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, который способен связывать клаудин 6 (CLDN6).

Экспрессия CLDN6



Фигура 1.

GD137(24-186)

2										3										4										5										6									
4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9				
L	Q	D	P	C	S	N	C	P	A	G	T	F	C	D	N	N	R	N	Q	I	C	S	P	C	P	P	N	S	F	S	S	A	G	G	Q	R	T	C	D	I	C	R	Q	C	K				
■										▨										■										▨																			

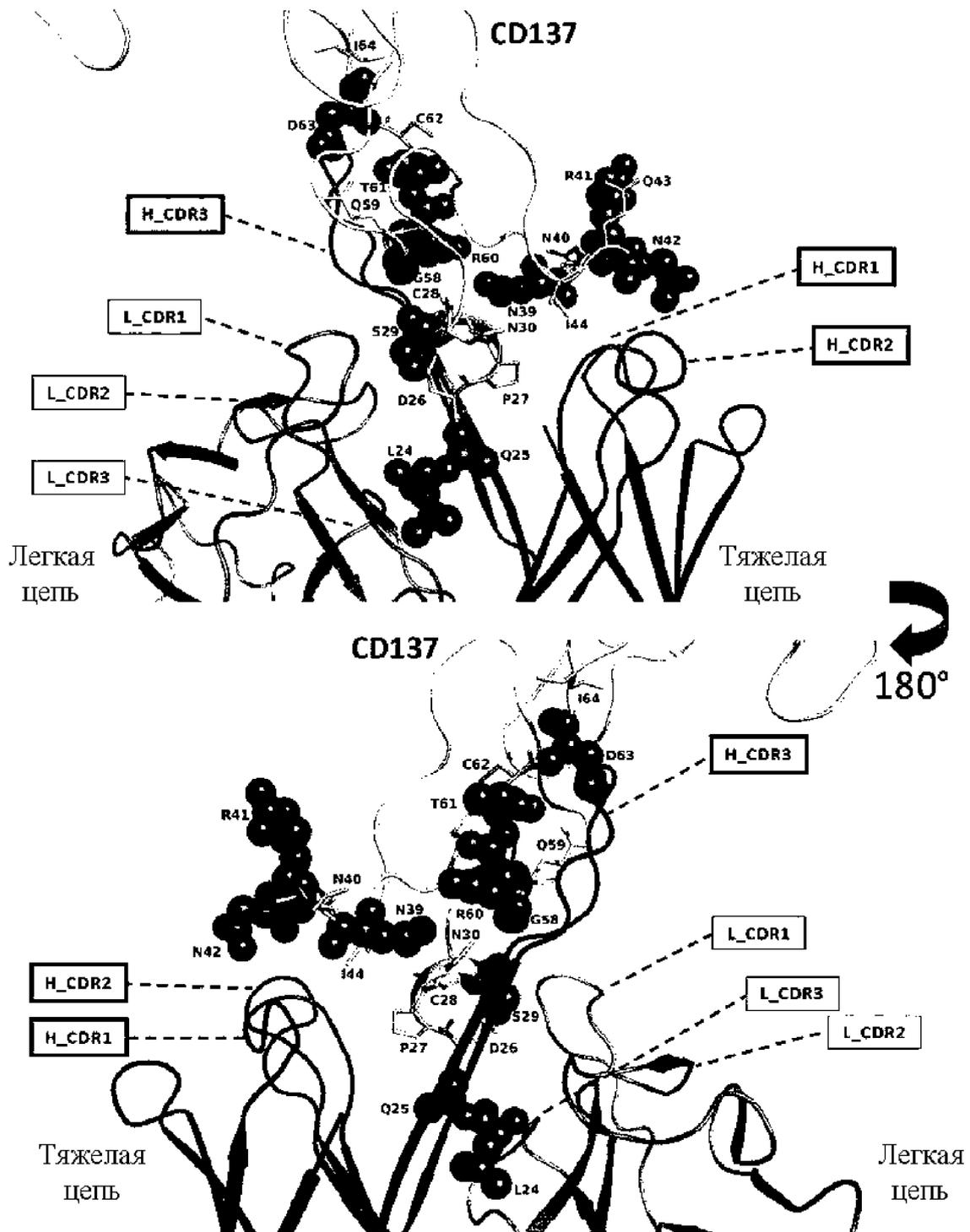
7										8										9										10										11									
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
G	V	F	R	T	R	K	E	C	S	S	T	S	N	A	E	C	D	C	T	P	G	F	H	C	L	G	A	G	C	S	M	G	E	Q	D	C	K	Q	G	Q	E	L	T	K	K	G	C	K	D

12										13										14										15										16									
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C	C	F	G	T	F	N	D	Q	K	R	G	I	C	R	P	W	T	N	C	S	L	D	G	K	S	V	L	V	N	G	T	K	E	R	D	V	V	C	G	P	S	P	A	D	L	S	P	G	A

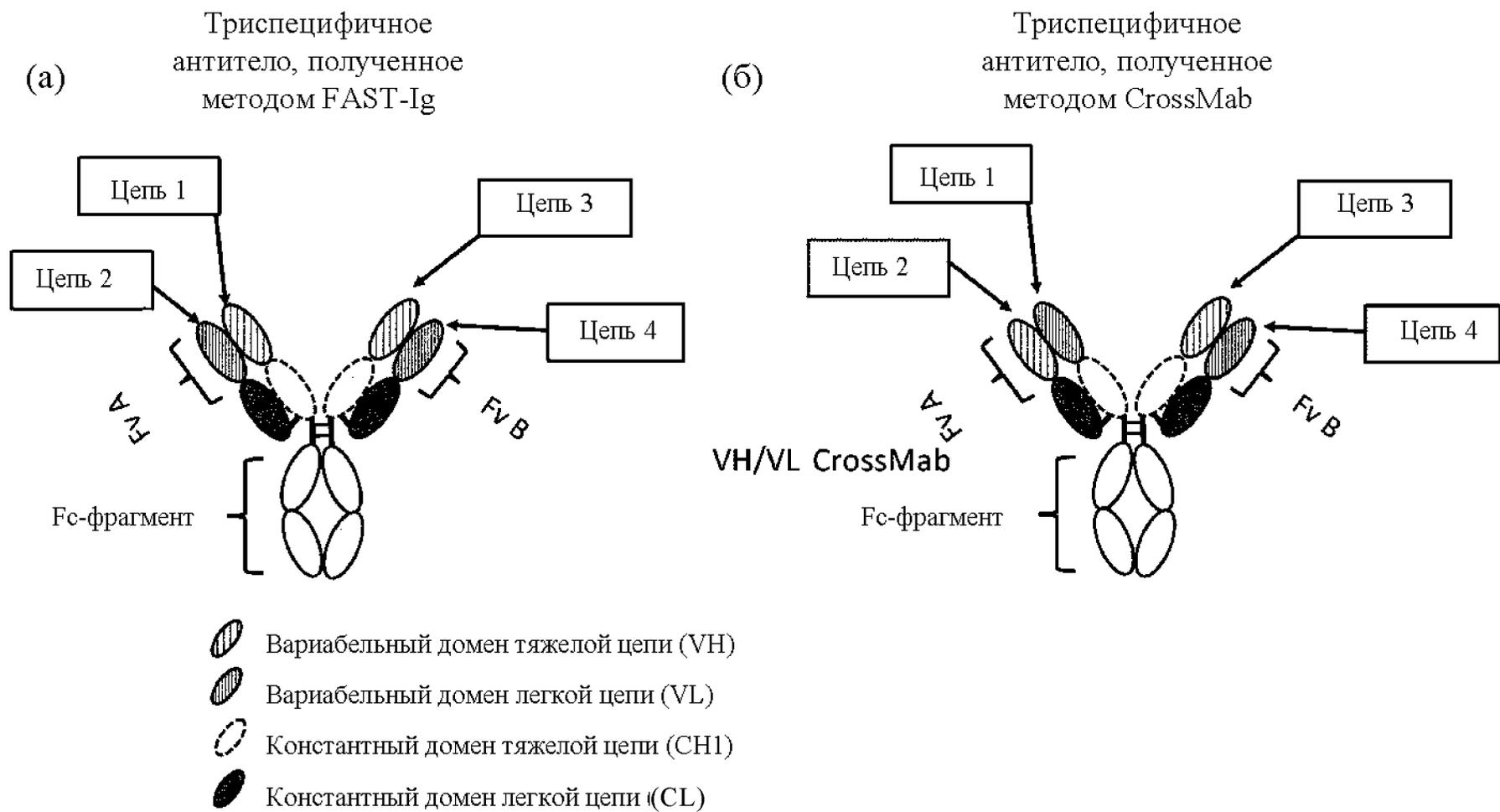
17										18						
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6
S	S	V	T	P	P	A	P	A	R	E	P	G	H	S	P	Q

■ < 3.0 Å ▨ < 4.5 Å

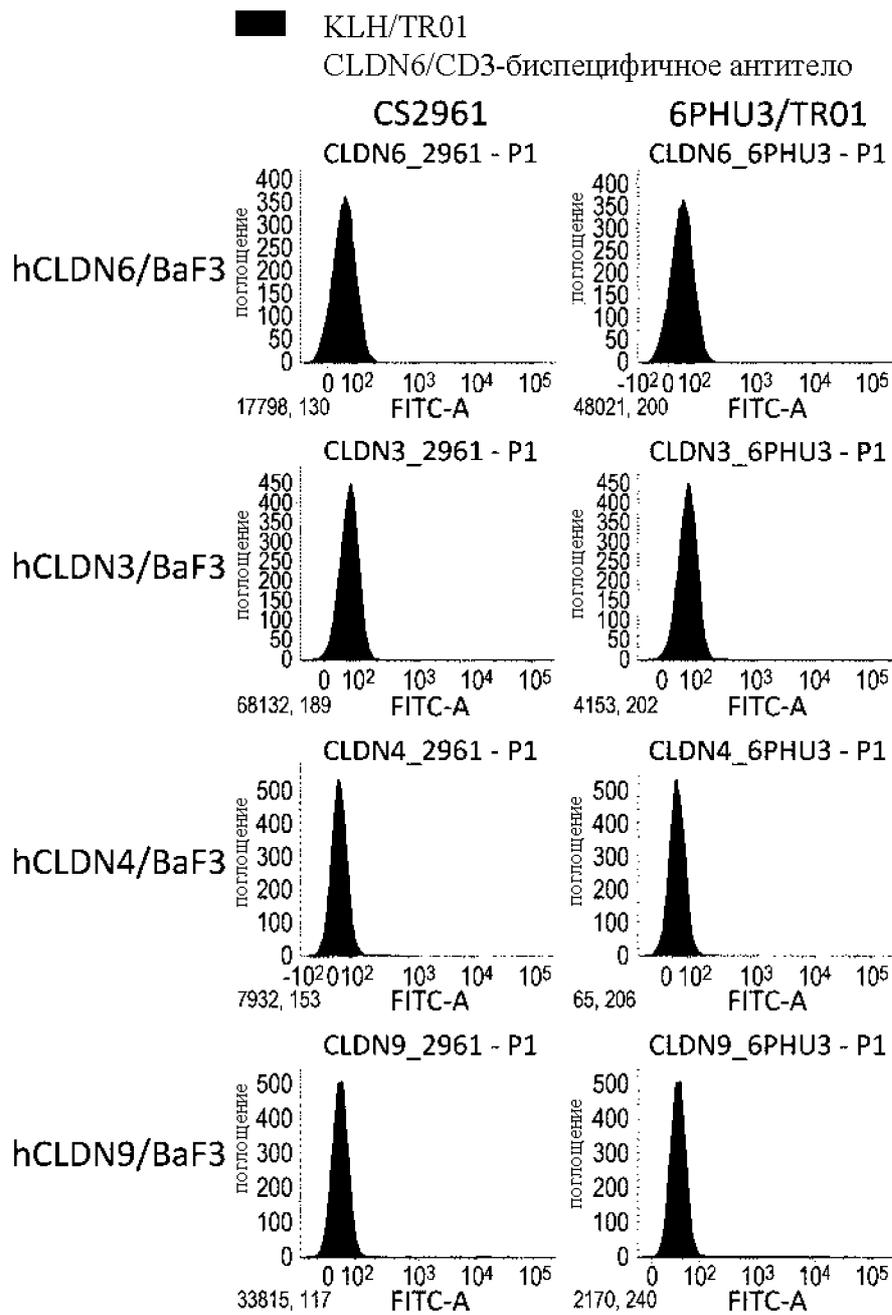
Фигура 2.



Фигура 3.

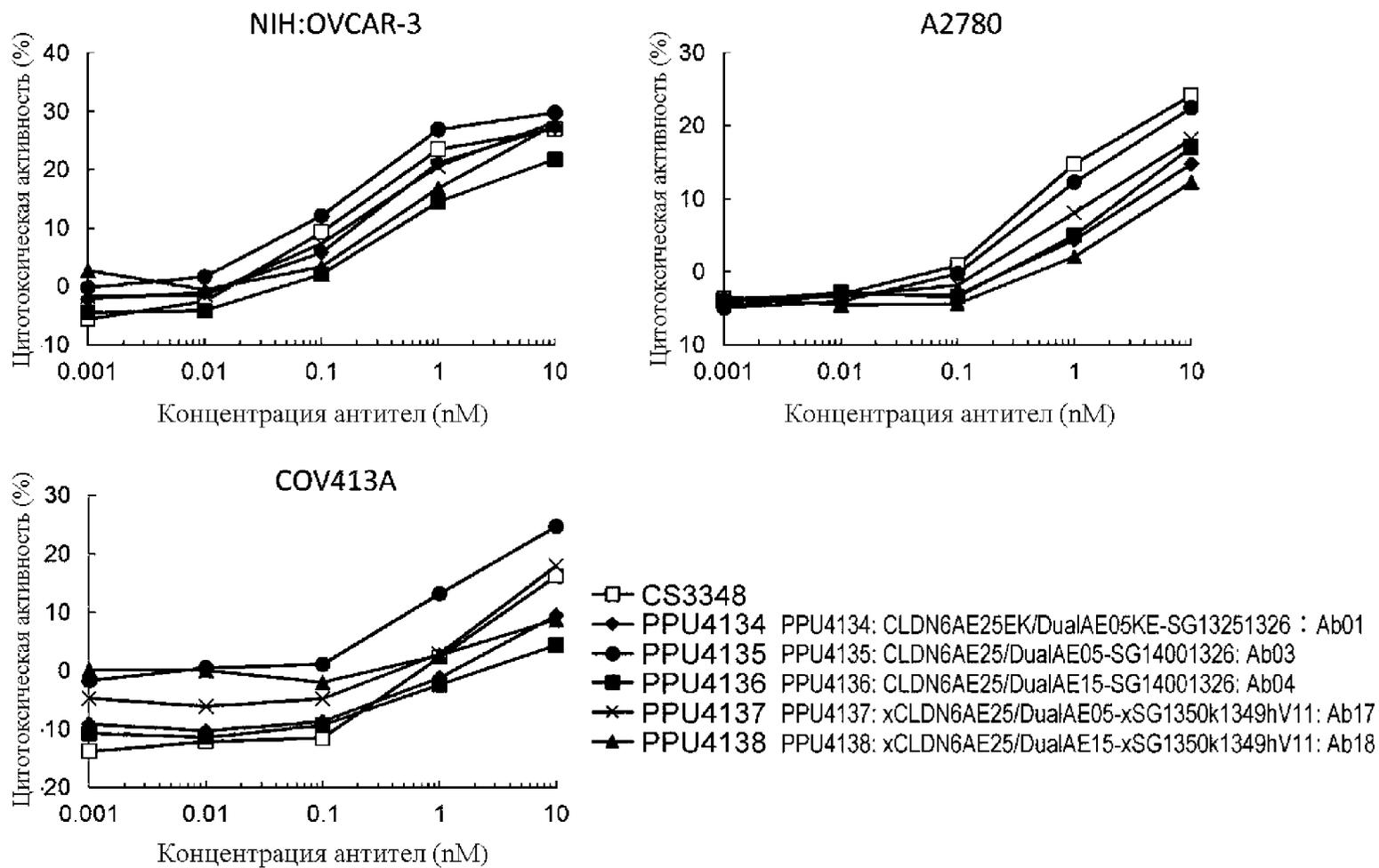


Фигура 4.



Фигура 5.

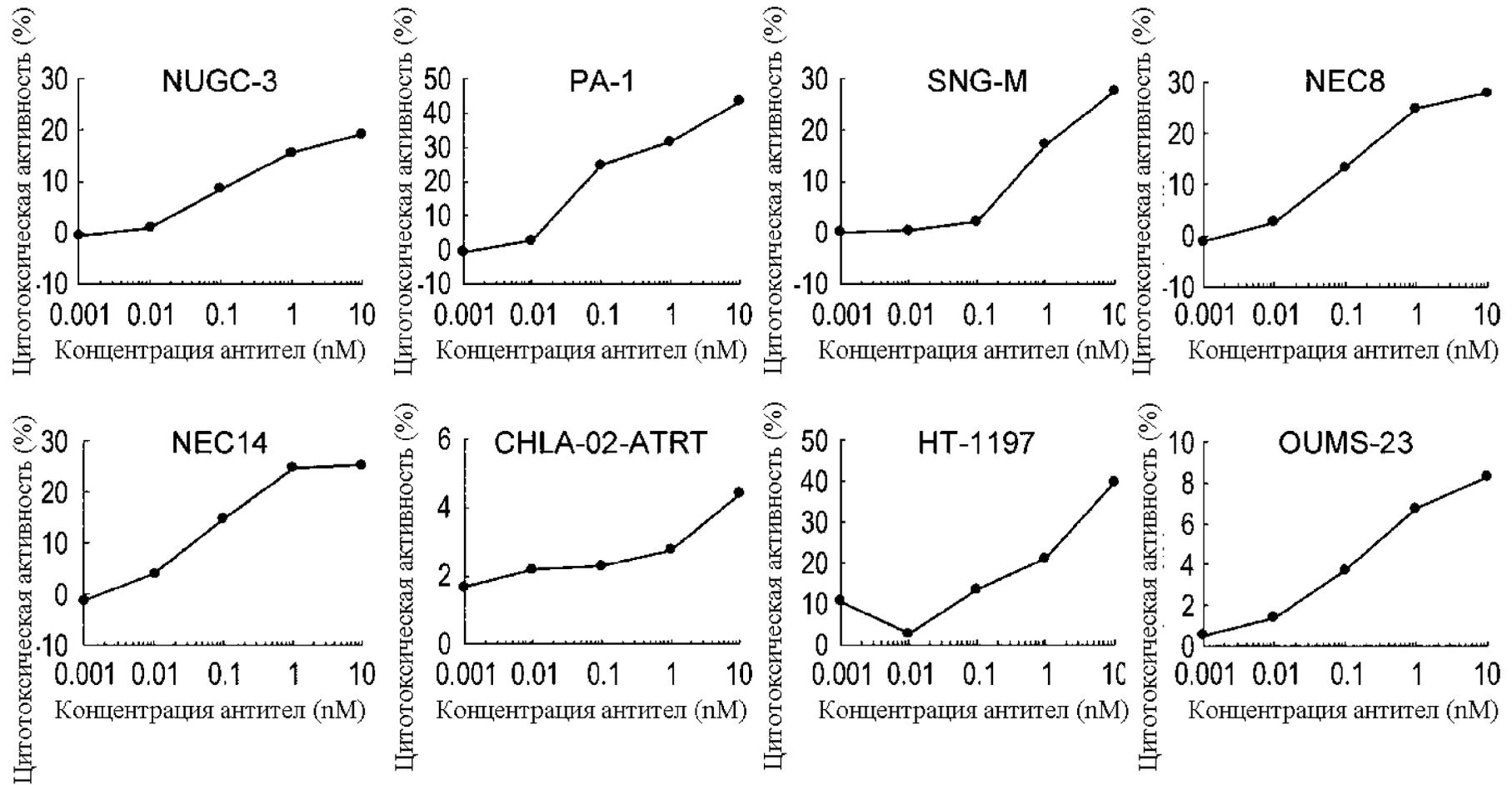
Уровень поглощения LDH



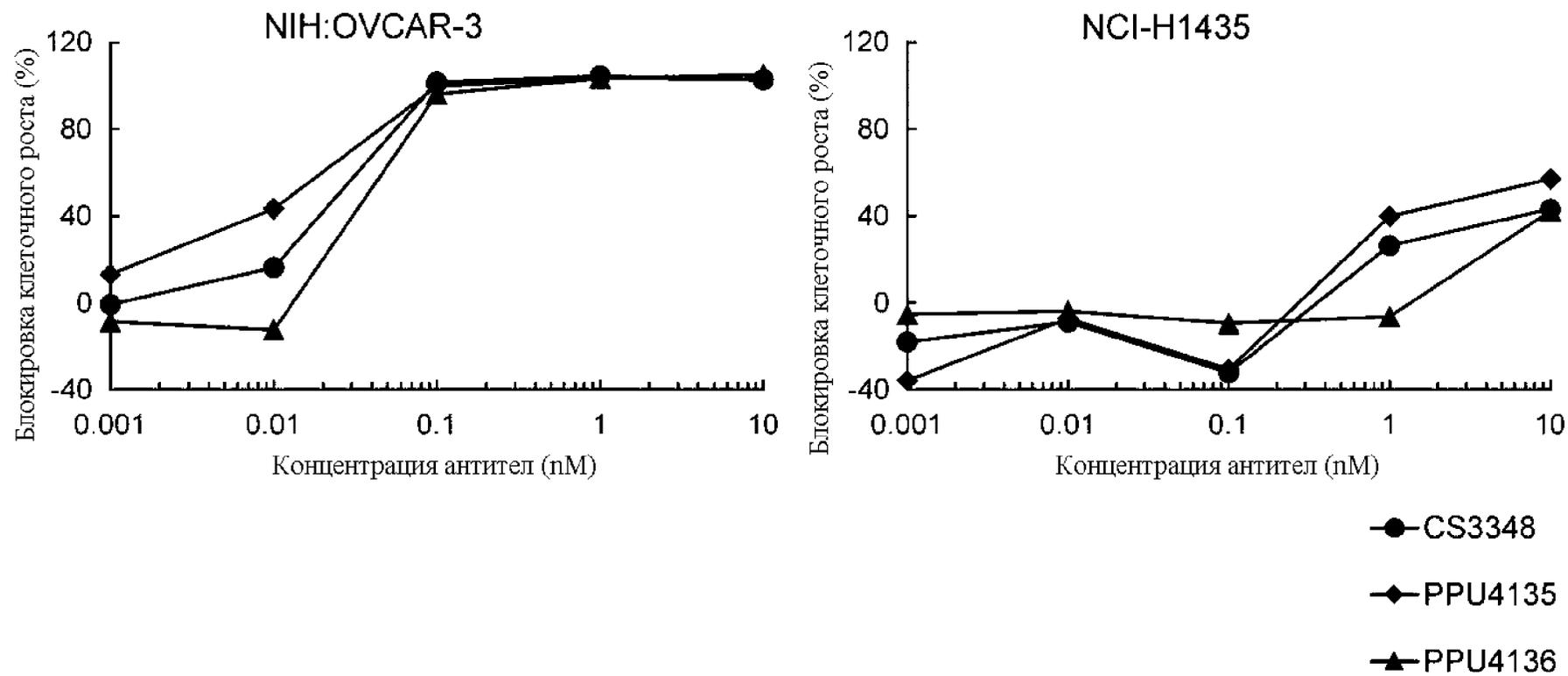
Фигура 6.

		Внеклеточный домен 1																																																																																										
hCLDN6	1	M	A	S	A	G	M	Q	I	L	G	V	V	L	I	L	G	W	V	N	G	L	V	S	C	A	L	P	M	K	V	T	A	F	I	G	N	S	I	V	V	A	Q	V	V	W	E	G	L	W	M	S	C	V	V	Q	S	T	G	Q	M	Q	C	K	V	Y	D	S	L	L	A	L	P	Q	D	L	Q	A	A	R	A	L	C	V	I	A	L	L	V	90		
hCLDN9	1	M	A	S	I	G	L	E	L	L	G	M	T	L	A	V	L	G	W	L	G	T	L	V	S	C	A	L	P	L	W	K	V	T	A	F	I	G	N	S	I	V	V	A	Q	V	V	W	E	G	L	W	M	S	C	V	V	Q	S	T	G	Q	M	Q	C	K	V	Y	D	S	L	L	A	L	P	Q	D	L	Q	A	A	R	A	L	C	V	I	A	L	L	V	90
hCLDN6	91	A	L	F	G	L	L	V	Y	L	A	G	A	K	C	T	T	C	V	E	E	K	D	S	K	A	R	L	V	L	T	S	G	I	V	F	V	I	S	G	V	L	I	L	I	P	V	C	W	T	A	H	A	I	I	R	D	F	Y	N	P	L	V	A	E	A	Q	K	R	E	L	G	A	S	L	Y	L	G	W	A	A	S	G	L	L	L	G	G	L	180		
hCLDN9	91	A	L	L	G	L	V	A	I	T	G	A	Q	C	T	T	C	V	E	D	E	G	A	K	A	R	I	V	L	T	A	G	V	L	L	L	S	G	I	L	V	L	I	P	V	C	W	T	A	H	A	I	Q	D	F	Y	N	P	L	V	A	E	A	L	K	R	E	L	G	A	S	L	Y	L	G	W	A	A	A	L	L	L	G	G	L	180						
hCLDN6	181	L	C	C	T	C	P	S	G	G	S	Q	G	P	S	H	M	A	R	Y	S	T	S	A	P	A	I	S	R	G	P	S	E	Y	P	T	K	N	Y	V	*	221																																																		
hCLDN9	181	L	C	C	T	C	P	P	S	H	F	E	R	P	R	G	P	R	L	G	Y	S	I	P	S	R	S	G	A	S	G	L	D	K	R	D	Y	V	*	218																																																				

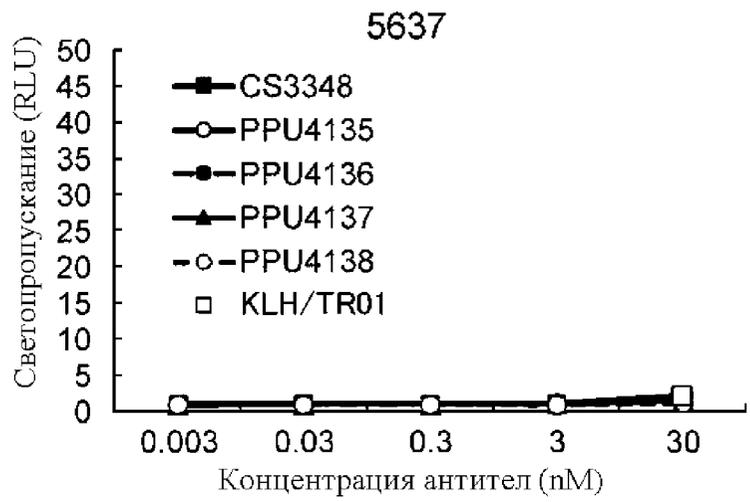
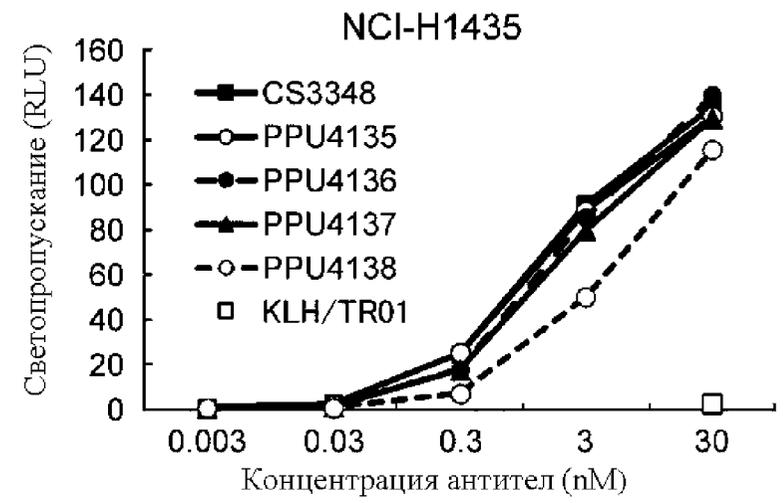
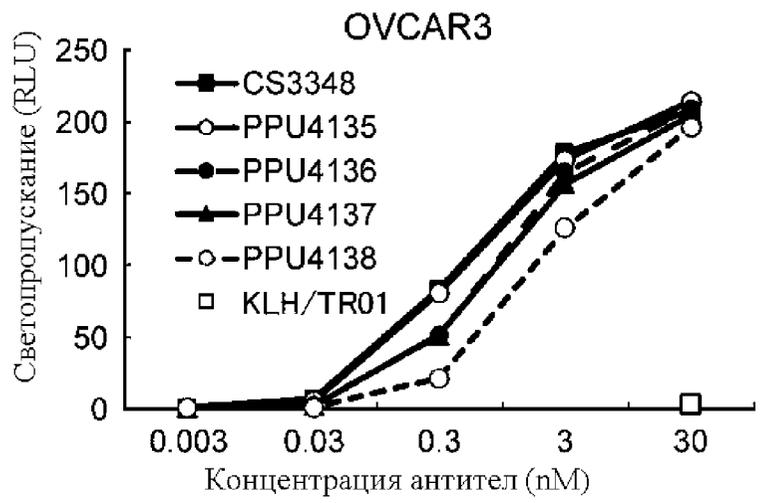
Фигура 7.



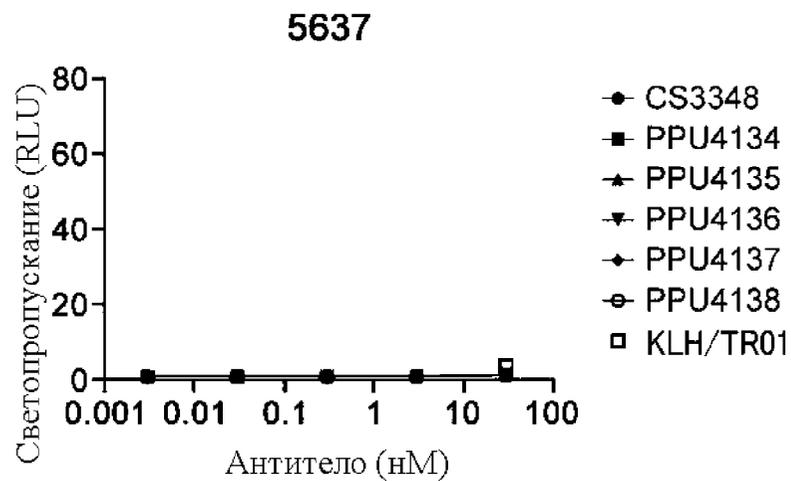
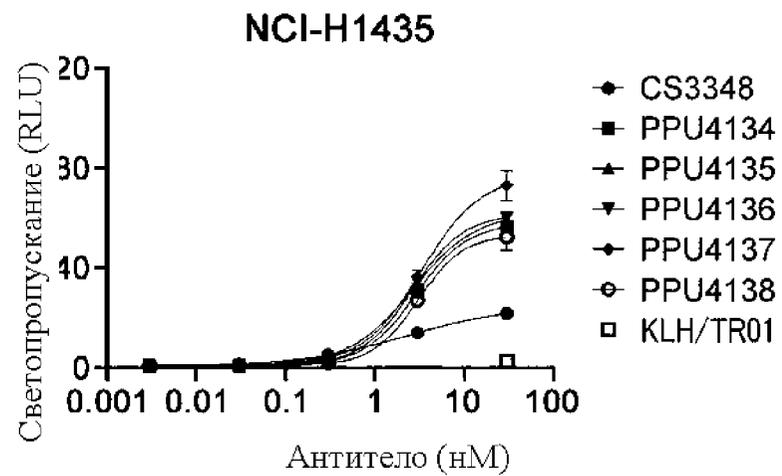
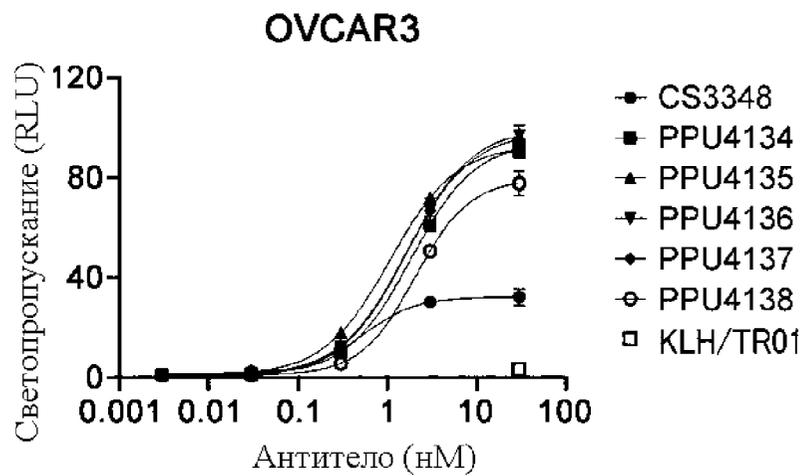
Фигура 8.



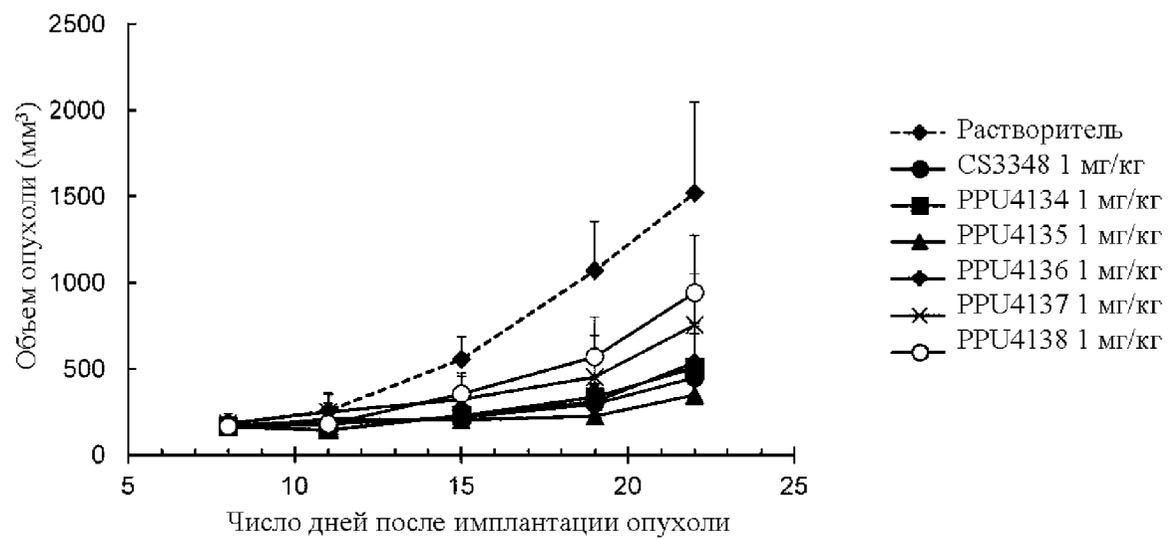
Фигура 9.



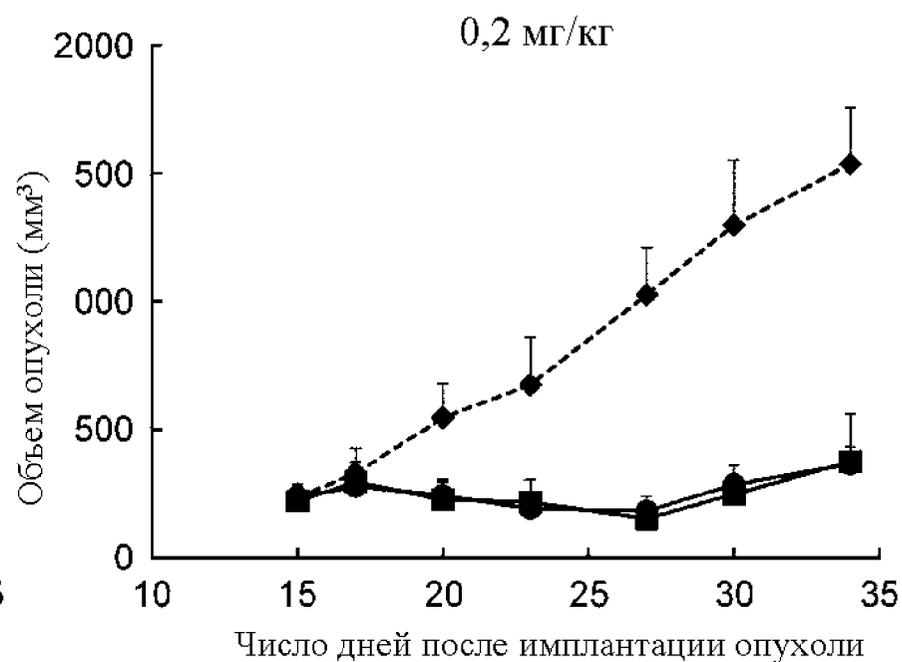
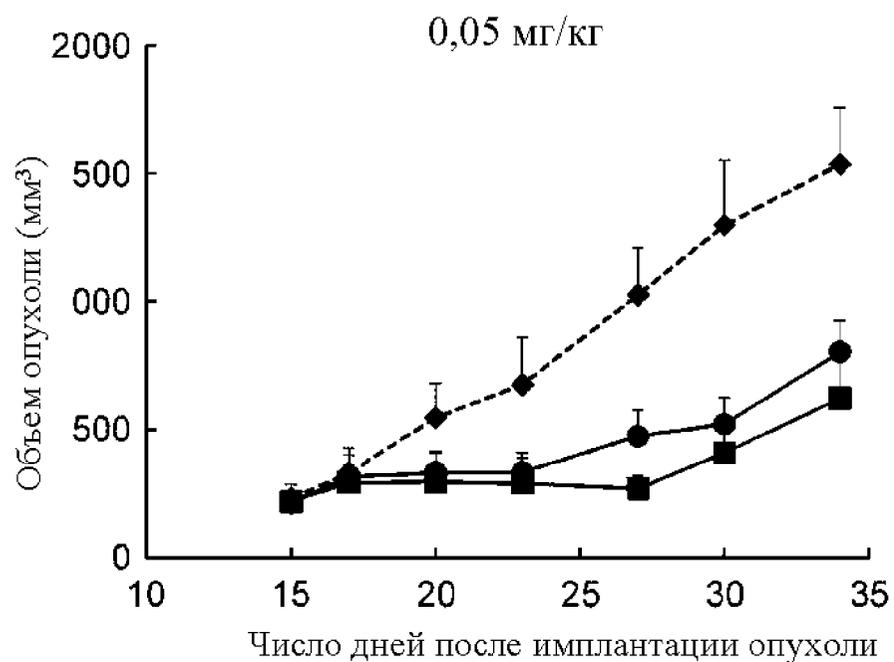
Фигура 10.



Фигура 11.

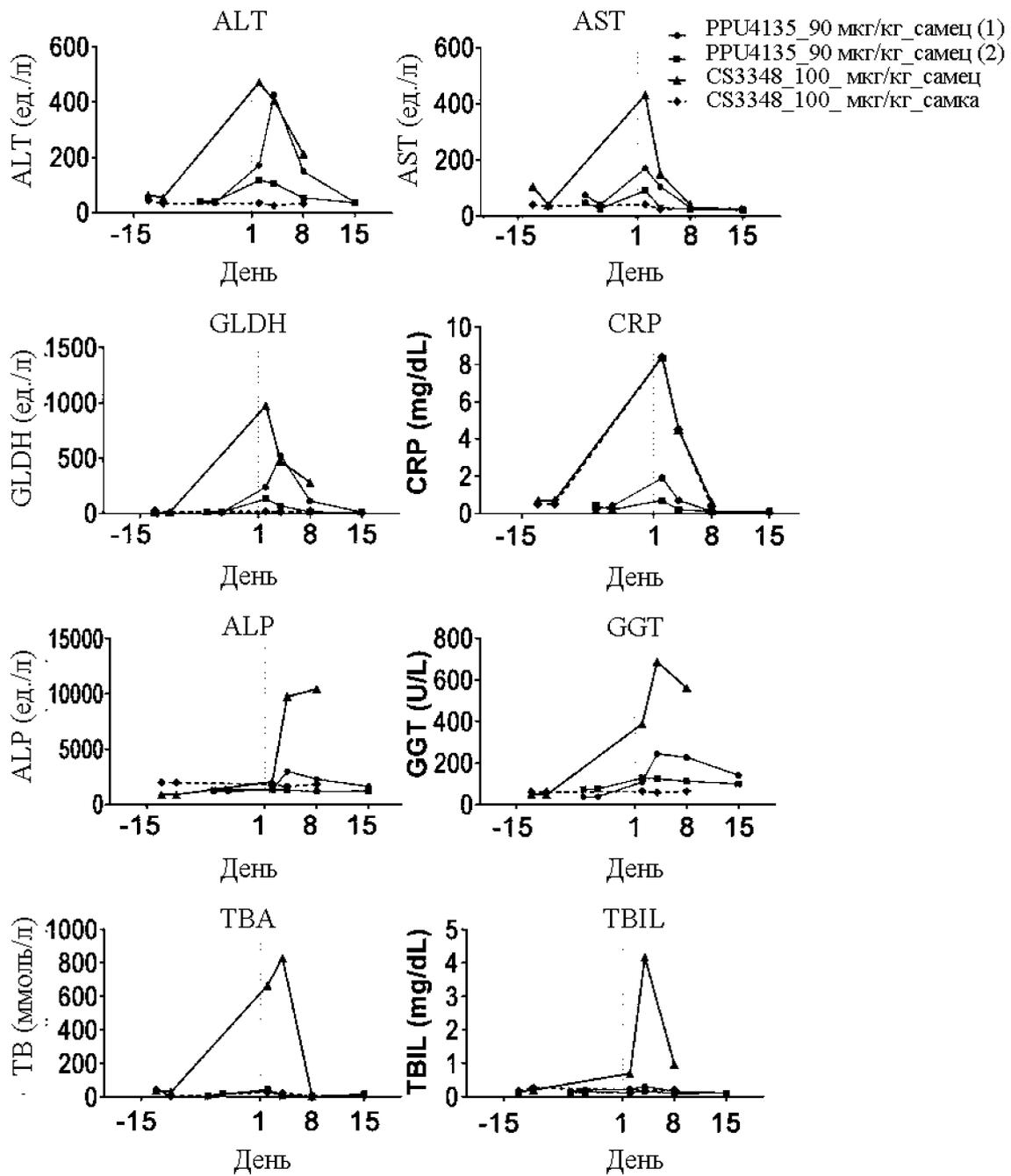


Фигура 12.

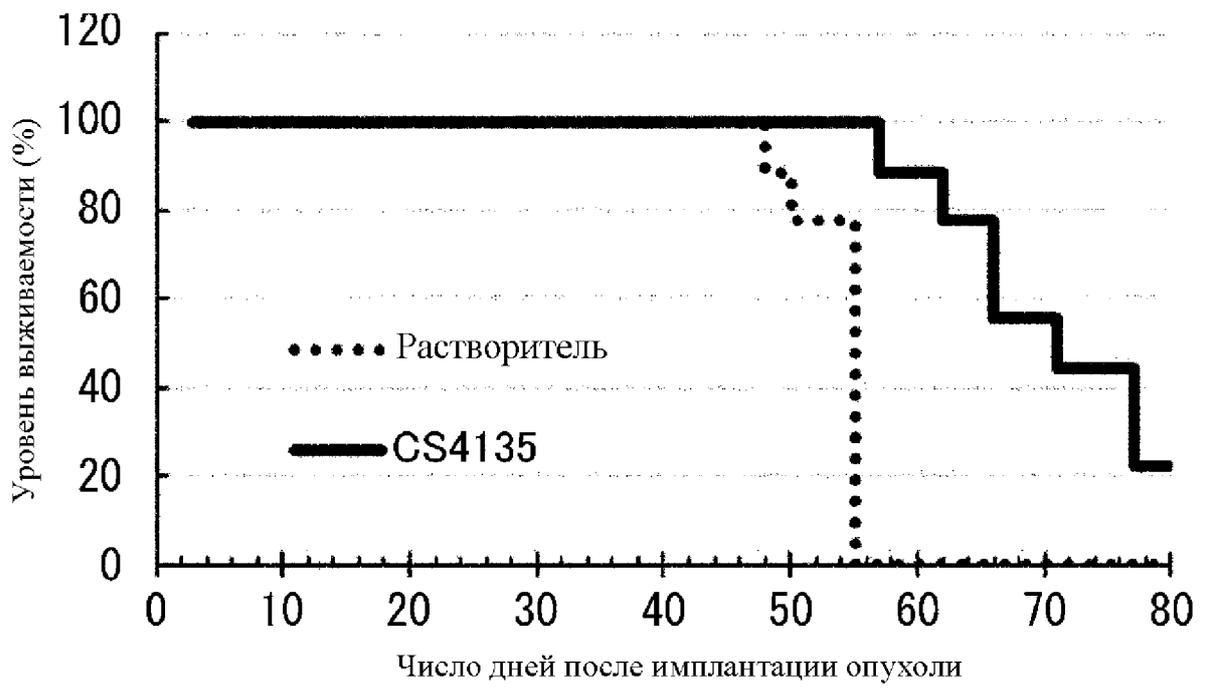


- ◆--- Растворитель
- CS3348
- PPU4135

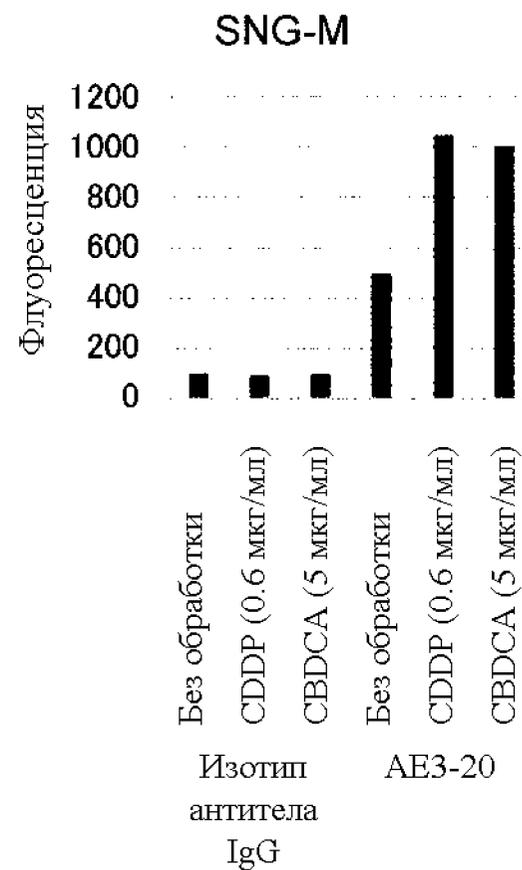
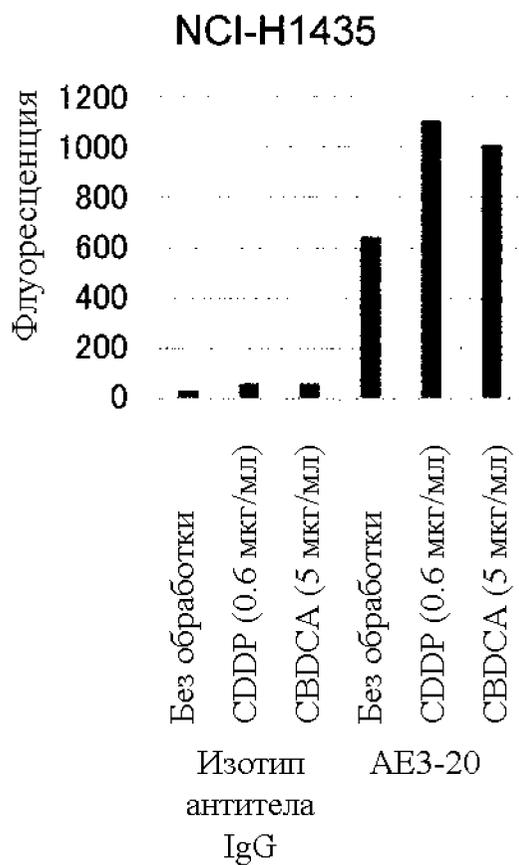
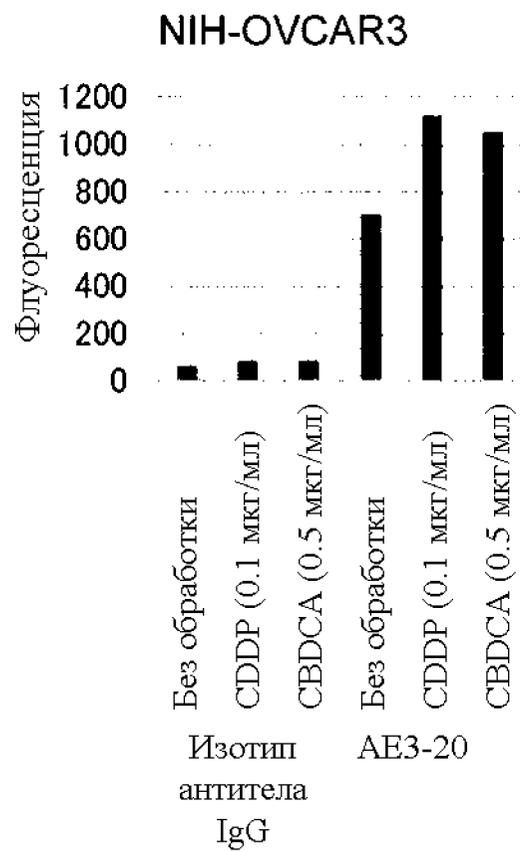
Фигура 13.



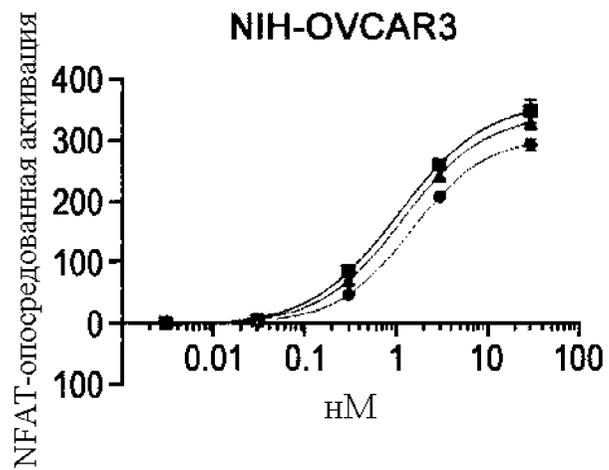
Фигура 14.



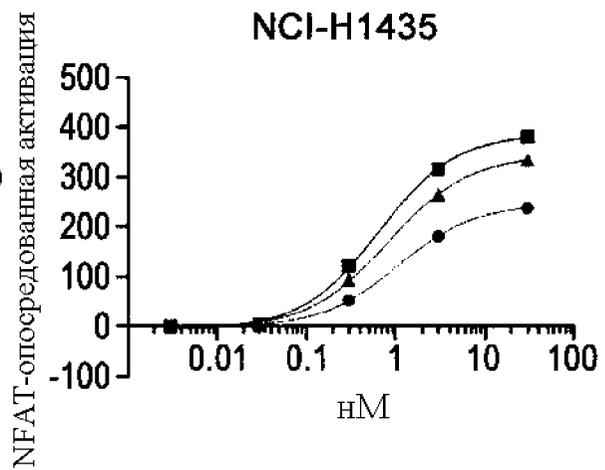
Фигура 15.



Фигура 16.

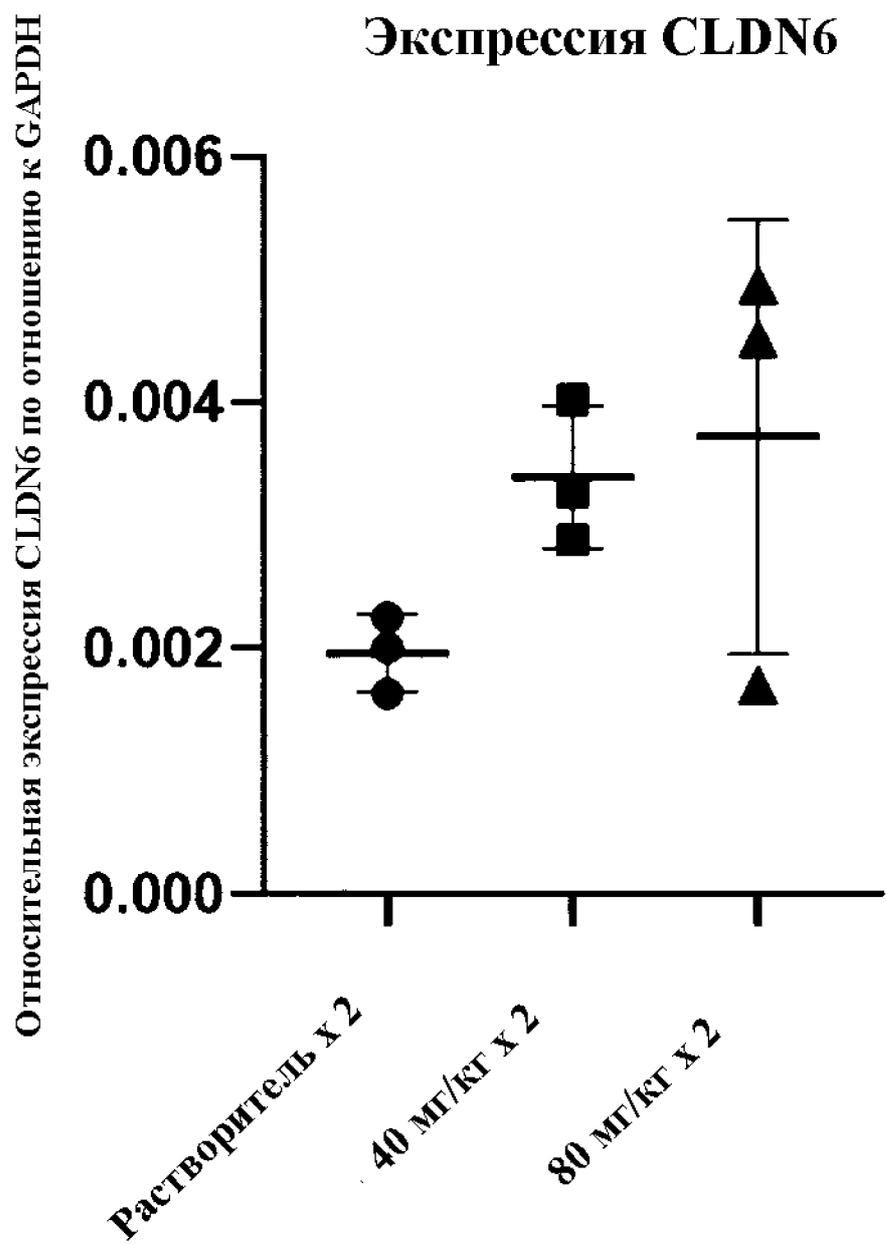


- Без обработки
- CDDP (0.1 мкг/мл)
- ▲ CBDCА (0.5 мкг/мл)

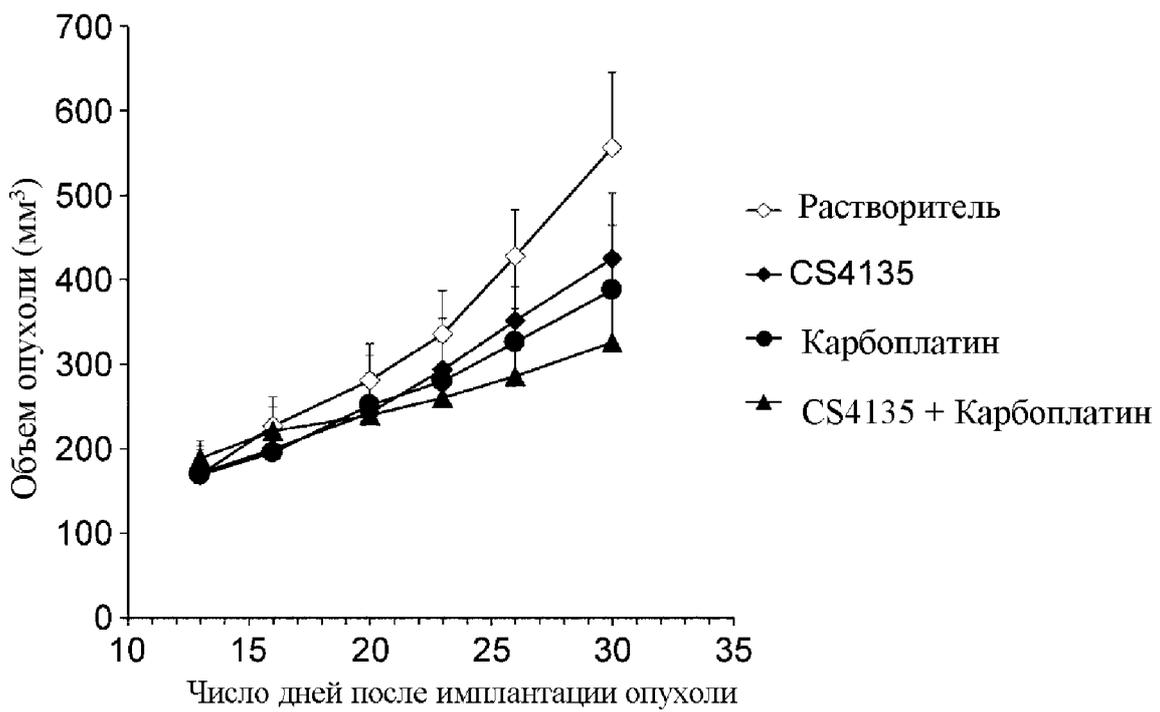


- Без обработки
- CDDP (0.5 мкг/мл)
- ▲ CBDCА (6 мкг/мл)

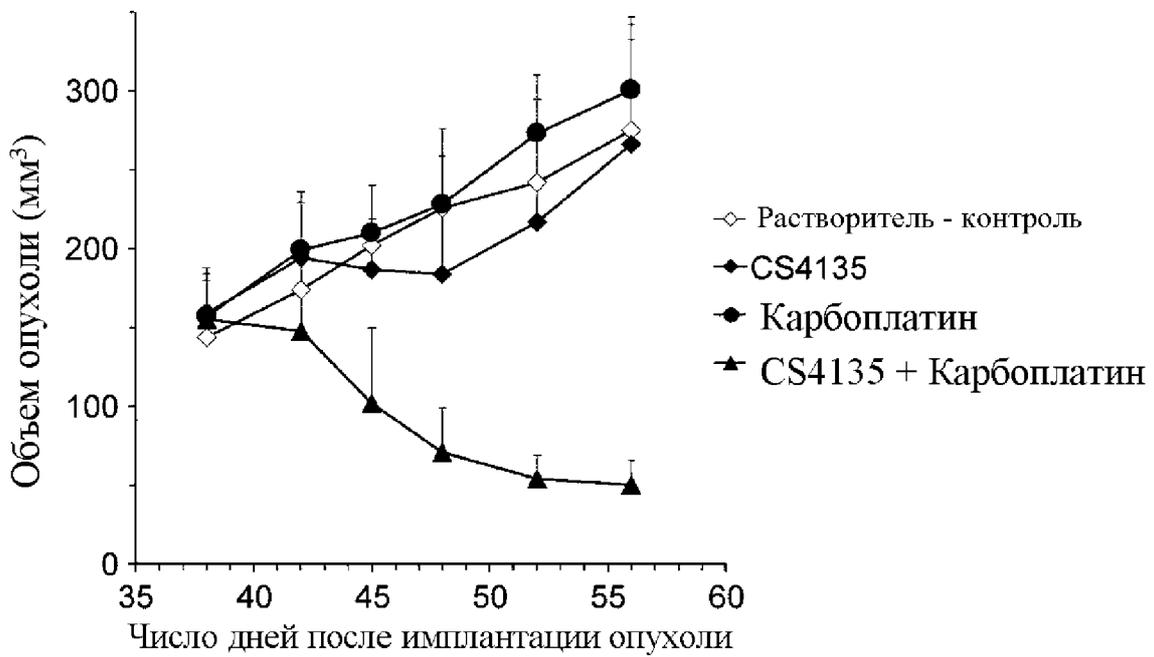
Фигура 17.



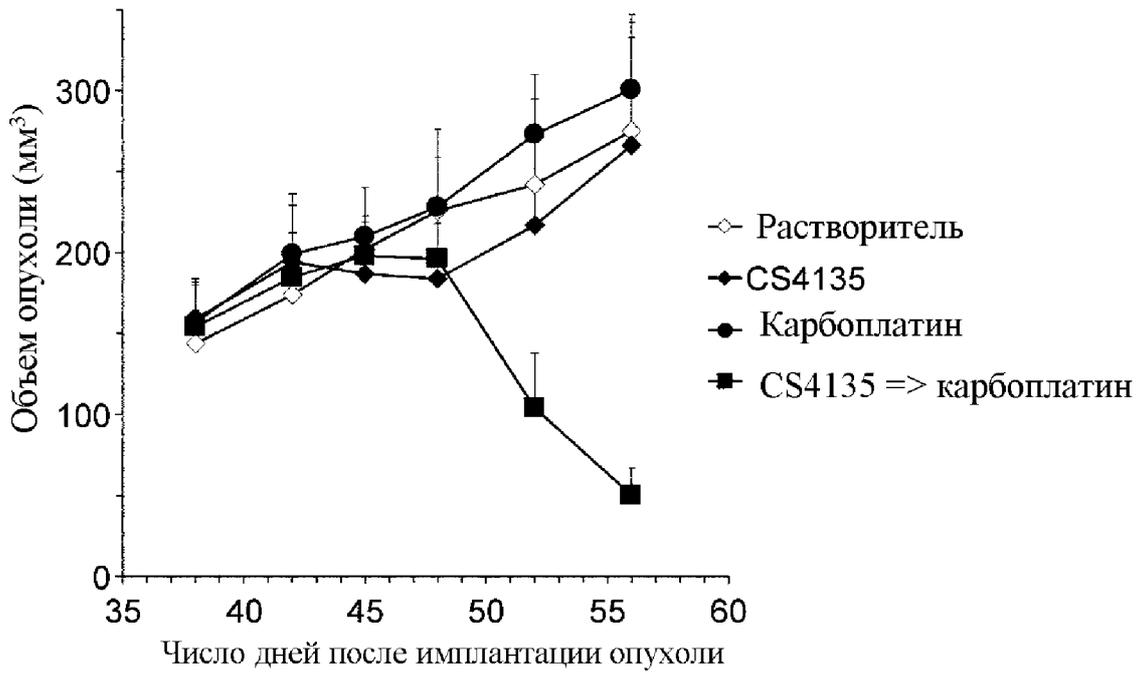
Фигура 18.



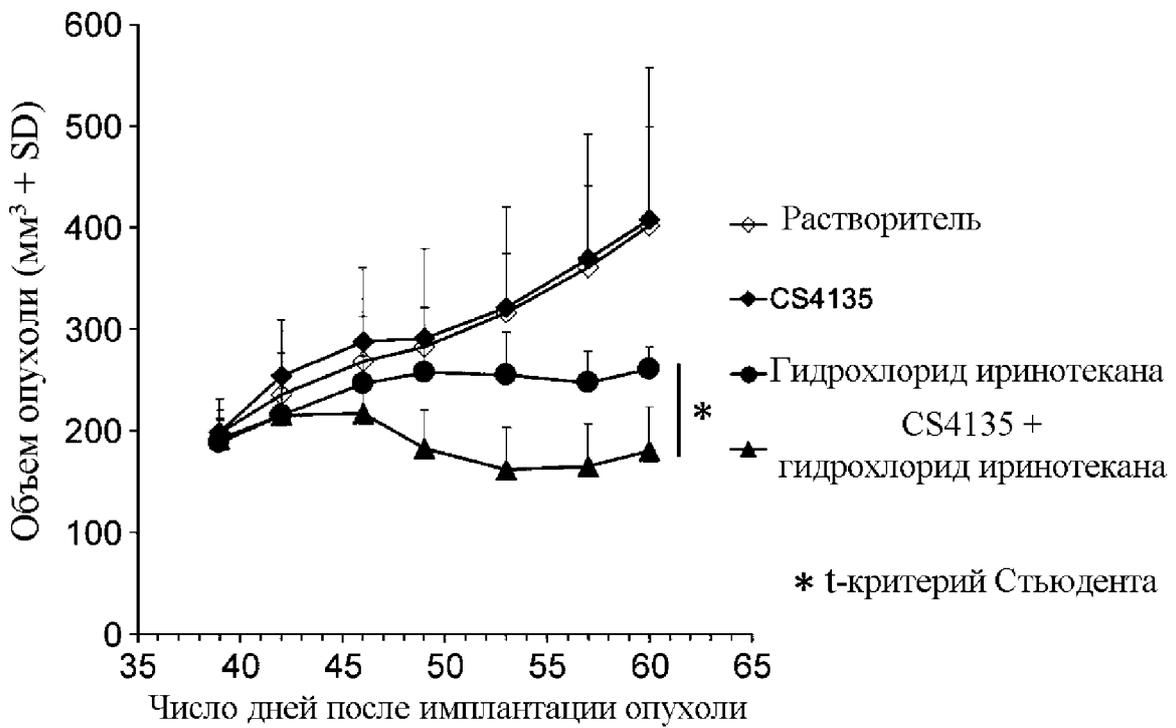
Фигура 19.



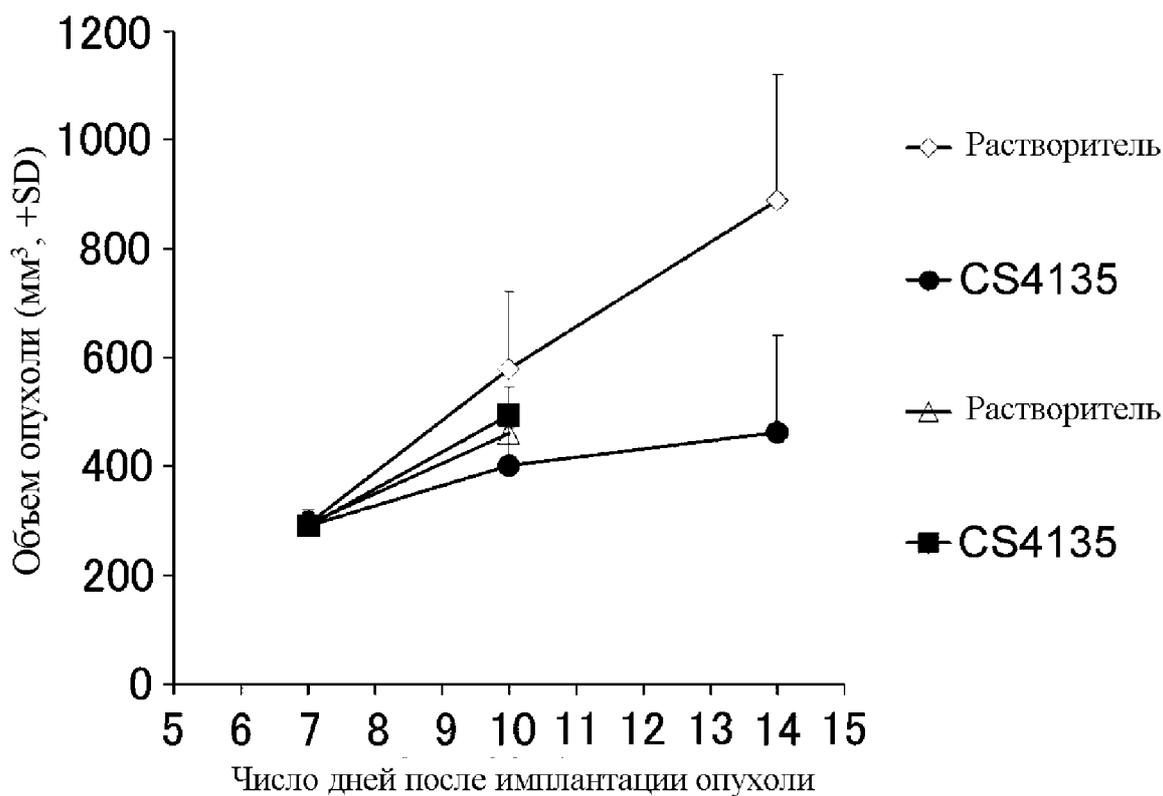
Фигура 20.



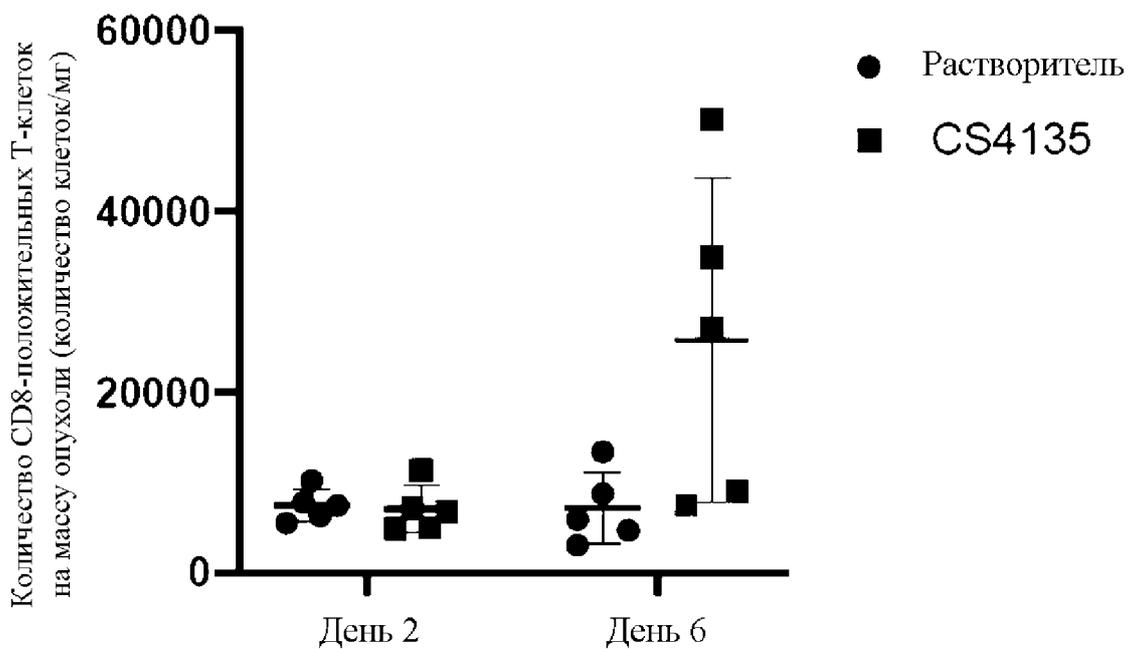
Фигура 21.



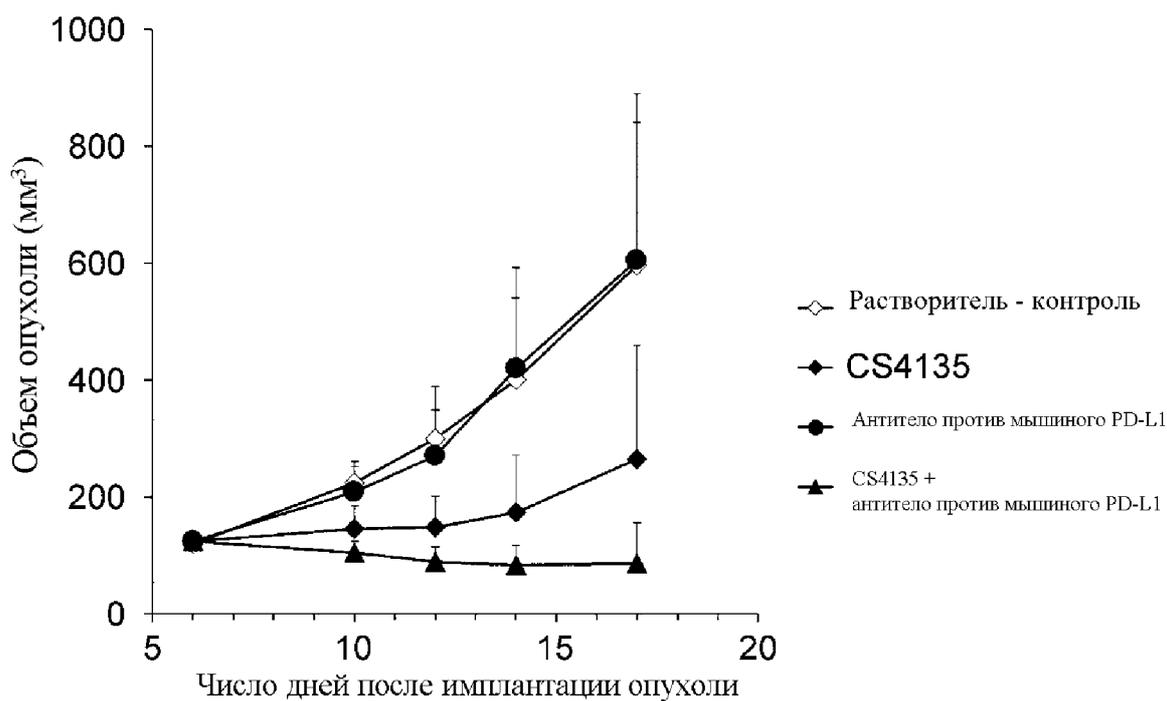
Фигура 22.



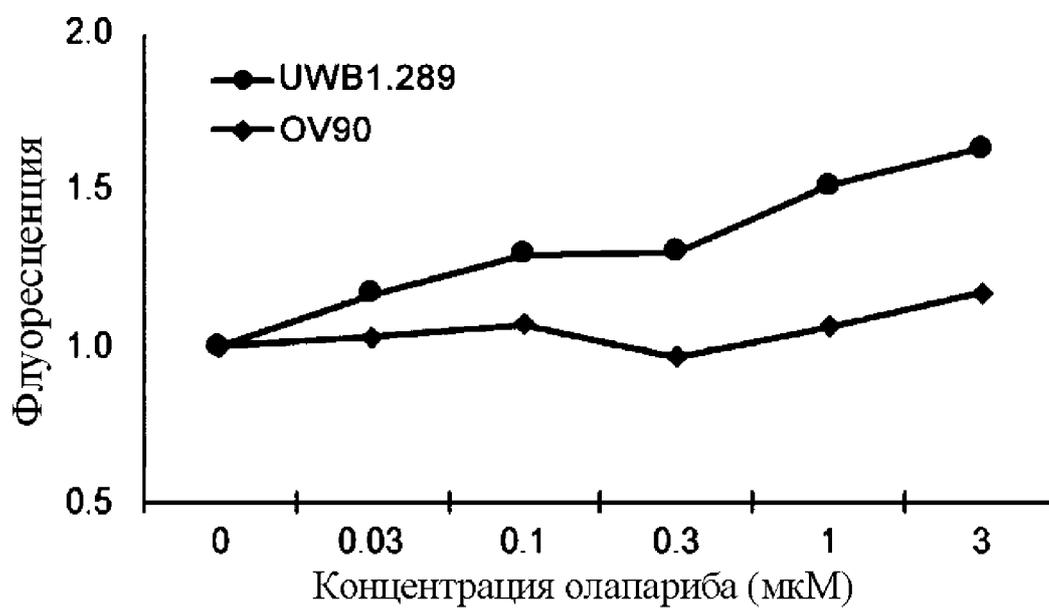
Фигура 23.



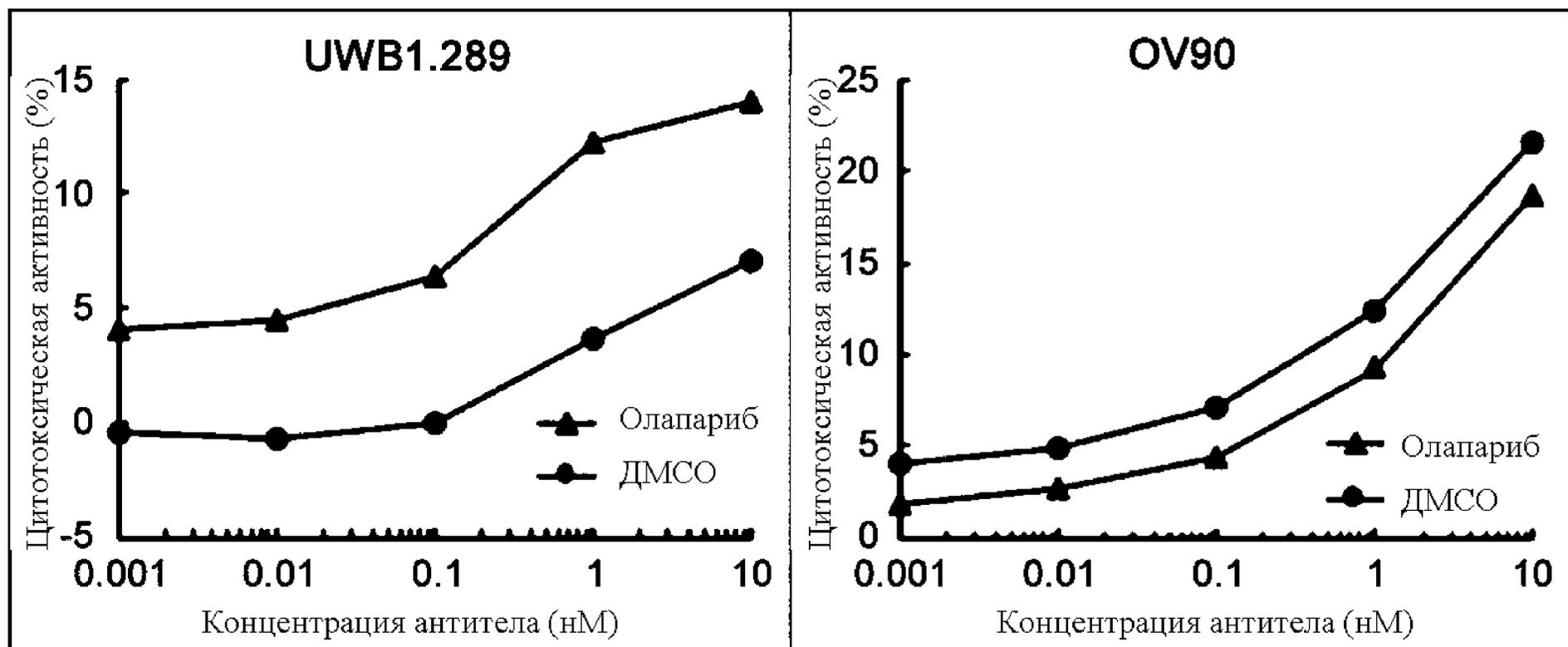
Фигура 24.



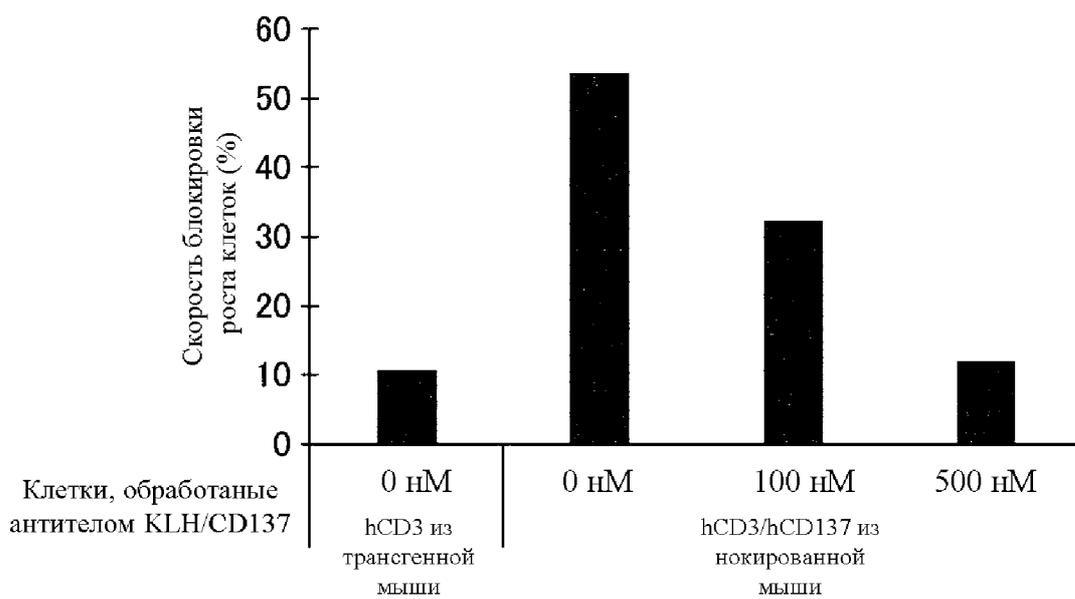
Фигура 25.



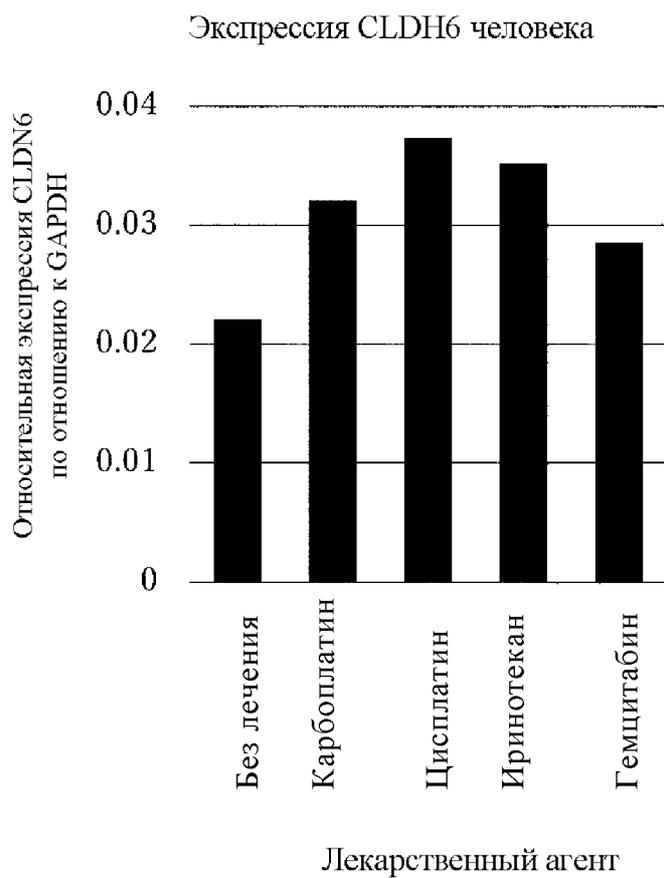
Фигура 26.



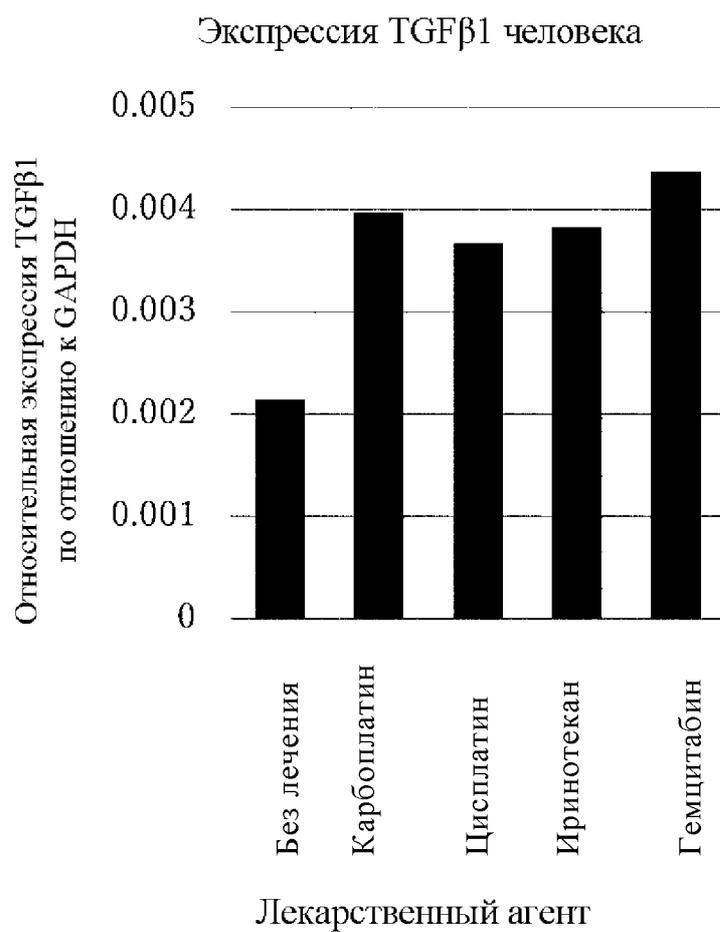
Фигура 27.



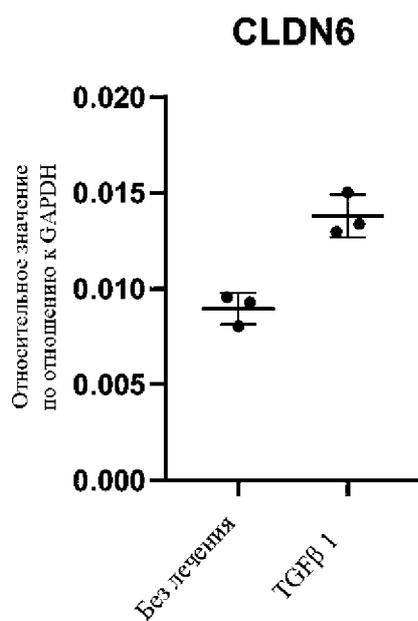
Фигура 28.



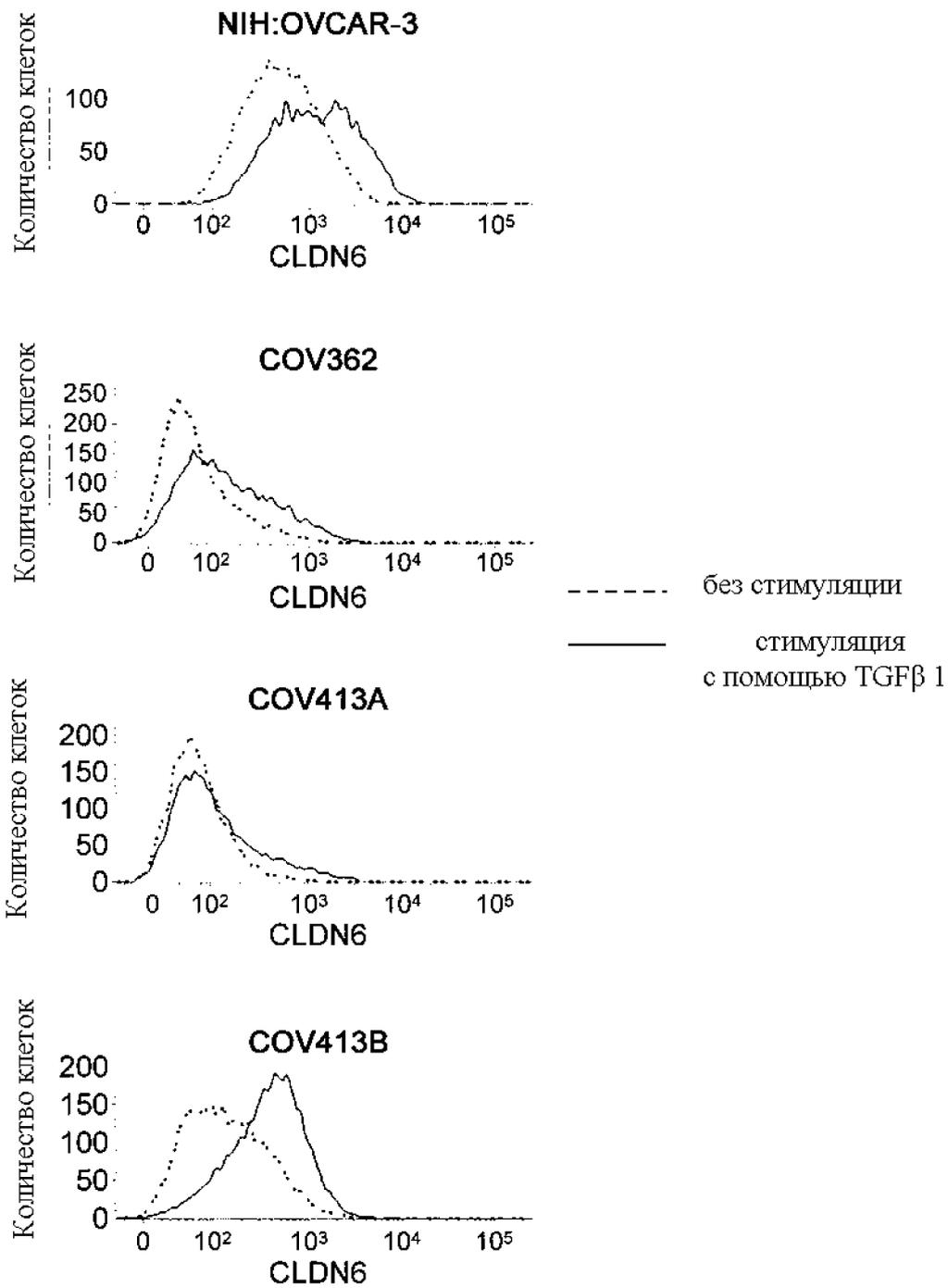
Фигура 29.



Фигура 30.



Фигура 31.



Фигура 32.