

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491596** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.08.08

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.12.22

(54) **САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ КОНЬЮГАЦИЯ АНТИТЕЛ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **21217585.5**

(32) **2021.12.23**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2022/087399**

(87) **WO 2023/118398 2023.06.29**

(71) Заявитель:

Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Хофер Керстин (DE), Мартин

Райнер Э. (CH), Мохамед Мохамед

Йосри Хассан, Эльшлегель Тобиас

(DE), Шумахер Феликс Франц (CH),

Села Татьяна (DE)

(74) Представитель:

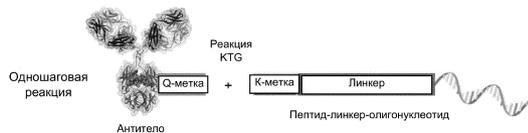
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,

Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов

А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,

Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к модифицированному антителу, содержащему тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь и/или легкая цепь содержит один или более первых сайтов распознавания трансглутаминазы *Kutzneria albida* (KalbTG) или ее функционально активного варианта. Один или более первых сайтов распознавания вводят в одно или более выбранных положений внутри тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела. Изобретение дополнительно относится к одной или более нуклеиновым кислотам, кодирующим модифицированное антитело по изобретению, а также к ковалентному конъюгату, содержащему: (i) модифицированное антитело по изобретению и (ii) один или более не относящихся к антителу фрагментов (полезная(ые) нагрузка(и)), ковалентно конъюгированных с одним или более первыми сайтами распознавания либо напрямую, либо через первый линкер. В некоторых вариантах осуществления не относящийся к антителу фрагмент содержит терапевтический компонент и необязательно второй линкер. Настоящее изобретение дополнительно относится к способу ковалентного конъюгирования модифицированного антитела по изобретению с не относящимися к антителу фрагментами. В случае, если не относящийся к антителу фрагмент содержит терапевтический компонент, настоящее изобретение дополнительно относится к конъюгату модифицированного антитела согласно изобретению и терапевтическому компоненту в виде фармацевтической композиции для применения в качестве лекарственного средства, а также для применения при лечении заболевания.



A1

202491596

202491596

A1

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ КОНЬЮГАЦИЯ АНТИТЕЛ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

5 Настоящее изобретение относится к области технологии антител, в частности к области конъюгатов антитело-лекарственное средство. В частности, изобретение направлено на модифицированные антитела, содержащие один или более искусственных сайтов распознавания трансглутаминазы *Kutzneria albida*, и конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие указанные модифицированные антитела.
10

Уровень техники

Фармацевтический препарат представляет собой химическое вещество, используемое для лечения, излечения или предотвращения заболевания. Его можно вводить несколькими путями, и многие фармацевтические препараты
15 можно вводить более чем одним путем. Типичные пути введения включают, без ограничения, инъекцию в виде раствора, суспензии или эмульсии (например, внутримышечную, внутривенную, внутрибрюшинную, внутриглазную, внутрикостную, подкожную или интрастекальную), перорально, ректально, сублингвально или местно. Очевидно, что фармацевтический препарат обычно
20 распространяется системно в организме пациента и может вызывать неблагоприятные явления ввиду своей активности в нежелательных областях. Другие области могут быть труднодоступными. Таргетная терапия направлена на преодоление этого недостатка путем использования фармацевтических препаратов, которые направляются на ту область тела, где они должны
25 действовать. Ожидается, что таргетная терапия будет более эффективной, чем традиционные нетаргетные формы лечения, и будет иметь меньше побочных эффектов.

Одним из способов направления терапевтического компонента к намеченному месту действия является его конъюгация с антителом,
30 специфически связывающимся с клетками-мишенями или тканями. Одной из проблем, связанных с конъюгатами антитело-лекарственное средство (ADC), такими как конъюгаты антитело-олигонуклеотиды (АОС), является их производство. В большинстве соединений лекарственного средства с антителом используются либо частично восстановленные межцепочечные дисульфидные

связи, обеспечивающие химию тиол-малеимида, либо функционализация лизина с использованием активированных сложных эфиров, либо искусственно введенные остатки цистеина. Эти способы приводят к получению статистических смесей видов конъюгированных антител с разным количеством лекарственных средств, прикрепленных к разным сайтам. Было показано, что в ADC с полезной нагрузкой монометилауристатина E, виды ADC с соотношением лекарственного средства к антителу (DAR) 4, 6 или 8, которые, как было продемонстрировано, становятся все более гидрофобными, были гораздо более склонны к агрегации, чем виды DAR2 (Adem et al.).

Поэтому желательно предоставить ADC, такие как AOC, для таргетной терапии с более точным контролем над количеством и местом прикрепления терапевтических компонентов. Тем самым должна быть повышена однородность ADC. Усовершенствованные технологии сайт-специфической конъюгации остаются объектом интереса многих фармацевтических компаний из-за их потенциального использования при получении терапевтических ADC, а также диагностических конъюгатов антитело-метка или антитело-фермент.

Микробная трансклутаминаза из *Streptomyces mobaraensis* стала недорогим и простым в использовании ферментом для сшивания белков, а также сайт-специфического мечения белков (Ando et al., 2014; Strop et al., 2013).

Открытие новой трансклутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) и идентификация соответствующих пептидных субстратов были описаны Steffen et al. (2017). KalbTG демонстрирует аналогичную эффективность, но улучшенную специфичность и возможность разработки по сравнению с ранее описанными микробными трансклутаминазами (мТГ).

В патенте США 2020/0249231 описаны система и способ идентификации и характеристики видов трансклутаминаз.

C-конец тяжелой цепи IgG был описан как подходящий сайт вставки Q-метки для мТГ для мечения антител (см., например, WO 2021/174091).

Сущность изобретения

Чтобы обойти вышеупомянутые недостатки, целью настоящего изобретения было идентифицировать сайты внутри молекулы IgG для включения мотива Q-метки, что приводило к улучшению свойств модифицированного антитела в отношении KalbTG-опосредованной конъюгации. Включение Q-метки не должно нарушать сворачивание или функцию антитела или уменьшать выход

экспрессии и должно обеспечивать необходимую доступность для конъюгации, а также терапевтическую активность терапевтического компонента. Успешная идентификация таких сайтов, согласно настоящему изобретению, позволяет включить один или более терапевтических фрагментов в молекулу IgG с определенной стехиометрией, а также контролируемым сайт-специфическим способом. Таким образом, можно получить более гомогенные конъюгатные продукты, например, уменьшая необходимые усилия по очистке и разделению и получая молекулы с более благоприятными свойствами, подобными лекарственным средствам. Кроме того, снижается риск нарушения связывания антитела с его антигеном в процессе конъюгации и/или конъюгированной полезной нагрузки.

Авторы настоящего изобретения наблюдали, среди прочего, повышенную агрегацию и гидрофобность при конъюгировании полезных нагрузок с С-концом тяжелой цепи IgG. Чтобы иметь возможность использовать KalbTG для получения конъюгатов антитело-лекарственное средство, полезных в качестве фармацевтических препаратов, Q-метку KalbTG необходимо ввести в определенный сайт в основной цепи IgG согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение относится к модифицированному антителу, содержащему тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь и/или легкая цепь содержит один или более первых сайтов распознавания трансглутаминазы *Kutzneria albida* (KalbTG) или ее функционально активного варианта. Один или более первых сайтов распознавания вводят в одно или более выбранных положений внутри тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела.

Одним из аспектов настоящего изобретения является модифицированное антитело, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь и/или легкая цепь содержит один или более первых сайтов распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных из положения 110 (LC110), положения 143 (LC143) и положения 214 (LC214) легкой цепи, и положения 118 (HC118), положения 177 (HC177), положения 297 (HC297), положения 341 (HC341) и положения 401 (HC401) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них. Соответственно, в модифицированном антителе по настоящему изобретению сайт распознавания KalbTG расположен внутри константных областей полипептида тяжелой цепи антитела, т.е. не на каком-либо N- или С-конце

тяжелой цепи антитела, и/или внутри или на С-конце константного домена легкой цепи антитела.

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело по
5 настоящему изобретению дополнительно содержит сайт распознавания KalbTG на С-конце или слит с ним, т.е. в положении 446 (НС446) или положении 447 (НС447) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату).

В контексте настоящего изобретения термин «вставка сайта
10 распознавания KalbTG в определенное положение» означает, что аминокислотный остаток, присутствующий в этом положении в немодифицированной аминокислотной последовательности соответствующей цепи антитела, либо заменен на сайт распознавания, т.е. сайт распознавания вставлен вместо аминокислотного остатка, или в одном предпочтительном варианте сайт распознавания вставлен непосредственно после этого положения в
15 аминокислотной последовательности, либо непосредственно, либо между двумя короткими гибкими линкерными пептидами, т.е. аминокислотный остаток сохраняется.

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения одно или более положений выбраны из
20 группы положений, включающей положение 214 (LC214) легкой цепи и положение 118 (НС118), положение 177 (НС177), положение 297 (НС297) и положение 341 (НС341) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату).

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения одно или более положений
25 выбраны из группы положений, включающей положение 214 (LC214) легкой цепи и положение 341 (НС341), положение 297 (НС297) и положение 177 (НС177) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату).

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит
30 две идентичные тяжелые цепи или Fc-области тяжелой цепи.

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит два, четыре или более (первых) сайтов распознавания трансклутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных из

положения 110 (LC110), положения 143 (LC143) и положения 214 (LC214) легкой цепи, и положения 118 (HC118), положения 177 (HC177), положения 297 (HC297), положения 341 (HC341) и положения 401 (HC401) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них.

5 В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело по изобретению содержит две разные тяжелые цепи или Fc-области антитела, при этом различие возникает, по меньшей мере, из-за соответствующих мутаций, индуцирующих гетеродимеризацию.

10 В некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело содержит один, два, три или более (первых) сайтов распознавания трансклутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных из положения 110 (LC110), положения 143 (LC143) и положения 214 (LC214) легкой цепи, и положения 118 (HC118), положения 177 (HC177),
15 положения 297 (HC297), положения 341 (HC341) и положения 401 (HC401) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них.

Аналогичным образом, настоящее изобретение относится к модифицированной Fc-области антитела, причем модифицированная Fc-область антитела содержит один или более (первых) сайтов распознавания
20 трансклутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных из группы положений, включающей положение 118 (HC118), положение 177 (HC177), положение 297 (HC297), положение 341 (HC341) и положение 401 (HC401) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них.

25 Соответственно, в модифицированной Fc-области антитела по настоящему изобретению сайт распознавания KalbTG расположен внутри константных областей полипептида Fc-области тяжелой цепи антитела, т.е. не на каком-либо конце. Кроме того, модифицированная Fc-область антитела по настоящему изобретению может включать дополнительный первый сайт распознавания
30 KalbTG в положении 446 (HC446) или положении 447 (HC447) тяжелой цепи, т.е. на С-конце (нумерация согласно Кабату). В контексте настоящего изобретения термин «вставка сайта распознавания KalbTG в определенное положение» означает, что аминокислота, присутствующая в этом положении в немодифицированной последовательности, либо заменена сайтом распознавания,

либо в одном предпочтительном варианте осуществления сайт распознавания дополнительно вставлен после этого положения, либо непосредственно, либо между двумя гибкими короткими линкерными пептидами.

5 В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения одно или более положений выбраны из группы положений, включающей положение 118 (НС118), положение 177 (НС177), положение 297 (НС297) и положение 341 (НС341) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату).

10 В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и варианта осуществления настоящего изобретения одно или более положений выбраны из группы положений, включающей положение 341 (НС341), положение 297 (НС297) и положение 177 (НС177) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату).

15 В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну (родственную) пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь содержит один (первый) сайт распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (НС297) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) или вставленный после
20 него.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну (родственную) пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь содержит один (первый) сайт
25 распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 177 (НС177) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело
30 содержит по меньшей мере одну (родственную) пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем легкая цепь содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 (LC214) легкой цепи (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну (родственную) пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь содержит два (первых) сайта распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (НС297) и положении 177 (НС177) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) или вставленных после них.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну (родственную) пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь содержит один (первый) сайт распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (НС297) тяжелой цепи или вставленный после него, а легкая цепь содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 (LC214) легкой цепи (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну (родственную) пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь содержит один (первый) сайт распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 177 (НС177) тяжелой цепи или вставленный после него, а легкая цепь содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 (LC214) легкой цепи (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и варианта осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну (родственную) пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь содержит два (первых) сайта распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (НС297) и положении 177 (НС177) тяжелой цепи или вставленных после них, а легкая цепь содержит один (первый) сайт распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 (LC214) легкой цепи (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит две (родственные) пары тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь первой пары содержит один (первый) сайт распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (HC297) тяжелой цепи или вставленный после него, а легкая цепь второй пары содержит один (первый) сайт распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 (LC214) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит две (родственные) пары тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь первой пары содержит один (первый) сайт распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 177 (HC177) тяжелой цепи или вставленный после него, а легкая цепь второй пары содержит один (первый) сайт распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 (LC214) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит две (родственные) пары тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь первой пары содержит один (первый) сайт распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (HC297) тяжелой цепи или вставленный после него, тяжелая цепь второй пары содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 177 (HC177) тяжелой цепи или вставленный после него, а легкая цепь второй пары содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 легкой цепи (LC214) (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит две (родственные) пары тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь первой пары содержит один (первый) сайт распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении

177 (HC177) тяжелой цепи или вставленный после него, тяжелая цепь второй пары содержит один (первый) сайт распознавания транsgлутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (HC297) тяжелой цепи или вставленный после него, а легкая цепь второй пары содержит один (первый) сайт распознавания транsgлутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 легкой цепи (LC214) (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит две (родственные) пары тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь первой пары содержит два (первых) сайта распознавания для транsgлутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (HC297) и положении 177 (HC177) тяжелой цепи или вставленных после них, а легкая цепь второй пары содержит один (первый) сайт распознавания для транsgлутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 (LC214) тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения сайт(ы) распознавания для транsgлутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) вставлен(ны) непосредственно после положения. В определенных вариантах осуществления сайт(ы) распознавания для транsgлутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) вставлен(ы) между двумя гибкими пептидными линкерами. В определенных вариантах осуществления сайт(ы) распознавания транsgлутаминазы *Kutzneria albida* (KalbTG) имеет(ют) аминокислотную последовательность GGGSYRYRQGGGS (SEQ ID NO: 25).

Изобретение дополнительно относится к одной или более нуклеиновым кислотам, кодирующим модифицированное антитело по изобретению, а также к ковалентному конъюгату, содержащему (i) модифицированное антитело по изобретению и (ii) один или более не относящихся к антителу фрагментов (полезная(ые) нагрузка(и)), ковалентно конъюгированных с одним или более первыми сайтами распознавания либо напрямую, либо через первый линкер. В некоторых вариантах осуществления не относящийся к антителу фрагмент содержит терапевтический компонент и необязательно второй линкер.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу ковалентного конъюгирования модифицированного антитела по изобретению с не

относящимися к антителу фрагментами. В случае, если не относящийся к антителу фрагмент содержит терапевтический компонент, настоящее изобретение дополнительно относится к конъюгату модифицированного антитела согласно изобретению и терапевтическому компоненту в виде фармацевтической композиции для применения в качестве лекарственного средства, а также для применения при лечении заболевания.

KalbTG катализирует образование изопептидной связи между боковой цепью глутамина (Gln, Q) и боковой цепью лизина (Lys, K). Образующаяся изопептидная связь представляет собой ϵ -(γ -глутамил)лизиновую связь/мостик. Образование ферментативной связи является ковалентным и, следовательно, в основном необратимым. YRYRQ (SEQ ID NO: 17) был идентифицирован как KalbTG Gln-содержащий мотив (Q-метка), тогда как RYESK (SEQ ID NO: 16) был идентифицирован как Lys-содержащий акцепторный мотив (K-метка).

Таким образом, настоящее изобретение охватывает по меньшей мере следующие варианты осуществления.

1. Модифицированное антитело, содержащее по меньшей мере тяжелую цепь антитела, при этом тяжелая цепь антитела содержит один, или два, или три, или четыре, или более первых сайтов распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 118 (HC118), положение 177 (HC177), положение 297 (HC297), положение 341 (HC341) и положение 401 (HC401) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них.

2. Модифицированное антитело, содержащее по меньшей мере легкую цепь антитела, при этом легкая цепь антитела содержит один, или два, или три, или четыре, или более первых сайтов распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 110 (LC110), положение 143 (LC143) и положение 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них.

3. Модифицированное антитело, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь и/или легкая цепь содержит один, или два, или три, или четыре, или более первых сайтов распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных

независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 110 (LC110), положение 143 (LC143) и положение 214 (LC214) легкой цепи антитела, и положение 118 (HC118), положение 177 (HC177), положение 297 (HC297), положение 341 (HC341) и положение 401 (HC401) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них.

4. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-3, в котором первый сайт распознавания KalbTG находится внутри аминокислотной последовательности соответствующей цепи антитела.

5. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-4, причем модифицированное антитело дополнительно содержит первый сайт распознавания KalbTG на С-конце тяжелой цепи антитела или слит с ним.

6. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-5, причем модифицированное антитело дополнительно содержит первый сайт распознавания KalbTG в положении 446 (HC446) или положении 447 (HC447) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату).

7. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-6, в котором одно, или два, или три, или четыре, или более положений выбраны независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 110 (LC110), положение 143 (LC143) и положение 214 (LC214) легкой цепи антитела и положение 118 (HC118), положение 177 (HC177), положение 297 (HC297) положение 341 (HC341) и положение 401 (HC401) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату).

8. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-7, в котором одно, или два, или три, или четыре, или более положений выбраны независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 214 (LC214) легкой цепи антитела и положение 118 (HC118), положение 177 (HC177), положение 297 (HC297) и положение 341 (HC341) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату).

9. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-8, в котором одно, или два, или три, или четыре, или более положений выбраны независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 214 (LC214) легкой цепи антитела и положение 341

(НС341), положение 297 (НС297) и положение 177 (НС177) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату).

10. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-9, в котором одно, или два, или три, или четыре, или более
5 положений выбраны независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 214 (LC214) легкой цепи антитела и положение 297 (НС297) и положение 177 (НС177) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату).

10 11. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-10, причем модифицированное антитело содержит четное количество первых сайта(ов) распознавания трансглутаминазы KalbTG в одном или более из положений, выбранных независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 110 (LC110), положение 143 (LC143) и положение 214 (LC214) легкой цепи антитела, и положение 118 (НС118),
15 положение 177 (НС177), положение 297 (НС297), положение 341 (НС341) и положение 401 (НС401) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них.

12. Модифицированное антитело по варианту осуществления 11, причем четное число равно двум, четырем, шести или восьми.

20 13. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 11-12, причем четное число равно двум или четырем.

14. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-13, причем модифицированное антитело содержит нечетное количество первых сайта(ов) распознавания трансглутаминазы KalbTG в одном
25 или более из положений, выбранных независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 110 (LC110), положение 143 (LC143) и положение 214 (LC214) легкой цепи антитела, и положение 118 (НС118), положение 177 (НС177), положение 297 (НС297), положение 341 (НС341) и положение 401 (НС401) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату),
30 или вставленных после них.

15. Модифицированное антитело по варианту осуществления 14, причем нечетное число равно одному, трем, пяти или семи.

16. Антитело по любому из вариантов осуществления 14-15, причем нечетное число равно одному или трем.

17. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-16, причем модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну родственную пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела.

5 18. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-17, в котором тяжелая цепь антитела содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 297 (HC297) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

10 19. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-18, в котором тяжелая цепь антитела содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

15 20. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-19, в котором легкая цепь антитела содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

20 21. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-20, в котором тяжелая цепь антитела содержит два первых сайта распознавания KalbTG в положении 297 (HC297) и положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленных после них.

25 22. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-20, в котором тяжелая цепь антитела содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 297 (HC297) тяжелой цепи антитела или вставленный после него, а легкая цепь антитела содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация по Кабату) или вставленный после него.

30 23. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-20, в котором тяжелая цепь антитела содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела или вставленный после него, а легкая цепь антитела содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация по Кабату) или вставленный после него.

24. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-20, в котором тяжелая цепь антитела содержит два первых

сайта распознавания KalbTG в положении 297 (HC297) и положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела или вставленных после них, а легкая цепь антитела содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация по Кабату) или вставленный после него.

25. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-24, причем модифицированное антитело содержит две пары тяжелой цепи антитела и родственную легкую цепь антитела.

26. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-25, причем:

(i) модифицированное антитело содержит две пары тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, при этом каждая из тяжелых цепей антитела и/или легких цепей антитела содержит один или более первых сайтов распознавания KalbTG, или

(ii) модифицированное антитело содержит две пары тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, при этом одна из тяжелых цепей антитела и/или легких цепей антитела содержит один или более первых сайтов распознавания KalbTG, или

(iii) модифицированное антитело содержит одну пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела и один дополнительный полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела, причем тяжелая цепь антитела и/или фрагмент Fc-области тяжелой цепи антитела или легкая цепь антитела содержит один или более первых сайтов распознавания KalbTG.

27. Модифицированное антитело по варианту осуществления 25, в котором тяжелая цепь антитела первой пары содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 297 (HC297) тяжелой цепи антитела или вставленный после него, а легкая цепь антитела второй пары содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

28. Модифицированное антитело по варианту осуществления 25, в котором тяжелая цепь антитела первой пары содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела или вставленный после него, а легкая цепь антитела второй пары содержит один

первый сайт распознавания KalbTG в положении 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

29. Модифицированное антитело по варианту осуществления 25, в котором тяжелая цепь антитела первой пары содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 297 (HC297) тяжелой цепи антитела или вставленный после него, тяжелая цепь антитела второй пары содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела или вставленный после него, а легкая цепь антитела второй пары содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

30. Модифицированное антитело по варианту осуществления 25, в котором тяжелая цепь антитела первой пары содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела или вставленный после него, тяжелая цепь антитела второй пары содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 297 (HC297) тяжелой цепи антитела или вставленный после него, а легкая цепь антитела второй пары содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

31. Модифицированное антитело по варианту осуществления 25, в котором тяжелая цепь антитела первой пары содержит два первых сайта распознавания KalbTG в положении 297 (HC297) и положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела или вставленный после него, а легкая цепь антитела второй пары содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

32. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-25, в котором обе тяжелые цепи антитела содержат один первый сайт распознавания KalbTG в положении 297 (HC297) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

33. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-25, в котором обе тяжелые цепи антитела содержат один первый сайт распознавания KalbTG в положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

34. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-25, в котором обе легкие цепи антитела содержат один первый сайт распознавания KalbTG в положении 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

5 35. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-25, в котором обе тяжелые цепи антитела содержат два первых сайта распознавания KalbTG в положении 297 (HC297) и положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленных после них.

10 36. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-25, в котором обе тяжелые цепи антитела содержат один первый сайт распознавания KalbTG в положении 297 (HC297) тяжелой цепи антитела или вставленный после него, а обе легкие цепи антитела содержат один первый сайт распознавания KalbTG в положении 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация по Кабату) или вставленный после него.

15 37. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-25, в котором обе тяжелые цепи антитела содержат один первый сайт распознавания KalbTG в положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела или вставленный после него, а обе легкие цепи антитела содержат один первый сайт распознавания KalbTG в положении 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация по Кабату) или вставленный после него.

20 38. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-25, в котором обе тяжелые цепи антитела содержат два первых сайта распознавания KalbTG в положении 297 (HC297) и положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела или вставленных после них, а обе легкие цепи антитела содержат один первый сайт распознавания KalbTG в положении 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация по Кабату) или вставленный после него.

25 39. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-38, причем модифицированное антитело содержит две идентичные тяжелые цепи антитела.

30 40. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-38, причем модифицированное антитело содержит две разные тяжелые цепи антитела.

41. Модифицированное антитело по варианту осуществления 40, причем различие возникает, по меньшей мере, из-за соответствующих мутаций, индуцирующих гетеродимеризацию.

42. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-41, причем модифицированное антитело содержит в дополнение к сайту(ам) распознавания KalbTG следующие мутации (нумерация согласно Кабату):

а) L234A, L235A в обоих полипептидах Fc-области;

б) P329G в обоих полипептидах Fc-области;

10 в) T366W в одном полипептиде Fc-области и T366S, L368A, Y407V в другом полипептиде Fc-области;

г) S354C в одном полипептиде Fc-области и Y349C в другом полипептиде Fc-области;

д) а) и б);

15 е) а), и б), и в); или

ж) а), и б), и в), и г).

43. Модифицированная Fc-область антитела, содержащая по меньшей мере один модифицированный полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела, при этом модифицированный полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела содержит один, или два, или три, или четыре, или более первых сайтов распознавания транскглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 118 (HC118), положение 177 (HC177), положение 297 (HC297), положение 341 (HC341) и положение 401 (HC401) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них.

44. Модифицированная Fc-область антитела по варианту осуществления 43, в которой первый сайт распознавания KalbTG находится внутри аминокислотной последовательности соответствующей цепи антитела.

45. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-44, причем модифицированный полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела дополнительно содержит первый сайт распознавания KalbTG на C-конце тяжелой цепи антитела или слит с ним.

46. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-45, причем модифицированный полипептид Fc-области

тяжелой цепи антитела содержит первый сайт распознавания KalbTG в положении 446 (НС446) или положении 447 (НС447) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату).

5 47. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-46, причем одно, или два, или три, или четыре, или более положений выбраны независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 118 (НС118), положение 177 (НС177), положение 297 (НС297) и положение 341 (НС341) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату).

10 48. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-47, причем одно, или два, или три, или четыре, или более положений выбраны независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 341 (НС341), положение 297 (НС297) и положение 177 (НС177) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату).

15 49. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 43-48, причем одно, или два, или три, или четыре, или более положений выбраны независимо друг от друга из группы положений, включающей 297 (НС297) и положение 177 (НС177) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату).

20 50. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-49, причем модифицированная Fc-область антитела содержит четное количество первых сайта(ов) распознавания транsgлутаминазы KalbTG в одном или более из положений, выбранных независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 118 (НС118), положение 177 (НС177),
25 положение 297 (НС297), положение 341 (НС341) и положение 401 (НС401) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них.

51. Модифицированная Fc-область антитела по варианту осуществления 50, причем четное число равно двум, четырем, шести или восьми.

30 52. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 49-50, причем четное число равно двум или четырем.

53. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-49, причем модифицированная Fc-область антитела содержит нечетное количество первых сайта(ов) распознавания транsgлутаминазы KalbTG

в одном или более из положений, выбранных независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 118 (НС118), положение 177 (НС177), положение 297 (НС297), положение 341 (НС341) и положение 401 (НС401) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них.

54. Модифицированная Fc-область антитела по варианту осуществления 53, причем нечетное число равно одному, трем, пяти или семи.

55. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 53-54, причем нечетное число равно одному или трем.

56. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-55, причем модифицированный полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 297 (НС297) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

57. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-56, причем модифицированный полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 177 (НС177) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

58. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-57, причем модифицированный полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела содержит два первых сайта распознавания KalbTG в положении 297 (НС297) и положении 177 (НС177) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленных после них.

59. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-58, причем модифицированная Fc-область антитела содержит два модифицированных полипептида Fc-области тяжелой цепи антитела по любому из вариантов осуществления 43-58.

60. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-58, причем модифицированная Fc-область антитела содержит два модифицированных полипептида Fc-области тяжелой цепи антитела, из которых один модифицированный полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 297 (НС297) тяжелой цепи антитела или вставленный после него, а другой

модифицированный полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела содержит один первый сайт распознавания KalbTG в положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

5 61. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-58, причем модифицированная Fc-область антитела содержит два модифицированных полипептида Fc-области тяжелой цепи антитела, из которых оба модифицированных полипептида Fc-области тяжелой цепи антитела содержат один первый сайт распознавания KalbTG в положении 297 (HC297) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после
10 него.

62. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-58, причем модифицированная Fc-область антитела содержит два модифицированных полипептида Fc-области тяжелой цепи антитела, из которых оба модифицированных полипептида Fc-области тяжелой цепи антитела
15 содержат один первый сайт распознавания KalbTG в положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленный после него.

63. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-58, причем модифицированная Fc-область антитела содержит
20 два модифицированных полипептида Fc-области тяжелой цепи антитела, из которых оба модифицированных полипептида Fc-области тяжелой цепи антитела содержат два первых сайта распознавания KalbTG в положении 297 (HC297) и положении 177 (HC177) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату) или вставленных после них.

25 64. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-63, причем модифицированная Fc-область антитела содержит два идентичных полипептида Fc-области тяжелой цепи антитела.

65. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-63, причем модифицированная Fc-область антитела содержит
30 два различных полипептида Fc-области тяжелой цепи антитела.

66. Модифицированная Fc-область антитела по варианту осуществления 65, причем различие возникает, по меньшей мере, из-за соответствующих мутаций, индуцирующих гетеродимеризацию.

67. Модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-66, причем модифицированный полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела содержит в дополнение к сайту(ам) распознавания KalbTG следующие мутации (нумерация согласно Кабату):

- 5 а) L234A, L235A в обоих полипептидах Fc-области;
 б) P329G в обоих полипептидах Fc-области;
 в) T366W в одном полипептиде Fc-области и T366S, L368A, Y407V в другом полипептиде Fc-области;
 г) S354C в одном полипептиде Fc-области и Y349C в другом
10 полипептиде Fc-области;
 д) а) и б);
 е) а), и б), и в); или
 ж) а), и б), и в), и г).

15 68. Модифицированное антитело, содержащее модифицированную Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 43-67.

69. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 1-68, причем первый(ые) сайт(ы) распознавания KalbTG содержит(ат) или имеет(ют) Gln-содержащий мотив длиной из пяти аминокислот.

20 70. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 1-69, причем первый(ые) сайт(ы) распознавания KalbTG независимо друг от друга выбран(ы) из группы первых сайтов распознавания, содержащих аминокислотные последовательности RYGQR (SEQ ID NO: 11), RWRQR (SEQ ID NO: 12), YRQRT (SEQ ID NO: 13),
25 IRQRQ (SEQ ID NO: 14), FRYRQ (SEQ ID NO: 15), YRYRQ (SEQ ID NO: 17) и RVRQR (SEQ ID NO: 18).

30 71. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 1-70, причем первый(ые) сайт(ы) распознавания KalbTG независимо друг от друга выбран(ы) из аминокислотных последовательностей YRYRQ (SEQ ID NO: 17) или RVRQR (SEQ ID NO: 18).

72. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 1-71, причем первый сайт распознавания KalbTG представляет собой YRYRQ (SEQ ID NO: 17).

73. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 1-72, причем сайт(ы) распознавания KalbTG вставлен(ы) после положения.

5 74. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 1-73, причем сайт(ы) распознавания KalbTG расположен(ы) между двумя гибкими пептидными линкерами.

10 75. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по варианту осуществления 74, причем каждый пептидный линкер независимо друг от друга содержит от 1 до 20 аминокислот.

76. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 74-75, причем каждый пептидный линкер независимо друг от друга содержит от 1 до 10 аминокислот.

15 77. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 74-76, причем каждый пептидный линкер независимо друг от друга содержит от 1 до 5 аминокислот.

20 78. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 74-77, причем указанные пептидные линкеры существенно не мешают функции Q-метки, KalbTG, укладке антитела и полезной нагрузке, которую необходимо присоединить к модифицированному антителу.

25 79. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 74-79, причем пептидные линкеры содержат в первую очередь или исключительно аминокислотные остатки Gly, и/или Ser, и/или Ala, и/или Thr, и/или Glu.

30 80. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 74-80, причем пептидные линкеры независимо друг от друга выбран(ы) из группы пептидного линкера, содержащей GGGP (SEQ ID NO: 20), ESGS (SEQ ID NO: 21), APAP (SEQ ID NO: 22), KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 23) и EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 24)

81. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 74-80, причем пептидные

линкеры независимо друг от друга состоят в основном или полностью из Gly и Ser.

82. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 74-81, причем пептидные линкеры представляют собой $(Gly_mSer)_n$ с $m = 1, 2, 3$ или 4 и $n = 1, 2, 3, 4$ или 5, где m и n выбраны независимо друг от друга.

83. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по варианту осуществления 82, причем $m=3$ и $n=1$.

84. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из вариантов осуществления 74-83, причем пептидные линкеры содержат одну, или две, или три, или четыре или пять повторяющихся единиц, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly-Ser ($n=1, 2, 3, 4, 5$; SEQ ID NO: 19)

85. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по варианту осуществления 84, причем пептидный линкер содержит одну повторяющуюся единицу с аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Ser ($n=1$; SEQ ID NO: 19).

86. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-85, причем модифицированное антитело содержит один, или два, или три, или четыре Fab-фрагмента.

87. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-86, причем модифицированное антитело представляет собой моновалентное моноспецифическое антитело, содержащее одну полноразмерную легкую цепь антитела и одну полноразмерную тяжелую цепь антитела, образующие пару родственной легкой цепи антитела - тяжелой цепи и один полипептидный фрагмент Fc-области тяжелой цепи антитела, включающий шарнирную область, связанную с Fc-областью тяжелой цепи полноразмерного антитела.

88. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-87, причем модифицированное антитело основано на константной области тяжелой цепи Ig человека.

89. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-88, причем модифицированное антитело основано на

константной области тяжелой цепи IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека или IgG4 человека.

5 90. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-89, причем модифицированное антитело основано на полипептиде тяжелой цепи IgG1 человека и имеет аминокислотную последовательность константной области, которая является на 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, 99% или более или до 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или 2.

10 91. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-89, причем модифицированное антитело основано на полипептиде тяжелой цепи IgG2 человека и имеет аминокислотную последовательность константной области, которая является на 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, 15 99% или более или до 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3.

20 92. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-89, причем модифицированное антитело основано на полипептиде тяжелой цепи IgG3 человека и имеет аминокислотную последовательность константной области, которая является на 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, 99% или более или до 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4.

25 93. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-89, причем модифицированное антитело основано на полипептиде тяжелой цепи IgG4 человека и имеет аминокислотную последовательность константной области, которая является на 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, 99% или более или до 100% идентичной аминокислотной последовательности, 30 представленной в SEQ ID NO: 5.

94. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-89, причем модифицированное антитело содержит константную область тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 01,

A⁺STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSS⁺GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYN⁺STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 5 KALPAPIEKTISKAKG⁺QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPPVLDSD⁺GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPG⁺⁺,

при этом в одном или более положениях или после них, обозначенных
 «⁺», вставлен первый сайт распознавания KalbTG, и

10 при этом после положения, обозначенного «⁺⁺», первый сайт
 распознавания KalbTG вставлен только в том случае, если дополнительный
 первый сайт распознавания KalbTG вставлен в одно из положений,
 обозначенных «⁺».

95. Модифицированное антитело по любому из вариантов
 15 осуществления 1-89, причем модифицированное антитело содержит
 константную область тяжелой цепи антитела с аминокислотной
 последовательностью SEQ ID NO: 02,

A⁺STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSS⁺GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
 20 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYN⁺STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKG⁺QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSD⁺GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPG⁺⁺,

25 при этом в одном или более положениях или после них, обозначенных
 «⁺», вставлен первый сайт распознавания KalbTG, и

при этом после положения, обозначенного «⁺⁺», первый сайт
 распознавания KalbTG вставлен только в том случае, если дополнительный
 первый сайт распознавания KalbTG вставлен в одно из положений,
 30 обозначенных «⁺».

96. Модифицированное антитело по любому из вариантов
 осуществления 1-89, причем модифицированное антитело содержит
 константную область тяжелой цепи антитела с аминокислотной
 последовательностью SEQ ID NO: 03,

A⁺STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSS⁺GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTVKRC
 CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVQFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQFN⁺STFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
 5 PAPIEKTISKTKG⁺QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTTPMLDS
 D⁺GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G⁺⁺,

при этом в одном или более положениях или после них, обозначенных
 «⁺», вставлен первый сайт распознавания KalbTG, и

10 при этом после положения, обозначенного «⁺⁺», первый сайт
 распознавания KalbTG вставлен только в том случае, если дополнительный
 первый сайт распознавания KalbTG вставлен в одно из положений,
 обозначенных «⁺».

97. Модифицированное антитело по любому из вариантов
 15 осуществления 1-89, причем модифицированное антитело содержит
 константную область тяжелой цепи антитела с аминокислотной
 последовательностью SEQ ID NO: 04,

A⁺STKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSS⁺GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTP
 20 LGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYN⁺STFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KTKG⁺QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENN
 YNTTPMLDSD⁺GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSL
 25 SPG⁺⁺,

при этом в одном или более положениях или после них, обозначенных
 «⁺», вставлен первый сайт распознавания KalbTG, и

при этом после положения, обозначенного «⁺⁺», первый сайт
 распознавания KalbTG вставлен только в том случае, если дополнительный
 30 первый сайт распознавания KalbTG вставлен в одно из положений,
 обозначенных «⁺».

98. Модифицированное антитело по любому из вариантов
 осуществления 1-89, причем модифицированное антитело содержит

константную область тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 05,

A⁺STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSS⁺GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVSPNM
 5 VPHANNAQAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQFN⁺STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG⁺QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTPPVLDSD⁺GSAFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN
 NYTQKSLSLSL G⁺⁺,

10 при этом в одном или более положениях или после них, обозначенных «⁺», вставлен первый сайт распознавания KalbTG, и

при этом после положения, обозначенного «⁺⁺», первый сайт распознавания KalbTG вставлен только в том случае, если дополнительный первый сайт распознавания KalbTG вставлен в одно из положений,
 15 обозначенных «⁺».

99. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-98, причем модифицированное антитело содержит аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи антитела, которая является на 75% или более, 80% или более, 85% или более,
 20 90% или более, 95% или более, 97% или более, 99% или более или до 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 34.

100. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-99, причем модифицированное антитело содержит константную область тяжелой цепи антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.
 25

101. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-99, причем модифицированное антитело содержит константную область тяжелой цепи антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.
 30

102. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-99, причем модифицированное антитело содержит константную область тяжелой цепи антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

103. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-102, причем модифицированное антитело основано на легкой цепи каппа- или лямбда-антитела человека и имеет аминокислотную последовательность константной области легкой цепи антитела, которая является на 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, 99% или более или до 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6 или 7.

104. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-89, причем модифицированное антитело содержит аминокислотную последовательность константной области, которая является на 75% или более, например 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, 99% или более или до 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10:

105. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-104, причем модифицированное антитело содержит константную область легкой цепи антитела с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 06,

RTV⁺AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE⁺AKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC⁺,

при этом в одном или более положениях или после них, обозначенных «⁺», вставлен первый сайт распознавания KalbTG.

106. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-104, причем модифицированное антитело содержит константную область легкой цепи антитела с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 07,

QPK⁺AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA⁺VTVAWKADSSPV
KAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT
EC⁺S

при этом в одном или более положениях или после них, обозначенных «⁺», вставлен первый сайт распознавания KalbTG.

107. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-106, причем модифицированное антитело содержит

константную область легкой цепи антитела, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

108. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит (i) немодифицированный константный домен легкой цепи антитела, аминокислотная последовательность которого является по меньшей мере на 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100 % идентичной аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 6 или 7; или (ii) немодифицированную константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-5.

109. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит:

а) немодифицированный константный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 6 или 7; и

б) модифицированную константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-5, причем вставлен по меньшей мере один сайт распознавания KalbTG.

110. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит:

а) модифицированный константный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 6 или 7, причем вставлен по меньшей мере один сайт распознавания KalbTG; и

б) немодифицированную константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-5.

111. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит:

а) константный домен легкой цепи антитела, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или 7; и

б) модифицированную константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

112. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит:

а) константный домен легкой цепи антитела, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или 7; и

б) модифицированную константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

113. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит:

а) константный домен легкой цепи антитела, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или 7; и

б) модифицированную константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34.

114. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит:

а) модифицированный константный домен легкой цепи антитела, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является

на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и

б) константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по
5 меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-5.

115. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит:

а) модифицированный константный домен легкой цепи антитела, который
10 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и

б) константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит или
15 состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-5.

116. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит:

а) модифицированный константный домен легкой цепи антитела, который
20 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и

б) константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит или
25 состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-5.

117. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит:

а) модифицированный константный домен легкой цепи антитела, который
30 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и

б) модифицированную константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая

является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

118. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит:

5 а) модифицированный константный домен легкой цепи антитела, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и

10 б) модифицированную константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

119. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит:

15 а) модифицированный константный домен легкой цепи антитела, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и

20 б) модифицированную константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34.

120. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит:

25 а) модифицированный константный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; и

б) модифицированную константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

121. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит:

30 а) модифицированный константный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; и

б) модифицированную константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

122. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-107, причем модифицированное антитело содержит:

а) модифицированный константный домен легкой цепи антитела, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; и

5 б) модифицированную константную область тяжелой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

123. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-122, причем модифицированное антитело связывается с антигеном.

10 124. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-123, причем модифицированное антитело специфически связывается со структурой, позволяющей преодолевать гематоэнцефалический барьер.

125. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-124, причем модифицированное антитело специфически связывается с рецептором, индуцирующим рецептор-опосредованный эндоцитоз.

126. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-125, причем модифицированное антитело специфически связывается с антигеном, выбранным из группы антигенов, состоящей из рецептора трансферрина 1 человека (TfR1), рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 человека (IGF-1R), белка 1, родственного рецептору липопротеинов низкой плотности человека (LRP1), и белка 8, родственного рецептору липопротеинов низкой плотности человека (LRP8).

127. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-126, причем модифицированное антитело специфически связывается с рецептором 1 трансферрина человека.

128. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-127, причем модифицированное антитело специфически связывается с одним или двумя антигенами, и указанный один или два антигена является/являются специфичным(ми) для определенного типа клеток.

129. Модифицированное антитело по варианту осуществления 128, причем один или оба антигена представляют собой опухолевый маркер, специфичный для опухолевой клетки.

130. Модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 128-129, причем тип клеток представляет собой клетку рака молочной железы.

131. Ковалентный конъюгат, содержащий:

5 (i) модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-130, и

(ii) один или более не относящихся к антителу доменов, ковалентно конъюгированных с одним или более первыми сайтами распознавания KalbTG модифицированного антитела (i),

10 причем не относящийся к антителу домен содержит второй сайт распознавания KalbTG.

132. Ковалентный конъюгат по варианту осуществления 131, в котором не относящийся к антителу фрагмент представляет собой терапевтический фрагмент, содержащий терапевтический компонент и необязательно второй линкер.

133. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-132, в котором не относящийся к антителу домен содержит:

(i) терапевтический компонент,

20 (ii) второй сайт распознавания KalbTG, который комплементарен первому сайту распознавания, присутствующему в модифицированном антителе, т.е. в случае, если модифицированное антитело содержит Q-метку, не относящийся к антителу домен содержит K-метку или наоборот, особенно если второй сайт распознавания содержит или имеет Lys-содержащий мотив, особенно последовательность RYESK (SEQ ID NO: 16) (K-метка), и

25 (iii) необязательно второй линкер между терапевтическим компонентом и вторым сайтом распознавания.

134. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-133, в котором второй сайт распознавания KalbTG представляет собой K-метку, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности пептидной последовательности RYESK (SEQ ID NO: 16).

135. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-134, в котором терапевтический компонент представляет собой нуклеиновую кислоту.

136. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-135, в котором терапевтический компонент представляет собой ДНК, или РНК, или их смесь.

5 137. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-136, в котором терапевтический компонент представляет собой некодирующую молекулу РНК.

138. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-137, в котором терапевтический компонент представляет собой некодирующую молекулу РНК длиной 15-24 пары оснований.

10 139. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-138, в котором терапевтический компонент содержит один или более остатков запертой нуклеиновой кислоты (LNA).

15 140. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-139, в котором терапевтический компонент представляет собой олигонуклеотид LNA, смешанный с остатками ДНК или РНК.

141. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-140, в котором терапевтический компонент представляет собой миРНК или антисмысловой олигонуклеотид.

20 142. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-141, в котором терапевтический компонент выбран из группы, включающей антисмысловые олигонуклеотиды, включающие нуклеотиды LNA, токсины, небольшие органические молекулы и иммуномодуляторы.

25 143. Ковалентный конъюгат по варианту осуществления 142, в котором небольшая органическая молекула имеет молекулярную массу 2500 Дальтон или менее.

144. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 142-143, в котором небольшая органическая молекула имеет молекулярную массу 1000 Дальтон или менее.

30 145. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-144, в котором второй линкер представляет собой алкильный линкер, или полиэтиленовый линкер, или пептидный линкер, или их смесь.

146. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-145, в котором второй линкер содержит звенья этиленгликоля.

147. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-146, в котором второй линкер содержит приблизительно 2-50 звеньев этиленгликоля.

5 148. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-147, в котором второй линкер содержит алифатическую углеродную цепь.

149. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-148, в котором второй линкер может содержать незамещенный или замещенный C_{1-6} алкил, причем в случае замещенного C_{1-6} алкила заместители
10 выбраны из группы, состоящей из алкокси, ацила, ацилокси, алкоксикарбонила, карбонилалкокси, ациламино, амино, аминаоцила, аминакарбониламино, аминакарбонилокси, циклоалкила, циклоалкенила, циано, азидо, галогена, гидроксила, нитро, карбоксила, тиола, тиоалкила, алкила, алкенила, алкинила, гетероциклила, аминосульфонила, сульфониламино, сульфонила и оксо.

150. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления
15 131-145, в котором второй линкер представляет собой пептидный линкер.

151. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-150, причем конъюгат содержит модифицированное антитело согласно
любому из вариантов осуществления 1-130 и одну или более терапевтических
нуклеиновых кислот, при этом каждая терапевтическая нуклеиновая кислота
20 связана с одной Q-меткой посредством изопептидной связи и, необязательно, амидной связи с концевым остатком K-метки через второй линкер.

152. Ковалентный конъюгат по варианту осуществления 151, в котором одна или более терапевтических нуклеиновых кислот представляют собой
антисмысловой(ые) олигонуклеотид(ы).

25 153. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 151-152, в котором второй линкер содержит одно или более звеньев этиленгликоля.

154. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-153, в котором не относящийся к антителу домен содержит терапевтический
30 компонент, содержащий РНК или LNA для лечения или предупреждения заболевания головного мозга и необязательно линкер ПЭГ.

155. Ковалентный конъюгат по варианту осуществления 154, причем заболевание головного мозга представляет собой болезнь Паркинсона или
болезнь Альцгеймера.

156. Способ ковалентного конъюгирования модифицированного антитела по любому из вариантов осуществления 1-130 с терапевтическим компонентом, причем способ включает:

5 а) предоставление модифицированного антитела по любому из вариантов осуществления 1-130,

10 б) предоставление не относящегося к антителу домена, причем не относящийся к антителу домен содержит: (i) терапевтический компонент, (ii) второй сайт распознавания KalbTG, который комплементарен первому сайту распознавания, присутствующему в модифицированном антителе, предоставленном в пункте (i), и (iii) необязательно второй линкер между терапевтическим компонентом и вторым сайтом распознавания KalbTG; и

15 в) инкубирование модифицированного антитела из а) и не относящегося к антителу домена из б) в присутствии KalbTG или его функционально активного варианта или фрагмента и, образование таким образом изопептидной связи между первым и вторым сайтом распознавания KalbTG,

и конъюгирование таким образом модифицированного антитела с терапевтическим компонентом.

20 157. Способ по варианту осуществления 156, в котором шаг в) выполняют в условиях, способствующих активности KalbTG.

158. Способ по любому из вариантов осуществления 156-157, в котором первый сайт распознавания KalbTG имеет аминокислотную последовательность YRYRQ (SEQ ID NO: 17).

25 159. Способ по любому из вариантов осуществления 156-158, в котором второй сайт распознавания KalbTG имеет аминокислотную последовательность RYESK (SEQ ID NO: 16).

30 160. Модифицированное антитело, модифицированная Fc-область, ковалентный конъюгат и способ по любому из вариантов осуществления 1-159, причем KalbTG содержит аминокислотную последовательность (трехбуквенный код)

Met His Lys Trp Phe Leu Arg Ala Ala Val Val Ala Ala Val Gly Phe Gly Leu Pro Thr Leu Ile Ala Thr Thr Ala Gln Ala Ala Ala Val Ala Ala Pro Thr Pro Arg Ala Pro Leu Ala Pro Pro Leu Ala Glu Asp Arg Ser Tyr Arg Thr Trp Arg Val Glu Asp Tyr Val Glu Ala Trp Glu Arg Tyr His Gly Arg Glu Met Thr Glu Asp Glu Arg Glu Asn

Leu Ala Arg Gly Cys Ile Gly Val Thr Val Val Asn Leu Asn Arg Glu Asp Leu Ser Asn
 Pro Pro Leu Asn Leu Ser Phe Gly Ser Leu Arg Thr Ala Glu Ala Val Gln Ala Ala Leu
 Asn Lys Ile Val Asp Thr His Pro Ser Pro Ala Gln Tyr Glu Ala Ala Val Ala Lys Asp
 Pro Ile Leu Lys Arg Leu Lys Asn Val Val Lys Ala Leu Pro Ser Trp Ile Asp Ser Ala
 5 Lys Leu Lys Ala Ser Ile Phe Ser Lys Arg Phe Tyr Ser Trp Gln Asn Pro Asp Trp Ser
 Glu Glu Arg Ala His Thr Thr Tyr Arg Pro Asp Arg Glu Thr Asp Gln Val Asp Met Ser
 Thr Tyr Arg Tyr Arg Ala Arg Pro Gly Tyr Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Asp Gln
 Asp Thr Asn Thr Trp Trp His Ala Asn His Glu Glu Pro Arg Met Val Val Tyr Gln Ser
 Thr Leu Arg His Tyr Ser Arg Pro Leu Gln Asp Phe Asp Glu Gln Val Phe Thr Val Ala
 10 Phe Ala Lys Lys Asp (SEQ ID NO: 31).

161. Фармацевтическая композиция, содержащая ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-155 и 160.

162. Ковалентный конъюгат по любому из вариантов осуществления 131-155 и 160 или полученный в соответствии со способом по любому из
 15 вариантов осуществления 156-160 для применения в качестве лекарственного средства.

163. Применение по варианту осуществления 162, причем применение представляет собой лечение неврологического заболевания или заболевания головного мозга или рака.

164. Применение по любому из вариантов осуществления 162-163, причем неврологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из
 20 нейропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, заболевания глаз, судорожного расстройства, лизосомальной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии,
 25 поведенческого расстройства, воспаления ЦНС, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, рассеянного склероза, CD20-положительного рака с метастазами в головной мозг и HER2-положительного рака с метастазами в головной мозг.

165. Применение по любому из вариантов осуществления 162-164, причем неврологическое заболевание выбрано из нейропатического
 30 расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, заболевания глаз, судорожного расстройства, лизосомальной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, поведенческого расстройства и воспаления ЦНС.

166. Применение по любому из вариантов осуществления 162-165, причем применение предназначено для лечения болезни Альцгеймера или болезни Паркинсона или рака молочной железы.

5 167. Нуклеиновая кислота или композиция на основе нуклеиновых кислот, кодирующая модифицированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-130.

168. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту или композицию на основе нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 167.

10 169. Способ получения модифицированного антитела по любому из вариантов осуществления 1-130, включающий следующие шаги:

- культивирование клетки по варианту осуществления 168,

- извлечение модифицированного антитела из клетки и/или среды для культивирования, и получение таким образом модифицированного антитела по любому из вариантов осуществления 1-130.

15 170. Способ по варианту осуществления 169, в котором клетка представляет собой клетку млекопитающего.

171. Способ по любому из вариантов осуществления 169-170, в котором клетка представляет собой клетку СНО.

20 **Подробное описание конкретных вариантов осуществления изобретения**

Изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии того, что Q-метка не может быть включена во все сайты внутри антитела, такого как антитело IgG1, с сопутствующей пригодностью для конъюгации с полезной нагрузкой. Области константного домена антитела были проверены на предмет конъюгации посредством KalbTG. В этом контексте Q-метки KalbTG были вставлены в экспонированные на поверхности меж- и внутридоменные гибкие петли внутри константных областей тяжелой и легкой цепи IgG1 человека, а также на С-конце соответствующей тяжелой и легкой цепи. Всего было протестировано 9 различных участков тяжелой и легкой цепей IgG1. Мотив Q-метки KalbTG был вставлен между двумя гибкими линкерами или внутри них в виде аминокислотной последовательности GGGs-YRYRQ-GGGs (SEQ ID NO: 25). Чтобы продемонстрировать общую применимость результатов, дополнительно были протестированы пять антител с различной специфичностью связывания (от mAt-1 до mAt-5). Эти молекулы с одиночными вставками сайта

распознавания KalbTG оценивали по уровню экспрессии. Результаты представлены в примерах и таблице 1.

Таблица 1. Выход экспрессии различных антител с Q-метками, вставленными в разные положения.

выход в масштабе [мг] → положение Q-метки ↓	мАт-1 (CD163)		мАт-2 (HER2)		мАт-3 (LeY)	
	24 мл	1 л	24 мл	1 л	24 мл	1 л
дикий тип, т.е. без Q-метки (эталон)	4,7	196	4,3	179	0,4	17
НС118	7,5	313	2,5	104	1,0	42
НС177	7,3	304	2,6	108	1,5	63
НС297	7,7	321	2,9	121	1,6	67
НС341	6,4	267	3,4	142	1,7	71
НС401	4,5	188	2,7	113	1,0	42
НС446	4,3	179	2,8	117	1,3	54
LC110	1,7	70,8	3,0	125	0,4	17
LC143	0,7	29,2	1,1	46	0,4	17
LC214	3,3	138	2,5	104	0,5	21

5

Видно, что в зависимости от места вставки титр экспрессии менялся, т.е. снижался или даже улучшался, что было совершенно неожиданным.

Модифицированные антитела были дополнительно проверены на конъюгацию и доступность Q-метки для ферментативной модификации с помощью KalbTG. Были протестированы две разные полезные нагрузки: небольшая молекула (флуоресцентный краситель) и небольшая одноцепочечная нуклеиновая кислота. В случае, если антитело является симметричным, т.е. содержит две идентичные пары тяжелой и легкой цепей, на молекулу присутствовало две Q-метки. В случае, если антитело является асимметричным, т.е. содержит две разные пары тяжелых и легких цепей, на молекулу присутствовала одна Q-метка. Таким образом, соотношение лекарственного средства к антителу (DAR, т.е. количество молекул полезной нагрузки на молекулу антитела), равное 2, ожидалось при 100% эффективности конъюгации для симметричного антитела, а DAR, равное 1, ожидалось при 100%

15

эффективности конъюгации для асимметричного антитела. Результаты для флуоресцентного красителя в случае мАт-5 показаны в таблице 2.

Таблица 2. Эффективность конъюгации флуоресцентного красителя с антителом мАт-5 с Q-метками в различных положениях

конъюгация эффективность [DAR] → положение Q-метки ↓	мАт-5 (mTfR) DAR (ХГВ)
НС118	1,8
НС177	1,8
НС297	1,7
НС341	1,8
НС401	2,0
LC110	1,4
LC143	1,3
LC214	1,5

5

Результаты для одноцепочечной нуклеиновой кислоты длиной 15 нуклеотидов в случае мАт-1 и 2 и длиной 20 нуклеотидов в случае мАт-4 показаны в таблице 3 (определено с помощью ХГВ и УФВ-СС).

Таблица 3. Эффективность конъюгации нуклеиновой кислоты, состоящей из 15 или 20 нуклеотидов, с разными антителами с Q-метками в различных положениях

конъюгация эффективность [DAR2] → положение Q- метки ↓	мАт-1 (CD163)	мАт-2 (HER2)		мАт-4 (TfR)
	(ХГВ)	(ХГВ)	(УФВ-СС)	(ХГВ)
НС118	1,5	1,9	1,8	н.о.
НС177	2,0	1,9	1,8	н.о.
НС297 асимметричное симметричное	н.о. 2,0	н.о. 1,9	н.о. 1,7	0,9 1,9
НС341	2,0	1,8	1,8	н.о.
НС401	1,9	1,8	1,7	н.о.
НС446 асимметричное	н.о.	н.о.	н.о.	0,9

10

конъюгация эффективность [DAR2] → положение метки ↓ Q-	мАт-1 (CD163)	мАт-2 (HER2)		мАт-4 (TfR)
	(ХГВ)	(ХГВ)	(УФВ-СС)	(ХГВ)
симметричное	2,0	1,9	1,8	1,8
LC110	2,0	1,8	1,7	н.о.
LC143	1,9	1,9	1,7	н.о.
LC214 асимметричное симметричное	н.о. 2,0	н.о. 1,8	н.о. 1,7	1,0 н.о.

н.о. = не определено

мАт-1 и мАт-2 конъюгировали одноэтапным методом; мАт-4 конъюгировали двухэтапным методом (сначала с К-меткой, а затем с К-меткой с нуклеиновой кислотой с использованием Click химической конъюгации). Тем самым показана общая применимость способа согласно настоящему изобретению с использованием антитела согласно настоящему изобретению, т.е. способ не зависит от специфичности связывания антитела, а также от технологии, используемой для конъюгирования полезной нагрузки с К-меткой, то есть либо напрямую, либо последовательно.

Для мАт-2 в качестве примера пять разных Q-меток, RYGQR (SEQ ID NO: 11), RWRQR (SEQ ID NO: 12), YRQRT (SEQ ID NO: 13), IRQRQ (обе Q могут быть изменены; SEQ ID NO: 14) и FRYRQ (SEQ ID NO: 15), каждая была введена в три разные положения, т.е. HC297, HC446 и LC143. Результаты по выходу экспрессии (1 л, мкг/мл) и конъюгации (DAR; ХГВ/УФВ-СС) показаны в таблице 4.

Таблица 4. Выходы экспрессии и эффективность конъюгации модифицированных антител с различными Q-метками

положение Q-метки → Последовательность Q-метки ↓	НС297		НС446		LC143	
	выход	конъюгация эффективность	выход	конъюгация эффективность	выход	конъюгация эффективность
RYGQR (SEQ ID NO: 11)	90	1,6/1,5	144	1,8/1,7	42	0,7/0,6
RWRQR (SEQ ID NO: 12)	136	1,7/1,6	114	1,8/1,7	12,2	1,1/0,8

положение Q-метки → Последовательность Q-метки ↓	НС297		НС446		LC143	
	выход	конъюгация эффективность	выход	конъюгация эффективность	выход	конъюгация эффективность
YRQRT (SEQ ID NO: 13)	102	1,7/1,7	0	н.о.	28	1,8/1,7
IRQRQ (SEQ ID NO: 14)	132	3,1/3,1	124	2,8/2,8	44	2,6/2,2
FRYRQ (SEQ ID NO: 15)	136	1,6/1,7	62	1,5/1,3	22	1,7/1,7

н.о. = не определено

Кроме того, с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (ХГВ) была проведена биофизическая характеристика модифицированного антитела, конъюгированного с одноцепочечной нуклеиновой кислотой, состоящей из 15 нуклеотидов и 20 нуклеотидов соответственно. Это показано в качестве примера для мАт-2 (15 нуклеотидов) в Таблице 5 и на Фигуре 1. Гидрофильный маркер имел время удерживания 9,25 мин. а гидрофобный маркер имел относительное время удерживания 25,9 мин. (мАт-2).

Таблица 5. Время удерживания модифицированных антител, конъюгированных с нуклеиновой кислотой, состоящей из 15 нуклеотидов (мАт-2) и 20 нуклеотидов (мАт-4).

относительное время удержания → положение Q- метки ↓	мАт-2 (HER2)		мАт-4 (TfR)	
	не конъюгировано	конъюгировано с нуклеиновой кислотой	не конъюгировано	конъюгировано с нуклеиновой кислотой
мАт-2 (дт) (эталон)	0,246	н.о.	0,023	н.о.
НС118	0,311	0,685	н.о.	н.о.
НС177	0,221	0,647	н.о.	н.о.
НС297 асимметричное симметричное	н.о. 0,233	н.о. 0,446	0,023 0,070	0,472 0,670
НС341	0,269	0,566	н.о.	н.о.
НС401	0,247	0,634	н.о.	н.о.
НС446 асимметричное симметричное	н.о. 0,215	н.о. 0,745	0,015 0,001	0,845 0,994

относительное время удержания → положение Q-метки ↓	МАТ-2 (HER2)		МАТ-4 (TfR)	
	не конъюгировано	конъюгировано с нуклеиновой кислотой	не конъюгировано	конъюгировано с нуклеиновой кислотой
LC110	0,402	0,732	н.о.	н.о.
LC143	0,291	0,691	н.о.	н.о.
LC214	0,246	0,501	0,020	0,556

5 Таким образом, авторы изобретения успешно идентифицировали ряд сайтов вставки Q-метки KalbTG, охватывающих всю длину основной цепи IgG, которые не оказывают негативного влияния на выход экспрессии и позволяют/обеспечивают доступность фермента.

10 Подходящие сайты вставки с точки зрения выхода экспрессии и ферментативной доступности Q-метки находятся, таким образом, в положениях 110 (LC110), 143 (LC143) и 214 (LC214) легкой цепи и положениях 118 (HC118), 177 (HC177), 297 (HC297), 341 (HC341) и 401 (HC401) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату).

15 Кроме того, были определены фармакокинетические параметры модифицированного антитела, конъюгированного с одной или двумя одноцепочечными нуклеиновыми кислотами соответственно, посредством анализа *in vivo* с использованием трансгенных мышей с FcRn человека. Эти результаты показаны в Таблице 6.

Таблица 6. Определены скорости клиренса конъюгатов антитело-нуклеиновая кислота.

Сайт конъюгации	Клиренс часть антитела (мл/день/кг) [CV]	Клиренс часть ASO (мл/день/кг) [CV]
без - дикий тип эталон	23 [4,7%]	-
HC118 - DAR 1	83,2 [11,9%]	241 [7,8%]
HC177 - DAR 1	20,6 [17,4%]	92,1 [14,4%]
HC 295 - DAR 1	10,8 [25,3%]	117 [15,4%]
HC297 - DAR 1	14,4 [15,5%]	85,7 [9,7%]
HC341 - DAR 1	33,9 [3,9%]	231 [7,9%]
HC401 - DAR 1	29,4 [8,2%]	166 [21,8%]
HC446 - DAR 1	46,2 [13,4%]	279 [4,6%]

Сайт конъюгации	Клиренс часть антитела (мл/день/кг) [CV]	Клиренс часть ASO (мл/день/кг) [CV]
LC214 - DAR 1	23,9 [4%]	105 [15,4%]
HC297 - DAR 2	28,6 [14,5%]	145 [15,2%]
HC431 - DAR 2	214 [20,3%]	219 [4,8%]
HC446 - DAR 2	152 [29,7%]	190 [14,7%]

Таким образом, предпочтительные сайты вставки с точки зрения ФК-свойств для Q-метки находятся в положениях 214 (LC214) легкой цепи и положениях 177 (HC177) и 297 (HC297) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату).

Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к модифицированному антителу, содержащему тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь и/или легкая цепь содержат один или более первых сайтов распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных из положения 110 (LC110), положения 143 (LC143) и положения 214 (LC214) легкой цепи, и положения 118 (HC118), положения 177 (HC177), положения 297 (HC297), положения 341 (HC341) и положения 401 (HC401) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU Кабату), или вставленных после них. Соответственно, в модифицированном антителе по настоящему изобретению сайт распознавания KalbTG расположен внутри константных областей полипептида тяжелой цепи Ig, т.е. не на каком-либо конце, и/или внутри или на С-конце константного домена легкой цепи Ig. Кроме того, модифицированное антитело по настоящему изобретению может включать дополнительный первый сайт распознавания KalbTG в положении 446 (HC446) тяжелой цепи, т.е. на С-конце. В контексте вставки сайта распознавания KalbTG в положение означает, что аминокислота, присутствующая в этом положении в немодифицированной последовательности, либо заменена сайтом распознавания, либо сайт распознавания предпочтительно дополнительно вставлен после этого положения.

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения одно или более положений выбраны из группы положений, включающей положение 214 (LC214) легкой цепи и положение 118 (HC118), положение 177 (HC177), положение 297 (HC297) и

положение 341 (НС341) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату).

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения одно или более положений выбраны из группы положений, включающей положение 214 (LC214) легкой цепи и положение 341 (НС341), положение 297 (НС297) и положение 177 (НС177) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату).

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения одно или более положений выбраны из группы положений, включающей положение 214 (LC214) легкой цепи и положение 297 (НС297) и положение 177 (НС177) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату).

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело, согласно изобретению, содержит две идентичные тяжелые цепи или Fc-области тяжелой цепи. В дополнительных вариантах осуществления модифицированное антитело содержит один, два, три или более (первых) сайтов распознавания трансклутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных из положения 110 (LC110), положения 143 (LC143) и положения 214 (LC214) легкой цепи и положения 118 (НС118), положения 177 (НС177), положения 297 (НС297) положения 341 (НС341) и положения 401 (НС401) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату), или вставленных после них.

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело по изобретению содержит две разные тяжелые цепи, при этом различие возникает из-за соответствующих мутаций, индуцирующих гетеродимеризацию. В дополнительных вариантах осуществления такое модифицированное антитело содержит один, два или более (первых) сайтов распознавания трансклутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из идентичных или разных положений, выбранных из положения 110 (LC110), положения 143 (LC143) и положения 214 (LC214) легкой цепи и положения 118 (НС118), положения 177 (НС177), положения 297 (НС297) положения 341 (НС341) и положения 401

(НС401) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату).

Аналогичным образом, настоящее изобретение относится к модифицированной Fc-области антитела, содержащей Fc-область тяжелой цепи, причем Fc-область тяжелой цепи содержит один или более (первых) сайтов распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных из группы положений, включающей положение 118 (НС118), положение 177 (НС177), положение 297 (НС297), положение 341 (НС341) и положение 401 (НС401) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU Кабату), или вставленных после них. Соответственно, в модифицированной Fc-области антитела по настоящему изобретению сайт распознавания KalbTG расположен внутри константных областей полипептида Fc-области тяжелой цепи Ig, т.е. не на каком-либо конце. Кроме того, модифицированная Fc-область антитела по настоящему изобретению может включать дополнительный первый сайт распознавания KalbTG в положении 446 (НС446) тяжелой цепи, т.е. на С-конце. В контексте вставки сайта распознавания KalbTG в положение означает, что аминокислота, присутствующая в этом положении в немодифицированной последовательности, либо заменена сайтом распознавания, либо сайт распознавания предпочтительно дополнительно вставлен после этого положения.

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения одно или более положений выбраны из группы положений, включающей положение 118 (НС118), положение 177 (НС177), положение 297 (НС297) и положение 341 (НС341) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату).

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения одно или более положений выбраны из группы положений, включающей положение 341 (НС341), положение 297 (НС297) и положение 177 (НС177) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату).

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения одно или более положений выбраны из группы положений, включающей положение 297 (НС297) и

положение 177 (НС177) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату).

5 В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну (родственную) пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь содержит один (первый) сайт распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG), в положении 297 (НС297) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату).

10 В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну (родственную) пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь содержит один (первый) сайт распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG), в положении 177 (НС177) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату).

20 В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну (родственную) пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем легкая цепь содержит один (первый) сайт распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG), в положении 214 (LC214) легкой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату).

25 В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну (родственную) пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь содержит два (первых) сайта распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (НС297) и положении 177 (НС177) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату).

30 В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну (родственную) пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь содержит один (первый) сайт

распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (HC297) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату), а легкая цепь содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 (LC214) легкой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации по Кабату).

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну (родственную) пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 177 (HC177) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату), а легкая цепь содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 (LC214) легкой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации по Кабату).

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну (родственную) пару тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь содержит два (первых) сайта распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (HC297) и положении 177 (HC177) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату), а легкая цепь содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 (LC214) легкой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации по Кабату).

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере две (родственные) пары тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь первой пары содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (HC297) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату), а легкая цепь второй пары содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 (LC214) легкой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации по Кабату).

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит по меньшей мере две (родственные) пары тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь первой пары содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 177 (HC177) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату), а легкая цепь второй пары содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 (LC214) легкой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации по Кабату).

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит две (родственные) пары тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь первой пары содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (HC297) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату), тяжелая цепь второй пары содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 177 (HC177) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату), а легкая цепь второй пары содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 (LC214) легкой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации по Кабату).

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело содержит две (родственные) пары тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь первой пары содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 177 (HC177) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату), тяжелая цепь второй пары содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (HC297) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату), а легкая цепь второй пары содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214

(LC214) легкой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации по Кабату).

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело
5 содержит по меньшей мере две (родственные) пары тяжелой цепи антитела и легкой цепи антитела, причем тяжелая цепь первой пары содержит два (первых) сайта распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 297 (HC297) и в положении 177 (HC177) тяжелой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации EU по Кабату), а легкая цепь
10 второй пары содержит один (первый) сайт распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в положении 214 (LC214) легкой цепи (нумерация аминокислот соответствует схеме нумерации по Кабату).

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения сайт(ы) распознавания для
15 трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) вставлен(ны) непосредственно после положения. В определенных вариантах осуществления сайт(ы) распознавания для трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) вставлен(ы) между двумя гибкими линкерами. В определенных вариантах осуществления сайт(ы) распознавания трансглутаминазы *Kutzneria albida* (KalbTG) имеет(ют)
20 аминокислотную последовательность GGGSYRYRQGGGS (SEQ ID NO: 25).

Термины «антитело» и «Ig» взаимозаменяемо используют в данном документе. Они используются в самом широком смысле и включают, например, моноклональные антитела, независимые от специфичности связывания (включая агонисты, антагонисты, нейтрализующие антитела, полноразмерные или
25 интактные моноклональные антитела), моновалентные антитела, например полноразмерные антитела, лишенные одного Fab), антитела, которые представляют собой двух- или четырехвалентные мультиспецифические антитела и фрагменты полноразмерных антител, при условии, что они содержат по меньшей мере одну из модификаций, описанных выше.

30 Природные антитела образуются путем сборки только тяжелых цепей (например, антитела V_HH только с тяжелой цепью) или тяжелых и легких цепей (например, антитела IgG дикого типа). Каждая тяжелая цепь состоит из четырех доменов: переменного домена (V_H) и трех константных доменов (C_H1, C_H2 и C_H3). Они соединены гибкой шарнирной областью. Легкая цепь состоит из

вариабельного домена (VL) и константного домена (CL). В случае присутствия тяжелой и легкой цепей легкая цепь соединяется с родственной тяжелой цепью, т.е. Fab-фрагментом тяжелой цепи, содержащим домены VH и CH1, с образованием сайтов связывания антитела. Соответствующие Fab-фрагменты легкой цепи и тяжелой цепи вместе обозначаются как Fab-фрагмент. Домены тяжелой цепи CH2 и CH3 вместе обозначаются как полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела. Один полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела димеризуется с дополнительным полипептидом Fc-области тяжелой цепи антитела, например от тяжелой цепи второго антитела с образованием Fc-области. Fc-область соединена с Fab-фрагментом(ами) через гибкую шарнирную область. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела в дополнение к доменам CH2 и CH3 дополнительно содержит всю или часть шарнирной области. Шарнирная область содержит несколько дисульфидных мостиков, которые ковалентно связывают вместе два полипептида Fc-области тяжелой цепи антитела. В Fab-фрагменте легкая цепь и тяжелая цепь Fab-фрагмента также соединены одним дисульфидным мостиком. Однако связь между подклассами IgG различается. Общая структура полноразмерных IgG напоминает Y-образную форму, при этом Fc-область образует основу, а два Fab-фрагмента образуют плечи и доступны для связывания с антигеном.

Внутри вариабельных доменов находятся петли, называемые определяющими комплементарность областями (CDR). Они главным образом ответственны за прямое взаимодействие антитела с его антигеном. Из-за значительной вариабельности числа аминокислот в этих CDR существует несколько схем нумерации вариабельных областей. В контексте настоящего документа аминокислотные положения всех константных областей и доменов тяжелой и легкой цепи пронумерованы в соответствии с системой нумерации по Кабату, описанной в Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), и называемой в данном документе «нумерацией согласно Кабату». В частности, систему нумерации по Кабату (см. страницы 647-660) в Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) используют для константного домена легкой цепи CL изотипа каппа или лямбда, а систему нумерации по индексу EU по Кабату

(см. страницы 661-723) используют для константных доменов тяжелой цепи (CH1, шарнирная область, CH2 и CH3, что в таком случае дополнительно подчеркивается в данном документе названием «нумерация в соответствии с индексом EU по Кабату»).

5 Термин «модифицированное антитело», используемый в данном документе, обозначает антитела или Fc-области антитела согласно изобретению, содержащие по меньшей мере одну (искусственную) внутреннюю Q-метку (в
10 желаемом сайте). Модифицированные антитела включают, помимо прочего, синтетические антитела, моноклональные антитела, рекомбинантные антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), гуманизированные антитела, верблюдизированные антитела, химерные антитела, внутритела, антиидиотипические (анти-ид) антитела, антитела, содержащие
15 только тяжелые цепи, и их функциональные фрагменты. Термин «функциональный фрагмент» относится к части интактного антитела, которая сохраняет некоторую или всю антигенсвязывающую активность антитела, из которого получен этот фрагмент. Неограничивающие примеры функциональных фрагментов антитела включают Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, F(ab)2-фрагменты, F(ab')2-фрагменты и т.д. В частности, модифицированные антитела согласно изобретению включают молекулы антител и иммунологически активные
20 части молекул антител, например, антигенсвязывающие домены или молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном (например, одну или более определяющих комплементарность областей (CDR)) при условии, что присутствует модификация согласно изобретению. Модифицированные антитела, предложенные в данном документе, могут быть
25 любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY, в некоторых вариантах осуществления IgG), любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, в одном предпочтительном варианте осуществления IgG1) или любой подкласс (например, IgG2a и IgG2b). Антитело может быть гуманизированным, химерным и/или с созревшей аффинностью, а также антителом других видов,
30 например, мыши, кролика и овцы.

В соответствии с настоящим изобретением в определенных вариантах осуществления модифицированное антитело содержит по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь. Соответственно, модифицированное антитело в определенных вариантах осуществления

содержит один, два, три или четыре Fab-фрагмента. В определенных вариантах осуществления модифицированное антитело представляет собой моновалентное моноспецифическое антитело, содержащее одну (полноразмерную) легкую цепь и одну (полноразмерную) тяжелую цепь, образующие родственную пару легкая цепь-тяжелая цепь, и один фрагмент Fc-области тяжелой цепи, включающий шарнирную область, связанную с Fc-областью (полноразмерной) тяжелой цепи.

В соответствии с настоящим изобретением в некоторых вариантах осуществления модифицированное антитело может быть основано на антителе IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, в частности, гуманизованном антителе мыши, кролика или овцы. Типичные и подходящие последовательности приведены ниже, причем в аннотации «X⁺» «X» обозначает аминокислотный остаток/положение, а «⁺» указывает сайты вставки мотивов Q-метки (с линкерными последовательностями или без них):

Константная область тяжелой цепи человека подкласса IgG1 (G1m1,17 – европеоидный аллотип): (SEQ ID NO: 1)

A⁺STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSS⁺GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYN⁺STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKG⁺QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDS⁺GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG⁺

Константная область тяжелой цепи человека подкласса IgG1 (G1m17 – афро-американский аллотип): (SEQ ID NO: 2)

A⁺STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSS⁺GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYN⁺STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKG⁺QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTPPVLDS⁺GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG⁺

Константная область тяжелой цепи человека подкласса IgG2:(SEQ ID NO:

3)

A⁺STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSS⁺GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKRC
 5 CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQFNN⁺STFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
 PAPIEKTISKTKG⁺QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTPPMLDSD⁺GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
 NYTQKSLSLSPG⁺

10 Константная область тяжелой цепи человека подкласса IgG3:(SEQ ID NO:

4)

A⁺STKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSS⁺GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTP
 LGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
 15 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNN⁺STFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
 KTKG⁺QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENN
 YNTTPPMLDSD⁺GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCFSVMHEALHNRFTQKSLSL
 SPG⁺

20 Константная область тяжелой цепи человека подкласса IgG4: (SEQ
 ID NO: 5)

A⁺STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSS⁺GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVSPNM
 VPHANHAQAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
 25 WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNN⁺STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
 LPSSIEKTISKAKG⁺QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTPPVLDSDD⁺GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHN
 NYTQKSLSLSLG⁺

30 Таким образом, в некоторых вариантах осуществления константная
 область тяжелой цепи модифицированного антитела согласно изобретению
 основана на константной области тяжелой цепи Ig человека, например,
 константной области тяжелой цепи IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека
 или IgG4 человека. В определенных вариантах осуществления константная

область тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну Q-метку согласно изобретению.

В определенных вариантах осуществления полипептид тяжелой цепи IgG1 человека, на котором может быть основано модифицированное антитело согласно изобретению, включает аминокислотную последовательность константной области, которая является на 75% или более, например 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, 99% или более и до 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или 2. В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления изобретения модифицированное антитело согласно изобретению основано на антителе IgG1 и, таким образом, представляет собой модифицированное/вариантное антитело IgG1. В определенных вариантах осуществления полипептид тяжелой цепи IgG2 человека, на котором может быть основано модифицированное антитело согласно изобретению, включает аминокислотную последовательность константной области, которая является на 75% или более, например 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, 99% или более и до 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3. В определенных вариантах осуществления полипептид тяжелой цепи IgG3 человека, на котором может быть основано модифицированное антитело согласно настоящему изобретению, включает аминокислотную последовательность константной области, которая является на 75% или более, например 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, 99% или более и до 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4. В определенных вариантах осуществления полипептид тяжелой цепи IgG4 человека, на котором может быть основано модифицированное антитело согласно настоящему изобретению, включает аминокислотную последовательность константной области, которая является на 75% или более, например 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, 99% или более и до 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5.

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело, согласно

изобретению, содержит в дополнение к вставленному сайту распознавания KalbTG согласно настоящему изобретению следующие дополнительные мутации (нумерация согласно Кабату):

- а) L234A, L235A в обоих полипептидах Fc-области;
- 5 б) P329G в обоих полипептидах Fc-области;
- в) T366W в одном полипептиде Fc-области и T366S, L368A, Y407V в другом полипептиде Fc-области;
- г) S354C в одном полипептиде Fc-области и Y349C в другом полипептиде Fc-области;
- 10 д) а) и б);
- е) а), и б), и в); или
- ж) а), и б), и в), и г).

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело, согласно изобретению, содержит в первом полипептиде Fc-области мутации L234A, L235A, P329G, T366W, а во втором полипептиде Fc-области мутации L234A, L235A, P329G, T366S, L368A, Y407V. В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело дополнительно содержит одну из мутаций S354C и Y349C в первом полипептиде Fc-области, а другую во втором полипептиде Fc-области.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело по изобретению основано на полипептиде тяжелой цепи человека и имеет аминокислотную последовательность константной области, которая является на 75% или более, например 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, 99% или более и до 100% идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 34:

30 HC177 (SEQ ID NO: 34)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV
HTFPAVLQSSGGGSGYRYRQGGGSLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNL

Константный домен легкой цепи каппа человека (SEQ ID NO: 6)

RTV⁺AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREE⁺AKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC⁺

5 Константный домен легкой цепи лямбда человека (SEQ ID NO: 7)

QPK⁺AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAA⁺VTVAWKADSSPV
KAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS

SYSCQVTHEGSTVEKTVAPT
EC⁺S

10 В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов
осуществления настоящего изобретения полипептид легкой цепи человека, на
котором может быть основано модифицированное антитело согласно
изобретению включает аминокислотную последовательность константной
области, которая является на 75% или более, например, 80% или более, 85% или
более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, 99% или более и до 100%
15 идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID
NO: 6 или 7.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и
вариантов осуществления настоящего изобретения полипептид легкой цепи
человека модифицированного антитела по настоящему изобретению имеет
20 аминокислотную последовательность константной области, которая является на
75% или более, например 80% или более, 85% или более, 90% или более, 95%
или более, 97% или более, 99% или более и до 100% идентичной
аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10:

LC214 (SEQ ID NO: 10)

25 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGECGGGSYRQRGGGS

30 Предпочтительно, немодифицированный константный домен легкой цепи
содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей
мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной
последовательности любой из SEQ ID NO: 6 или 7; или при этом
немодифицированная константная область тяжелой цепи содержит
аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере

96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-5.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело согласно настоящему изобретению содержит

а) немодифицированный константный домен легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 6 или 7; и

б) модифицированную константную область тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-5, причем вставлен по меньшей мере один сайт распознавания KalbTG.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело согласно настоящему изобретению содержит:

а) модифицированный константный домен легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 6 или 7, где встроен по меньшей мере один сайт распознавания KalbTG; и

б) немодифицированную константную область тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-5.

Также предпочтительно, что константный домен легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; ли при этом константная область тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или

99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или 9, или 34.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело согласно настоящему изобретению содержит: а) константный домен легкой цепи, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и б) модифицированную константную область тяжелой цепи, которая содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является на по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%, в частности, на 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или 9, или 34.

Как подробно описано выше, модифицированное антитело, согласно изобретению, может представлять собой би- или мультиспецифическое антитело. Типичные би- или мультиспецифические антитела включают:

- полноразмерное антитело с заменой домена: мультиспецифическое антитело IgG, содержащее первый Fab-фрагмент и второй Fab-фрагмент, причем первый Fab-фрагмент содержит:

а) только домены CH1 и CL замещены друг другом (т.е. легкая цепь первого фрагмента Fab содержит домен VL и домен CH1, а тяжелая цепь первого фрагмента Fab содержит домен VH и домен CL);

б) только домены VH и VL замещены друг другом (т.е. легкая цепь первого фрагмента Fab содержит домен VH и домен CL, а тяжелая цепь первого фрагмента Fab содержит домен VL и домен CH1); или

в) домены CH1 и CL замещены друг другом, а также домены VH и VL замещены друг другом (т.е. легкая цепь первого фрагмента Fab содержит домен VH и домен CH1, а тяжелая цепь первого фрагмента Fab содержит домен VL и домен CL); и

при этом второй Fab-фрагмент содержит легкую цепь, содержащую домен VL и домен CL, и тяжелую цепь, содержащую домен VH и домен CH1;

полноразмерное антитело с заменой домена может содержать первую тяжелую цепь, включающую домен CH3, и вторую тяжелую цепь, включающую домен CH3, причем оба домена CH3 сконструированы комплементарным образом посредством соответствующих аминокислотных замен, чтобы поддерживать

гетеродимеризацию первой тяжелой цепи и модифицированную вторую тяжелую цепь;

- полноразмерное антитело с заменой домена и дополнительным С-концевым сайтом связывания тяжелой цепи: мультиспецифическое антитело IgG, содержащее:

а) одно полноразмерное антитело, содержащее две пары каждой из легкой цепи полноразмерного антитела и тяжелой цепи полноразмерного антитела, в котором сайты связывания, образованные каждой из пар полноразмерной тяжелой цепи и полноразмерной легкой цепи, специфически связываются с первым антигеном и

б) один дополнительный Fab-фрагмент, причем дополнительный Fab-фрагмент слит с С-концом одной тяжелой цепи полноразмерного антитела, в котором сайт связывания дополнительного Fab-фрагмента специфически связывается со вторым антигеном,

при этом дополнительный Fab-фрагмент, специфически связывающийся со вторым антигеном i) включает кроссовер домена, так что а) переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен тяжелой цепи (VH) замещены друг другом, или б) константный домен легкой цепи (CL) и константный домен тяжелой цепи (CH1) замещены друг другом, или ii) представляют собой одноцепочечный Fab-фрагмент;

- одноцепочечный одноплечий формат (= одноцепочечное одноплечее антитело):

антитело, содержащее первый сайт связывания, который специфически связывается с первым эпитопом или антигеном, и второй сайт связывания, который специфически связывается со вторым эпитопом или антигеном, при этом отдельные цепи являются следующими:

- легкая цепь (переменный домен легкой цепи + константный домен каппа легкой цепи)

- комбинированная легкая/тяжелая цепь (переменный домен легкой цепи + константный домен легкой цепи + пептидный линкер + переменный домен тяжелой цепи + CH1 + шарнир + CH2 + CH3 с мутацией «выступа»)

- тяжелая цепь (переменный домен тяжелой цепи + CH1 + шарнир + CH2 + CH3 с мутацией «впадины»);

- одноцепочечный двуплечий формат (= одноцепочечное двуплечее антитело):

антитело, содержащее первый сайт связывания, который специфически связывается с первым эпитопом или антигеном, и второй сайт связывания, который специфически связывается со вторым эпитопом или антигеном, при этом отдельные цепи являются следующими:

- комбинированная легкая/тяжелая цепь 1 (вариабельный домен легкой цепи + константный домен легкой цепи + пептидный линкер + вариабельный домен тяжелой цепи + СН1 + шарнир + СН2 + СН3 с мутацией «впадины»)

- комбинированная легкая/тяжелая цепь 2 (вариабельный домен легкой цепи + константный домен легкой цепи + пептидный линкер + вариабельный домен тяжелой цепи + СН1 + шарнир + СН2 + СН3 с мутацией выступа);

- биспецифический формат с общей легкой цепью (= биспецифическое антитело с общей легкой цепью): антитело, содержащее первый сайт связывания, который специфически связывается с первым эпитопом или антигеном, и второй сайт связывания, который специфически связывается со вторым эпитопом или антигеном, при этом отдельные цепи являются следующими:

- легкая цепь (вариабельный домен легкой цепи + константный домен легкой цепи)

- тяжелая цепь 1 (вариабельный домен тяжелой цепи + СН1 + шарнир + СН2 + СН3 с мутацией «впадины»);

- тяжелая цепь 2 (вариабельный домен тяжелой цепи + СН1 + шарнир + СН2 + СН3 с мутацией «выступа»).

Термин «специфическое связывание» означает, что антитело взаимодействует со своим родственным антигеном с константой диссоциации ($=K_{Diss}$) по меньшей мере 10^{-8} моль/л. Таким образом, термин «специфическое связывание» означает связывание антитела с константой диссоциации ($=K_{Diss}$) 10^{-8} моль/л или менее с его родственным антигеном. Термины «не специфически связывается» или «не связывается специфически» обозначают связывание антитела с неродственным антигеном с константой диссоциации ($=K_{Diss}$) не более 10^{-7} моль/л или более, т.е., например, 10^{-5} моль/л. В то же время свойство

«неспецифического связывания» обеспечивается $K_{Diss} 10^{-7}$ моль/л или хуже для соответствующего неродственного антигена. В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающееся с антигеном, будет иметь K_{Diss} -разрыва по меньшей мере 100-кратную между его реактивностью по отношению к родственному антигену и его реактивностью по отношению к неродственному антигену.

Связывающие свойства антитела, особенно K_{Diss} , можно оценить с помощью прибора VІАсоге®. В этом методе связывающие свойства оцениваются по изменению поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Исследуемое антитело удобно связать с твердой фазой (называемой чипом) и оценить его связывание, нанеся рассматриваемый антиген на этот покрытый чип.

Используемый в данном документе термин «замещенные друг другом» по отношению к соответствующим доменам тяжелой и легкой цепей относится к вышеупомянутым кроссоверам доменов. Таким образом, если домены СН1 и СL «замещаются друг другом», это относится к кроссоверу доменов, упомянутому в пункте (i), и полученной последовательности домена тяжелой и легкой цепи. Соответственно, если VH и VL «замещаются друг другом», это относится к кроссоверу доменов, упомянутому в пункте (ii); а если домены СН1 и СL «замещаются друг другом», а домены VH и VL «замещаются друг другом», это относится к кроссоверу доменов, упомянутому в пункте (iii).

Мультиспецифические антитела также содержат в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один Fab-фрагмент, включающий либо кроссовер доменов СН1 и СL, как указано в пункте (i) выше, либо кроссовер доменов VH и VL, как указано в пункте (ii) выше, или кроссовер доменов VH-СН1 и VL-VL, как упомянуто в пункте (iii) выше. В случае мультиспецифических антител с кроссовером домена Fab, специфически связывающиеся с одним и тем же антигеном(ами), конструируют так, чтобы они имели одну и ту же последовательность домена. Следовательно, в случае, если в мультиспецифическом антителе содержится более одного Fab с кроссоверным доменом, указанный(ые) Fab специфически связывается(ются) с одним и тем же антигеном.

Термин «антиген» относится к заранее определенной мишени, с которой антитело может избирательно связываться. Антиген может представлять собой полипептид, углевод, нуклеиновую кислоту, липид, гаптен или его фрагмент или

другое природное или синтетическое соединение. В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой полипептид. В другом варианте осуществления антиген имеет терапевтическое значение. В еще одном варианте осуществления антиген специфичен или обеспечивает доставку к определенной области тела, например, к определенному органу или типу клеток или пораженной области. Это может быть специфическая структура на поверхности клетки, например рецептор или опухолевый маркер. В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления изобретения антиген представляет собой рецептор трансферрина человека.

10 Предпочтительно (i) антитело содержит две пары тяжелой цепи и легкой цепи, причем каждая из тяжелых цепей и/или легких цепей содержит один или более первых сайтов распознавания, или (ii) антитело содержит две пары каждая из тяжелой цепи и легкой цепи, причем одна из тяжелых цепей и/или легких цепей содержит один или более первых сайтов распознавания, или (iii) антитело
15 содержит одну пару тяжелой цепи и легкой цепи и одну дополнительную Fc-область тяжелой цепи, причем тяжелая цепь и/или фрагмент Fc-области тяжелой цепи или легкая цепь содержат один или более первых сайтов распознавания.

Согласно настоящему изобретению, модифицированное антитело включает один или более сайтов распознавания KalbTG в полипептиде тяжелой
20 цепи и/или полипептиде легкой цепи. Сайт распознавания включает мотив KalbTG, причем KalbTG может катализировать образование изопептидной связи между модифицированным антителом и соединением (полезной нагрузкой), которое должно быть связано с модифицированным антителом. Обычно изопептидная связь образуется между боковой цепью глутамина (Gln, Q) и
25 боковой цепью лизина (Lys, K). Предпочтительно, модификация, введенная в антитело для получения модифицированного антитела по настоящему изобретению, включает создание (искусственной) Q-метки, т.е. Gln-содержащего мотива, распознаваемого KalbTG, внутри полипептида тяжелой и/или легкой цепи антитела. Подходящие Q-метки раскрыты в WO 2017/102759, специально
30 включенном в данный документ посредством ссылки. Один или более первых сайтов распознавания KalbTG независимо друг от друга в некоторых вариантах осуществления содержат или имеют Gln-содержащий мотив, особенно последовательность RYGQR (SEQ ID NO: 11), RWRQR (SEQ ID NO: 12), YRQRT (SEQ ID NO: 13), IRQRQ (SEQ ID NO: 14), FRYRQ (SEQ ID NO: 15) или YRYRQ

(SEQ ID NO: 17), в частности YRYRQ (SEQ ID NO: 17). Q-метка может быть создана путем одной или более модификаций аминокислот, таких как замены или вставки, предпочтительно вставки. В определенных вариантах осуществления Q-метку создают путем вставки и/или замены аминокислотной последовательности, содержащей YRYRQ (SEQ ID NO: 17) или RVRQR (SEQ ID NO: 18), особенно YRYRQ (SEQ ID NO: 17). Предпочтительно вставленная аминокислотная последовательность имеет длину от 5 до 20 аминокислот и содержит YRYRQ (SEQ ID NO: 17) или RVRQR (SEQ ID NO: 18), особенно YRYRQ (SEQ ID NO: 17). В определенных вариантах осуществления вставка представляет собой мотив Q-метки без линкеров, т.е. вставка состоит из YRYRQ (SEQ ID NO: 17) или RVRQR (SEQ ID NO: 18), в частности YRYRQ (SEQ ID NO: 17). Введение одного или более сайтов распознавания KalbTG может быть единственной модификацией константных областей легкой и/или тяжелой цепей. Альтернативно могут присутствовать дополнительные модификации, такие как метка для очистки (например, His-метка) или другие модификации, например, для повышения стабильности или гетеродимеризации или модификации эффекторной функции, отдельно или в любой комбинации.

Как указано выше, один или более первых сайтов распознавания KalbTG встраиваются в антитело в определенные сайты, а именно в одно или несколько положений, выбранных из положения 110 (LC110), 143 (LC143) и 214 (LC214) легкой цепи и положения 118 (HC118), 177 (HC177), 297 (HC297), 341 (HC341) и 401 (HC401) тяжелой цепи, в частности HC177, и/или HC297, и/или LC214. В определенных вариантах осуществления модифицированное антитело по настоящему изобретению может включать дополнительный (второй) сайт распознавания KalbTG в положении 446 (HC446) тяжелой цепи, т.е. на C-конце, особенно для связывания с доменом, отличным от домена, связанного с первым сайтом распознавания. Предпочтительно один или более первых сайтов распознавания находятся независимо друг от друга в положении 177 (HC177) или 297 (HC297) тяжелой цепи или в положении 214 (LC214) легкой цепи.

В определенных вариантах осуществления Q-метку встраивают в аминокислотную последовательность легкой/тяжелой цепи антитела, расположенную между/через один или два линкера. Линкеры могут повысить гибкость или обеспечить конъюгацию с более крупными полезными нагрузками. В определенных вариантах осуществления каждая линкерная

последовательность содержит независимо друг от друга от 1 до 20 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления - от 1 до 10 аминокислот, в дополнительных вариантах осуществления - от 1 до 5 аминокислот, и указанный линкер существенно не мешает функции Q-метки, KalbTG, укладке антитела и полезной нагрузке, которую необходимо присоединить к модифицированному антителу. Линкер может быть присоединен к Q-метке на N- и/или C-конце. В определенных вариантах осуществления линкерные аминокислоты представляют собой небольшие аминокислоты, такие как глицин или серин. Аминокислотные линкеры и их композиции известны в данной области техники (см., например, Chichili et al.). Аминокислоты глицин, серин, аланин, треонин и глутамат обычно составляют аминокислоты гибких линкеров. Соответственно, линкер(ы) может(могут) состоять в основном или полностью из Gly, и/или Ser, и/или Ala, и/или Thr, и/или Glu, а именно из GGGP (SEQ ID NO: 20), ESGS (SEQ ID NO: 21) или APAP (SEQ ID NO: 22). Кроме того, может присутствовать линкер, содержащий или состоящий из KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 23) или EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 24). В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения линкеры состоят независимо друг от друга в основном или полностью из Gly и Ser, а именно из $(Gly_mSer)_n$ с $m = 1, 2, 3$ или 4 и $n = 1, 2, 3, 4$ или 5 , где m и n независимо друг от друга предпочтительно равны $m=3$ и $n=1$. В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения один или более первых сайтов распознавания встраивают в аминокислотную последовательность тяжелой и/или легкой цепи через один или два линкера на ее концах, особенно если линкер состоит преимущественно или полностью из Gly и Ser, а именно из $(Gly-Gly-Gly-Ser)_n$ (SEQ ID NO: 19) с $n = 1, 2, 3, 4$ или 5 , предпочтительно $n=1$.

Если присутствует линкер, в антитело вставляют аминокислотную последовательность X1-YRYRQ-X2 (SEQ ID NO: 17) или X1-RVRQR-X2 (SEQ ID NO: 18). Независимо друг от друга отсутствуют X1 и X2 или линкер, в частности, линкерные аминокислоты. В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения вставка представляет собой мотив Q-метки с двумя гибкими линкерами, в частности GGGSYRYRQGGGS (SEQ ID NO: 25) или

GGGSRVRQRGGGS (SEQ ID NO: 26), особенно GGGSYRYRQGGGS (SEQ ID NO: 25).

Типичная Fc-область, включающая часть шарнирной области с первым сайтом распознавания (SEQ ID NO: 32, обозначаемая как 113) и без него (SEQ ID NO: 33, обозначаемая как 110) (жирным), имеет следующие последовательности:

113: **DKTHTCPPCP** APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT

110: DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT

113: CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY

110: CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY

113: RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALGA PIEKTISKAK

110: RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALGA PIEKTISKAK

113: GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

110: GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

113: WESNGQPENN YKTPPVLDS DGGGSYRYRQ GGGSGSFFLY

110: WESNGQPENN YKTPPVLDS D GSFFLY

113: SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

110: SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к одной или более нуклеиновым кислотам, кодирующим цепи модифицированного антитела согласно настоящему изобретению.

Нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированное антитело по настоящему изобретению, может быть выделена или получена *in vitro* для рекомбинантного получения антитела. Нуклеиновая кислота может быть вставлена в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для дальнейшей экспрессии.

«Нуклеиновая кислота» означает комплексное включение молекул ДНК (гДНК и кДНК) и РНК, а нуклеотиды, являющиеся основными структурными единицами нуклеиновых кислот, включают не только природные нуклеотиды, но и аналоги с модифицированными участками сахара или оснований. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей переменные области тяжелой и легкой цепи по настоящему изобретению, может быть модифицирована. Такие модификации включают добавления, делеции или неконсервативные или консервативные замены нуклеотидов при условии, что кодируемая последовательность не изменяется.

ДНК, кодирующая модифицированное антитело по изобретению, может быть выделена или синтезирована с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидного зонда, способного специфически связываться с ДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи антитела).

Доступно множество векторов переноса и экспрессии. Компоненты вектора в общем случае включают, но не ограничиваются этим, одно или более из следующего: сигнальная последовательность, точка начала репликации, один или более маркерных генов, энхансерных элементов, промоторов и последовательностей терминации транскрипции.

Термин «вектор», используемый в данном документе, относится к плазмидному вектору как средству экспрессии представляющего интерес гена в клетке-хозяине; космидному вектору; вирусным векторам, таким как бактериофаговые векторы, аденовирусные векторы, ретровирусные векторы и аденоассоциированные вирусные векторы и т.п. Нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированное антитело в векторе, функционально связана с промотором и сигнальной последовательностью полиаденилирования.

«Функционально связанный» относится к функциональной связи между последовательностью контроля экспрессии нуклеиновой кислоты (например, промотором, сигнальной последовательностью или массивом сайтов связывания факторов регуляции транскрипции) и другой последовательностью нуклеиновой кислоты, при этом контрольная последовательность контролирует транскрипцию и/или трансляцию другой нуклеиновой кислоты.

В случае использования эукариотических клеток в качестве хозяина используют промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионина, промотор β -актина, промотор гемоглобина человека и промотор мышечного креатина человека) или промоторы млекопитающих, полученные из вирусов животных (например, поздний промотор аденовируса, промотор 7,5К вируса коровьей оспы, промотор SV40, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор tk HSV, промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор LTR ВИЧ, промотор вируса Молони, промотор вируса Эпштейна-Бар (EBV) и промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Кроме того, сигнальная последовательность полиаденилирования

присутствует после кодирующей нуклеиновой кислоты в качестве последовательности терминации транскрипции.

Клетки можно трансформировать вышеупомянутыми векторами. Клетки, используемые для получения антител по настоящему изобретению, могут быть прокариотическими, дрожжевыми или высшими эукариотическими клетками, но не ограничиваются ими.

Однако наибольший интерес представляют клетки животных, и примерами полезных линий клеток-хозяев являются COS-7, ВНК, CHO, CHO-S, CHO-K1, GS-CHO, CHO DXB-11, CHO DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, ВНК, ТМ4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Нер G2, SK-Нер, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3Т3, RIN, А549, РС12, К562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S или НТ1080, но не ограничивается ими. В одном предпочтительном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к ковалентному конъюгату, содержащему (i) модифицированное антитело по изобретению и (ii) один более не относящихся к антителу доменов (полезная нагрузка), ковалентно конъюгированных с одним или более (первыми) сайтами распознавания KalbTG, причем не относящийся к антителу домен содержит комплементарный второй сайт распознавания KalbTG. В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения не относящийся к антителу домен представляет собой терапевтический фрагмент, содержащий терапевтический компонент и необязательно второй линкер.

Как подробно описано выше, модифицированное антитело по настоящему изобретению предназначено для конъюгации одной или более полезных нагрузок, таких как, например, терапевтические фрагменты, конкретно с одним или более внутренними сайтами антитела с помощью KalbTG. Таким образом получают ADC, который можно использовать в таргетной терапии. Конъюгат способен связываться с представляющей интерес мишенью и тем самым транспортировать полезную нагрузку, например, терапевтический фрагмент, в нужную область организма. В определенных вариантах осуществления модифицированное антитело, согласно настоящему изобретению, распознает мишень и связывается с ней с помощью ее определяющих комплементарность областей (CDR), в частности, когда мишенью является биомолекула, присутствующая в клетке.

Как подробно описано выше, может быть желательно направить терапевтический фрагмент на конкретную область тела пациента. Это может улучшить распределение *in vivo* и уменьшить неблагоприятные побочные эффекты. Очевидно, что оно может быть предназначено для доставки терапевтического фрагмента в область, до которой иначе трудно добраться. В качестве примера можно представить себе направление терапевтического фрагмента в мозг. Из-за гематоэнцефалического барьера трудно доставить в него «голый» терапевтический фрагмент, если он не вводится непосредственно в мозг, особенно в случае, если терапевтический фрагмент превышает определенные ограничения по размеру. Очевидно, что преимущество имеют терапевтические подходы, способствующие преодолению гематоэнцефалического барьера и транспортировке терапевтического фрагмента в мозг. Примечательно, что тот же подход можно использовать для направления терапевтического препарата на другую область тела.

В настоящем изобретении единицы молекулярного распознавания антител, специфически связывающиеся со структурами в организме, используются для нацеливания терапевтического фрагмента. Ввиду вышеизложенного очевидно, что терапевтическим компонентом может быть любое соединение, полезное при лечении или предупреждении представляющего интерес заболевания, особенно соединение, которое должно быть доставлено в конкретную область тела, например в определенный орган или тип клеток или пораженную область.

Подразумевается, что термины «лечить», «осуществление лечения» и «лечение» включают облегчение или отмену состояния, расстройства или заболевания, или одного или более симптомов, связанных с состоянием, расстройством или заболеванием; или облегчение или устранение причины (причин) состояния, расстройства или заболевания как такового. Подразумевается, что термины «предупреждать», «осуществлять предупреждение» и «предупреждение» включают способ задержки и/или предотвращения возникновения состояния, расстройства или заболевания и/или сопутствующих ему симптомов; предотвращение приобретения субъектом состояния, расстройства или заболевания; или снижение риска возникновения у субъекта состояния, расстройства или заболевания.

Для этого не относящуюся к антителу полезную нагрузку, содержащую терапевтический компонент и, необязательно, второй линкер, ковалентно конъюгируют с модифицированным антителом по изобретению. Терапевтический фрагмент содержит активный терапевтический компонент или пролекарство. Необязательно может присутствовать второй линкер. Второй линкер может представлять собой химический линкер, содержащий, например, алкильные группы или полиэтиленовые группы, или пептидный линкер.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения терапевтический компонент представляет собой нуклеиновую кислоту, такую как РНК, миРНК или ASO (антисмысловый олигонуклеотид), в частности ASO, содержащий нуклеотиды LNA; и/или терапевтический компонент представляет собой токсин, или небольшую органическую молекулу, или иммуномодулятор.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения терапевтический компонент представляет собой нуклеиновую кислоту. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой ДНК или РНК или их смесь. Термин РНК также включает в себя антисмысловые РНК, а также малые интерферирующие РНК (миРНК), которые представляют собой класс двухцепочечных некодирующих молекул РНК, обычно длиной 20-24 пары оснований, подобных микроРНК и действующих в рамках пути РНК-интерференции (РНКи). Препятствует экспрессии специфических генов с комплементарными нуклеотидными последовательностями, разрушая мРНК после транскрипции, тем самым предотвращая трансляцию. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит одну или более запертых нуклеиновых кислот (LNA). LNA представляет собой модифицированный нуклеотид РНК, в котором рибоза модифицирована дополнительным мостиком, соединяющим 2'-кислород и 4'-углерод. Мостик «запирает» рибозу в 3'-эндо (северной) конформации. Эту структуру можно объяснить повышенной стабильностью против ферментативной деградации; более того, структура LNA обладает улучшенной специфичностью и аффинностью как мономера или компонента олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления нуклеотид LNA смешан с остатками ДНК или РНК в олигонуклеотиде или нуклеиновой кислоте.

В определенных вариантах осуществления дополнительно или в качестве альтернативы терапевтический компонент может представлять собой небольшую молекулу. В области фармакологии небольшая молекула имеет низкую молекулярную массу (< 2500 дальтон, особенно < 1000 дальтон). Многие низкомолекулярные терапевтические основы представляют собой небольшие органические молекулы. Небольшие органические молекулы обычно связывают определенные биологические макромолекулы и действуют как эффектор, изменяя активность или функцию мишени. Эти соединения могут быть природными (например, первичные и вторичные метаболиты) или искусственными (т.е. не встречающимися в природе); они оказывают благотворное действие против болезни.

В настоящем изобретении терапевтический компонент представляет собой не относящийся к антителу домен, который ковалентно связан с модифицированным антителом по изобретению, необязательно через второй линкер. Линкер может зависеть от предполагаемой мишени и терапевтического компонента, поскольку длина, жесткость и химический состав линкера могут влиять на скорость реакции конъюгации и стабильность полученных конъюгатов. В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения (второй) линкер представляет собой алкильный линкер, или полиэтиленовый линкер, или пептидный линкер, или их смесь. В определенных вариантах осуществления (второй) линкер содержит звенья этиленгликоля (ПЭГ), например, от приблизительно 2 до 50 звеньев этиленгликоля. Типичные линкеры включают линкеры полиэтиленгликоля ($-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{PEG}_n-\text{NH}_2$, с $n =$ от 2 до 25). В определенных вариантах осуществления (второй) линкер представляет собой алифатическую углеродную цепь. Линкер может содержать незамещенный или замещенный алкил, такой как незамещенный или замещенный C_{1-6} алкил, причем C_{1-6} алкил может быть замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкокси, ацила, ацилокси, алкоксикарбонила, карбонилалкокси, ациламино, амино, аминаоцила, аминаокарбониламино, аминаокарбонилокси, циклоалкила, циклоалкенила, циано, азидо, галогена, гидроксила, нитро, карбоксила, тиола, тиаалкила, алкила, алкенила, алкинила, гетероциклила, аминосульфонила, сульфониламино, сульфонила и оксо. В

определенном варианте осуществления (второй) линкер представляет собой пептидный линкер, т.е. линкер, состоящий из аминокислот.

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения конъюгат содержит модифицированное антитело согласно настоящему изобретению и одну или более терапевтических нуклеиновых кислот, таких как АСО, причем каждая терапевтическая нуклеиновая кислота связана с одной Q-меткой через изопептидную связь и, необязательно, амидную связь с концевым остатком К-метки через второй линкер, особенно через линкер PEG, как определено выше.

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения конъюгат имеет DAR в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 8, от приблизительно 1 до приблизительно 4 или от приблизительно 1 до приблизительно 2. В другом варианте осуществления конъюгат имеет DAR приблизительно 1, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7 или приблизительно 8.

При связывании антитела с мишенью конъюгат транспортируется в соответствующую клетку путем эндоцитоза, терапевтический компонент высвобождается и может действовать по назначению (например, осуществлять лечение заболевания).

В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело распознает одну мишень, и указанная мишень представляет собой рецептор, индуцирующий рецептор-опосредованный эндоцитоз, такой как, например, рецептор трансферрина 1 человека (TfR1), рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 человека (IGF-1R), белок 1, родственной рецептору липопротеинов низкой плотности человека (LRP1), или белок 8, родственной рецептору липопротеинов низкой плотности человека (LRP8), в частности TfR1.

Для специфических рецепторов, таких как, например, TfR1 или IGF-1R, после связывания антитела с мишенью конъюгат транспортируется в соответствующую клетку путем эндоцитоза, высвобождается из эндосомы и снова экзоцитируется из клетки. Если клетка является частью барьера, такого как гематоэнцефалический барьер, тем самым достигается транспорт через соответствующий барьер. Таким образом, терапевтический компонент

транспортируется в ту часть организма, которую не могла бы достичь терапевтический компонент, не конъюгированный с модифицированным антителом согласно изобретению.

5 В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело специфически связывается со структурой, которая позволяет преодолевать гематоэнцефалический барьер. В определенных вариантах осуществления структура, позволяющая преодолевать гематоэнцефалический барьер, представляет собой рецептор трансферрина человека.

10 В определенных вариантах осуществления модифицированное антитело распознает одну или две мишени, и указанные одна или две мишени является(ются) специфичной(ыми) для определенного типа клеток, например, опухолевого маркера, специфичного для опухолевой клетки, такой как клетка рака молочной железы.

15 В одном предпочтительном варианте осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения модифицированное антитело согласно изобретению конъюгировано с не относящимся к антителу доменом, содержащим терапевтический компонент, содержащий РНК или LNA, для лечения или предупреждения заболевания головного мозга, такого как болезнь Паркинсона или болезнь Альцгеймера и необязательно линкер ПЭГ.

20 В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к способу ковалентного конъюгирования модифицированного антитела согласно настоящему изобретению с терапевтическим компонентом, причем способ включает:

25 а) предоставление модифицированного антитела согласно настоящему изобретению,

б) предоставление не относящегося к антителу домена, причем не относящийся к антителу домен содержит: (i) терапевтический компонент, (ii) второй сайт распознавания KalbTG, который комплементарен первому сайту распознавания, присутствующему в модифицированном антителе, предоставленном в пункте (i), в одном предпочтительном варианте осуществления второй сайт распознавания содержит или имеет Lys-содержащий мотив, особенно последовательность RYESK (SEQ ID NO: 16), и (iii)

необязательно второй линкер между терапевтическим компонентом и вторым сайтом распознавания; и

5 в) инкубирование или взаимодействие модифицированного антитела из а) и не относящегося к антителу домена из б) в присутствии KalbTG или его функционально активного варианта или фрагмента и в условиях, способствующих активности KalbTG, тем самым формируя изопептидную связь между первым и вторым сайтом распознавания, таким образом конъюгируя модифицированное антитело с терапевтическим компонентом.

10 На первых шагах способа предоставляются модифицированное антитело по настоящему изобретению и не относящийся к антителу домен.

Не относящийся к антителу домен содержит:

15 (i) терапевтический компонент, (ii) второй сайт распознавания KalbTG, который комплементарен первому сайту распознавания, присутствующему в модифицированном антителе, т.е. в случае, если модифицированное антитело содержит Q-метку, не относящийся к антителу домен содержит K-метку или наоборот, особенно если второй сайт распознавания содержит или имеет Lys-содержащий мотив, особенно последовательность RYESK (SEQ ID NO: 16) (K-метка), и (iii) необязательно второй линкер между терапевтическим компонентом и вторым сайтом распознавания.

20 Домены могут быть такими, как определено выше.

25 Модифицированное антитело и не относящийся к антителу домен инкубируются, т.е. подвергаются реакции, в присутствии KalbTG или его функционально активного варианта или фрагмента (это означает вариант или фрагмент KalbTG, который обладает ферментативной активностью, сравнимой с KalbTG дикого типа) и в условиях, способствующих активности KalbTG, в результате чего образуется изопептидная связь между первым и вторым сайтом распознавания, таким образом конъюгируя модифицированное антитело с терапевтическим компонентом.

30 В некоторых вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления этого способа, согласно настоящему изобретению, антитело содержит одну или более Q-меток, которые конъюгированы с использованием ферментативной активности KalbTG с соответствующей одной или более K-метками.

Не относящийся к антителу домен содержит второй сайт распознавания KalbTG. В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантах осуществления данного способа, согласно настоящему изобретению, не относящийся к антителу домен содержит К-метку, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с пептидной последовательностью RYESK (SEQ ID NO: 16).

Микробные трансглутаминазы (mTG), включая KalbTG, катализируют образование изопептидных связей Gln-Lys и широко используются для сшивания белков и пептидов в пищевых продуктах и биотехнологических приложениях (например, для улучшения текстуры продуктов, богатых белком, или для создания конъюгатов антитело-лекарственное средство).

Однако KalbTG практически не проявляет перекрестной реактивности с известными субстратами mTG или обычно используемыми белками-мишенями, такими как антитела, и, следовательно, позволяет осуществлять специфическую конъюгацию в заранее определенных сайтах.

Соответственно, по существу, любая полезная нагрузка, содержащая второй сайт распознавания (К-тег) KalbTG, особенно если при этом второй сайт распознавания содержит или имеет Lys-содержащий мотив, особенно последовательность RYESK (SEQ ID NO: 16), может быть конъюгирована/соединена с модифицированным антителом в одном или более первых сайтах распознавания, т.е. Q-метках.

KalbTG или его функционально активный вариант или фрагмент могут быть такими, как определено у Steffen et al. (2017) или как в WO 2016/100735 A1, оба из которых явно включены в данный документ посредством ссылки.

Функционально активный вариант или фрагмент может представлять собой трансглутаминазу, имеющую по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с KalbTG из WO 2016/100735 A1 (см. SEQ ID NO: 6 в ней). В качестве альтернативы, KalbTG или его функционально активный вариант может быть частью слитого белка, дополнительно содержащего метку, такую как метка, например в целях очистки.

В определенных вариантах осуществления KalbTG содержит аминокислотную последовательность (в трехбуквенном коде)

Met His Lys Trp Phe Leu Arg Ala Ala Val Val Ala Ala Val Gly Phe Gly Leu Pro Thr Leu Ile Ala Thr Thr Ala Gln Ala Ala Ala Val Ala Ala Pro Thr Pro Arg Ala

Pro Leu Ala Pro Pro Leu Ala Glu Asp Arg Ser Tyr Arg Thr Trp Arg Val Glu Asp Tyr
Val Glu Ala Trp Glu Arg Tyr His Gly Arg Glu Met Thr Glu Asp Glu Arg Glu Asn
Leu Ala Arg Gly Cys Ile Gly Val Thr Val Val Asn Leu Asn Arg Glu Asp Leu Ser Asn
Pro Pro Leu Asn Leu Ser Phe Gly Ser Leu Arg Thr Ala Glu Ala Val Gln Ala Ala Leu
5 Asn Lys Ile Val Asp Thr His Pro Ser Pro Ala Gln Tyr Glu Ala Ala Val Ala Lys Asp
Pro Ile Leu Lys Arg Leu Lys Asn Val Val Lys Ala Leu Pro Ser Trp Ile Asp Ser Ala
Lys Leu Lys Ala Ser Ile Phe Ser Lys Arg Phe Tyr Ser Trp Gln Asn Pro Asp Trp Ser
Glu Glu Arg Ala His Thr Thr Tyr Arg Pro Asp Arg Glu Thr Asp Gln Val Asp Met Ser
Thr Tyr Arg Tyr Arg Ala Arg Pro Gly Tyr Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Asp Gln
10 Asp Thr Asn Thr Trp Trp His Ala Asn His Glu Glu Pro Arg Met Val Val Tyr Gln Ser
Thr Leu Arg His Tyr Ser Arg Pro Leu Gln Asp Phe Asp Glu Gln Val Phe Thr Val Ala
Phe Ala Lys Lys Asp (SEQ ID NO: 31).

В некоторых вариантах осуществления всех аспектов и вариантах
осуществления способа, согласно настоящему изобретению, указанное
15 связывание контролируется и, например, достигается при стехиометрическом
соотношении не относящегося к антителу домена, и модифицированного
антитела, например, приблизительно 1:1 на Q-метку/К-метку. Множественной
конъюгации также можно добиться, используя более одного первого сайта
распознавания на одном модифицированном антителе, чтобы присоединить к
20 модифицированному антителу две или даже более полезных нагрузок.

В пятом аспекте ковалентный конъюгат, содержащий модифицированное
антитело по настоящему изобретению или полученный в соответствии со
способом по настоящему изобретению, предназначен для применения в качестве
лекарственного средства, в частности, для применения при лечении
25 неврологического заболевания или заболевания головного мозга, такого как
болезнь Альцгеймера или болезни Паркинсона, или для применения при лечении
рака, такого как рак молочной железы.

В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов
осуществления настоящего изобретения заболевание представляет собой
30 неврологическое заболевание. В определенных вариантах осуществления
неврологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из
нейропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака,
заболевания глаз, судорожного расстройства, лизосомальной болезни
накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии,

поведенческого расстройства, воспаления ЦНС, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, рассеянного склероза, CD20-положительного рака с метастазами в головной мозг и HER2-положительного рака с метастазами в головной мозг.

5 В определенных вариантах осуществления всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения неврологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из нейропатического расстройства, нейродегенеративного заболевания, рака, заболевания глаз, судорожного расстройства, лизосомальной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, поведенческого расстройства и воспаления ЦНС.

10 Как подробно описано выше, конъюгаты, содержащие модифицированное антитело согласно изобретению, можно использовать в качестве лекарственного средства, в частности, при лечении неврологического заболевания или заболевания головного мозга, в одном предпочтительном варианте осуществления болезни Альцгеймера или болезни Паркинсона, или для
15 применения при лечении рака, например, рака молочной железы.

Конъюгат может быть включен в композицию. Такая композиция, также называемая фармацевтической композицией, представляет собой композицию, предназначенную для применения в фармацевтической области или в качестве фармацевтического препарата, и относится к препарату, который находится в
20 форме, обеспечивающей эффективность биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента, и который не содержит дополнительные компоненты, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому предполагается вводить фармацевтическую композицию. Композиция необязательно может содержать фармацевтически приемлемое
25 вспомогательное вещество, разбавитель или носитель, а именно буферные вещества, стабилизаторы или консервант, и необязательно дополнительные активные ингредиенты, особенно ингредиенты, известные в связи с фармацевтическими композициями.

30 В общем, природа дополнительного ингредиента будет зависеть от конкретной формы фармацевтической композиции и используемого способа введения. Фармацевтически приемлемые носители улучшают или стабилизируют композицию или могут использоваться для облегчения получения композиции. Такие носители могут включать, помимо прочего, физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, декстрозу, воду, глицерин,

растворители, дисперсионные среды, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и т.п., которые являются физиологически совместимыми, а также их комбинации. Состав должен соответствовать способу введения. Например, парентеральные составы обычно содержат жидкости для инъекций, которые включают в себя фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, а именно воду, физиологический раствор, сбалансированные солевые растворы, водный раствор декстрозы, глицерин и т.п. в качестве носителя. В дополнение к биологически нейтральным носителям фармацевтические композиции для введения могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты, буферные агенты для pH и т.п.

Фармацевтическая композиция может содержать стабилизатор. Термин «стабилизатор» относится к веществу, которое защищает композицию от неблагоприятных условий, таких как те, которые возникают при нагревании или замораживании, и/или продлевает стабильность или срок хранения конъюгата по изобретению в определенном состоянии или с определенными свойствами. Примеры стабилизаторов включают, помимо прочего, сахара, а именно сахарозу, лактозу и маннозу; сахарные спирты, а именно маннит; аминокислоты, а именно глицин или глутаминовую кислоту; и белки, а именно сывороточный альбумин или желатин человека.

Обычно в фармацевтических композициях по изобретению используется терапевтически эффективная доза или эффективная доза конъюгата. Количество вводимого конъюгата может быть первоначально определено на основе руководства по дозе и/или режиму дозирования сопоставимого несвязанного терапевтического средства. В общем, конъюгаты могут обеспечивать адресную доставку, обеспечивая, таким образом, по меньшей мере одно из снижения дозы или сокращенного введения в режиме дозирования. Таким образом, конъюгаты могут обеспечивать пониженную дозу и/или уменьшенное введение по схеме лечения по сравнению с терапевтическим средством до включения в конъюгат по настоящему изобретению. Как отмечалось выше, поскольку конъюгаты могут обеспечивать контролируемую стехиометрию доставки лекарственного средства, дозировки конъюгатов можно рассчитывать на основе количества молекул

лекарственного средства, предоставленных в расчете на конъюгат антитело-терапевтический компонент.

Фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить один или более раз или многократно. Частота введения конъюгата может варьироваться в зависимости от любого из множества факторов, например, тяжести симптомов и т.д. Например, в некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят один раз в шесть месяцев, один раз в пять месяцев, один раз в четыре месяца один раз в три месяца, один раз в два месяца, один раз в месяц, два раза в месяц, три раза в месяц, раз в две недели (qow), один раз в неделю (qw), два раза в неделю (biw), три раза в неделю (tiw), четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю, через день (qod), ежедневно (qd), два раза в день (qid) или три раза в день (tid).

В определенных вариантах осуществления конъюгат или фармацевтическую композицию по изобретению вводят одновременно с одним или более дополнительными соединениями. В определенных вариантах осуществления конъюгат или фармацевтическую композицию по изобретению вводят до или после дополнительного соединения(й).

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть использована в качестве лекарственного средства для лечения индивидуума. Индивидуум является млекопитающим. Млекопитающие включают без ограничения одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и отличных от человека приматов, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). Предпочтительно, индивидуум представляет собой человека.

Фармацевтические композиции, включающие описанный в данном документе конъюгат, можно доставлять в клетку, группу клеток, опухоль, ткань или субъекту с использованием технологий доставки, известных в данной области техники. В общем, любой подходящий метод доставки конъюгата, известный в данной области техники, можно адаптировать для использования с описанными в данном документе композициями. Например, доставка может осуществляться местным введением (например, прямой инъекции, имплантации или местного введения), системным введением или внутривенным, внутриглазным, внутрибрюшинным или парентеральным путями, включая внутрочерепное (например, внутривентрикулярное, интрапаренхиматозное и

интратекальное) или внутримышечное введение. Ковалентный конъюгат по настоящему изобретению предпочтительно вводят внутривенно, внутримышечно или внутриаартериально, более предпочтительно внутривенно. Особенно выгодно составлять вышеупомянутые фармацевтические композиции в виде единичной дозированной формы для простоты введения и единообразия дозировки. Единичная лекарственная форма, используемая в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных дозровок, причем каждая единица содержит predetermined количество активного ингредиента, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Примерами таких стандартных лекарственных форм являются растворы или суспензии для инъекций и т.п.

Как подробно описано выше, конъюгат/фармацевтическая композиция по изобретению особенно полезна при лечении неврологического заболевания или заболевания головного мозга, такого как болезнь Альцгеймера или болезнь Паркинсона. Термин «неврологические заболевания» охватывает, среди прочего, нейродегенеративные заболевания, нейровоспалительные заболевания или судорожные расстройства, особенно головного мозга. Нейродегенеративные заболевания характеризуются прогрессирующей потерей структуры или функции нейронов, включая гибель нейронов. Многие нейродегенеративные заболевания, включая болезнь Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона, боковой амиотрофический склероз и рассеянный склероз, возникают в результате нейродегенеративных процессов. Существует много параллелей между различными нейродегенеративными расстройствами, включая атипичные сборки белков, а также индуцированную гибель клеток. Кроме того, нейродегенерацию можно обнаружить на многих различных уровнях нейрональных цепей, от молекулярных до системных. Термины «нейродегенеративные заболевания» и «нейровоспалительные заболевания» имеют частично пересекающуюся сферу применения. Воспалительные реакции являются отличительной чертой нейродегенеративных заболеваний и участвуют или способствуют посредством различных механизмов гибели нейронов. Катаболизм триптофана по кинурениновому пути (КП) представляет собой один из таких механизмов. Судорожные расстройства представляют собой расстройства головного мозга, которые характеризуются аномальной передачей сигналов между клетками

головного мозга. Судорожные расстройства могут поражать часть мозга (парциальные припадки) или весь мозг (генерализованные припадки). Наиболее распространенным судорожным расстройством является эпилепсия. Для прохождения гематоэнцефалического барьера в качестве мишени для конъюгата можно использовать рецептор, опосредующий рецептор-индуцированный эндоцитоз. Их примеры включают рецептор 1 трансферрина (TfR1), рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R), белок 1, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности (LRP1), или белок 8, родственный рецептору липопротеинов низкой плотности (LRP8), особенно TfR1.

10 Если не указано иное, все технические и научные термины и любые аббревиатуры, используемые в данном документе, имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники в области настоящего раскрытия. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы при
15 осуществлении на практике настоящего изобретения, в настоящем документе описаны конкретные способы и материалы.

Настоящее изобретение не ограничено конкретной методикой, протоколами и реагентами, описанными в настоящем документе, поскольку они могут изменяться. Любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы при
20 осуществлении на практике настоящего изобретения, в настоящем документе описаны типичные способы и материалы. Кроме того, терминология, использованная в настоящем документе, представлена только с целью описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения
25 объема настоящего изобретения.

Используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Аналогичным образом, слова «включают», «содержат» и «охватывают» следует интерпретировать
30 инклюзивно, а не исключительно. Аналогичным образом, слово «или» включает в себя «и», если из контекста явно не указано иное. Термин «множество» относится к двум или более.

Следующие фигуры, последовательности и примеры предназначены для иллюстрации различных вариантов осуществления изобретения. По существу,

обсуждаемые конкретные модификации не следует рассматривать как ограничение объема изобретения. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что различные эквиваленты, изменения и модификации могут быть сделаны без выхода за рамки изобретения, и поэтому следует понимать, что такие эквивалентные варианты осуществления должны быть включены в данный документ.

Краткое описание графических материалов

На **Фигуре 1** показана хроматография гидрофобного взаимодействия мАт-2 (HER2) с 9 различными сайтами вставки Q-метки, конъюгированной с одноцепочечной нуклеиновой кислотой с 15 остатками.

На **Фигуре 2** показана типичная реакция одноэтапной KalbTG-опосредованной конъюгации моноклонального антитела с полезной нагрузкой нуклеиновой кислоты.

Примеры

Пример 1

Рекомбинантное получение модифицированного антитела согласно изобретению

Синтез генов

Желаемые сегменты генов получали методом химического синтеза и синтезированные фрагменты генов клонировали в подходящий вектор для экспрессии в клетках HEK293 и Expi293 компанией Twist Bioscience (Сан-Франциско, США).

Экспрессия модифицированного антитела в клетках млекопитающих

Производство антител осуществляли путем временной совместной трансфекции отдельных кассет экспрессии плазмид в клетках HEK293, культивируемых в среде F17 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) или клетках Expi293 в экспрессионной среде Expi293 (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), соответственно. Трансфекцию проводили, как указано в инструкциях производителя, с соотношением плазмид HC:LC экспрессирующих плазмид = 1:1 в случае симметричного стандартного формата IgG1 или с соотношением плазмид HC1:HC2:LC экспрессирующих плазмид = 1:1:1 для асимметричных форматов «выступ во впадину». Клеточные культуральные супернатанты собирали через семь дней после трансфекции. Супернатанты хранили при пониженной температуре (например, -20°C).

Количественная оценка титра белка

Титр белка в образцах супернатанта определяли методом аффинной хроматографии с использованием колонки POROS A 20 мкм, 2,1 x 30 мм (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии (система Ultimate 3000 HPLC, Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Супернатант загружали в колонку, уравновешенную 0,2 М Na₂HPO₄, pH 7,4, с последующим элюированием 0,1 М лимонной кислотой, 0,2 М NaCl, pH 2,5. Титры определяли количественно путем измерения поглощения при 280 нм и последующего расчета концентрации белка путем сравнения площади пика элюирования (под кривой) анализируемого вещества с эталонной стандартной кривой.

Очистка модифицированного антитела из супернатанта культуры млекопитающих

Антитела в культуральном супернатанте улавливали с помощью аффинной хроматографии на белке А с использованием колонки Mab Select SuRe (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США), уравновешенной буфером PBS, pH 7,4. Несвязавшийся белок удаляли промыванием уравновешивающим буфером. Модифицированное антитело элюировали 50 мМ цитратом, pH 3,0, и pH элюата немедленно доводили до pH 7,5 добавлением 2 М Трис, pH 9,0. В качестве второго шага очистки проводили эксклюзионную хроматографию с использованием колонки Superdex 200TM (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США) в 20 мМ гистидине, 140 мМ NaCl, pH 6,0. Очищенные модифицированные антитела хранили при -80°C.

Очистка антител с использованием Mid-scale Automation (Милан)

Антитела очищали за один шаг с использованием аффинной хроматографии на белке А, как описано выше, с использованием MabSelectSuRe-Sepharose (Cytiva, Мальборо, Массачусетс, США) в системе обработки жидкостей (Tescan, Маннедорф, Швейцария), оснащенной колонками Repligen (Waltham, Массачусетс, США). Шаги уравновешивания, загрузки образца и промывания выполняли, как описано, и использовали 25 мМ цитрат, pH 3,0, для элюирования антител из колонки. Элюированные фракции антител нейтрализовали 1,5 М Трис, pH 7,5, и концентрацию определяли путем измерения оптической плотности (ОП) при 280 нм.

Обзор примерных антител**Антитело 110.***Описание:*

антитело к HER2 на основе подкласса IgG1 с мутацией
 5 P329G/L234A/L235A; ставка Q-метки в HC после аминокислотного остатка 177
 (HC177) (нумерация EU); Q-метка и спейсерная последовательность:
 GGGSYRYRQGGGS (SEQ ID NO: 25)

Последовательность константной области тяжелой цепи

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV
 10 HTFPAVLQSSGGGSYRYRQGGGSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
 TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 15 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 27)

Последовательность константной области легкой цепи

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
 GNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 20 RGEC (SEQ ID NO. 29)

Антитело 113.*Описание:*

антитело к HER2 на основе подкласса IgG1 с мутацией
 P329G/L234A/L235A; ставка Q-метки в HC после аминокислотного остатка 401
 (HC401) (нумерация EU); Q-метка и спейсерная последовательность:
 25 GGGSYRYRQGGGS (SEQ ID NO: 25)

Последовательность константной области тяжелой цепи

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
 THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 30 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTPPVLDSDGGGSYRYRQGGGSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 28)

Последовательность константной области легкой цепи

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO. 30)

5 **Таблица 1. Выход экспрессии различных антител с Q-метками, вставленными в разные положения.**

выход в масштабе [мг] →	мАт-1 (CD163)		мАт-2 (HER2)		мАт-3 (LeY)	
	24 мл	1 л	24 мл	1 л	24 мл	1 л
положение Q-метки ↓						
дикий тип, т.е. без Q-метки (эталон)	4,7	196	4,3	179	0,4	17
НС118	7,5	313	2,5	104	1,0	42
НС177	7,3	304	2,6	108	1,5	63
НС297	7,7	321	2,9	121	1,6	67
НС341	6,4	267	3,4	142	1,7	71
НС401	4,5	188	2,7	113	1,0	42
НС446	4,3	179	2,8	117	1,3	54
LC110	1,7	70,8	3,0	125	0,4	17
LC143	0,7	29,2	1,1	46	0,4	17
LC214	3,3	138	2,5	104	0,5	21

На экспрессию модифицированного антитела влияет положение введенной Q-метки. Введение после положения LC110, LC214, НС118, НС177, НС297, НС341 и НС401 привело к самым высоким выходам.

Пример 2

Конъюгация KalbTG модифицированного антитела согласно изобретению с флуоресцентным красителем

Конъюгация с применением KalbTG

15 Очищенные антитела, содержащие Q-метку, переносили в буфер для конъюгации (гистидиновый буфер, содержащий NaCl, pH 8,5) посредством диализа. Для реакции KalbTG антитело смешивали с K-меченной небольшой молекулой (флуоресцентный краситель, 10-кратный молярный избыток) и добавляли KalbTG (молярное соотношение мАт:KalbTG > 100:1). Реакционную

смесь инкубировали при 37°C при встряхивании, а затем реакцию гасили добавлением к раствору 10 мМ сульфата аммония. Для удаления неконъюгированной полезной нагрузки и остаточного фермента конъюгированное модифицированное антитело очищали эксклюзионной хроматографией с использованием колонки Superdex 200TM (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США) в PBS, pH 7,5. Очищенные конъюгаты хранили при -80°C.

Анализ конъюгатов

Количественное определение белка проводили с помощью спектрофотометра Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Кроме того, качественные измерения DAR проводили с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия, как описано в примере 4 ниже. Чистоту конъюгатов анализировали методом CE-SDS в денатурирующих и восстанавливающих условиях с использованием системы определения характеристик белков Caliper LabChip® GXII TouchTM в соответствии с инструкциями производителя (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс, США).

Содержание агрегатов определяли методом SEC с использованием аналитической эксклюзионной колонки TSKgel UP-SW3000 (Tosoh Bioscience, Грисхайм, Германия), уравновешенной 0,2 М K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0,25 М KCl, pH 6,2, на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии (Ultimate Система ВЭЖХ 3000, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

Идентичность конъюгатов была подтверждена с помощью ESI-Q-ToF-MS (Bruker maXis 433, Bruker, Биллерика, Массачусетс, США). Для МС-анализа образцы дегликозилировали с использованием N-гликозидазы F (Roche, Базель, Швейцария), а затем обессоливали до 2% муравьиной кислоты и 40% ацетонитрила.

Таблица 2. Эффективность конъюгации флуоресцентного красителя с антителом mAb-5 с Q-метками в различных положениях

конъюгация эффективность [DAR] →	mAb-5 (mTfR)
положение Q-метки ↓	DAR (XГВ)
HC118	1,8
HC177	1,8

конъюгация эффективность [DAR] → положение Q-метки ↓	мАт-5 (mTfR) DAR (ХГВ)
HC297	1,7
HC341	1,8
HC401	2,0
LC110	1,4
LC143	1,3
LC214	1,5

Пример 3

Конъюгация KalbTG модифицированного антитела согласно изобретению с нуклеиновой кислотой

5 Синтез антисмысловых олигонуклеотидов

Одноцепочечные олигонуклеотиды LNA были синтезированы с использованием стандартной химии фосфорамидитов. Фосфорамидиты ДНК и LNA, а также все стандартные реагенты были приобретены у Merck KGaA (Дармштадт, Германия). Пептиды К-метки были синтезированы фирмами Schafer-N Aps (Копенгаген, Дания) и Biosyntan (Берлин, Германия).

10 Олигонуклеотиды синтезировали на носителе NittoPhase HL UnyLinker 350 (Kinovate, Оушенсайд, Калифорния) на АКТА Oligopilot (GE Healthcare, Брондби, Дания) в масштабе 130 ммоль. После синтеза олигонуклеотиды отщепляли от носителя в течение ночи. Олигонуклеотиды очищали
15 ионообменной хроматографией и обессоливали с использованием мембраны Millipore. После лиофилизации соединения окончательно были охарактеризованы методами жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (обратно-фазовой и ионизационно-масс-спектрометрией электрораспылением).

20 Олигонуклеотиды конъюгировали либо с соответствующим линкером для конъюгации с К-меткой (1-шаг реакции), либо с акцепторной частью для Click химической конъюгации (2-шаг реакции). Затем конъюгаты подвергали непосредственной очистке обращенно-фазовой ВЭЖХ, описанной ниже.

После осаждения линкерного олигонуклеотида 2% перхлоратом лития в ацетоне полученный осадок промывали ацетоном, сушили в вакууме и повторно

растворяли в PBS. 1,5 эквивалента пептида К-метки растворяли в PBS и добавляли. Через 1 час при комнатной температуре реакцию смесь подвергали непосредственно очистке с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Обе реакции, описанные выше, были очищены обращенно-фазовой ВЭЖХ на подготовительной колонке Waters XBridge Peptide BEH C18 OBD, 300 Å, 10 мкм, 10 мм X 150 мм, с использованием 0,1 М ацетата аммония и ацетонитрила в качестве элюента. Объединенные фракции лиофилизировали, повторно растворяли в воде и доводили pH до 7,0 с помощью водного раствора NaOH. После финальной лиофилизации соединения окончательно были охарактеризованы методами жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (обратно-фазовой и ионизационно-масс-спектрометрией электрораспылением).

Ферментативная конъюгация LNA-ASO с антителами с Q-метками

1-шаговая конъюгация с применением KalbTG

Очищенные антитела, содержащие Q-метку, переносили в буфер для конъюгации (гистидиновый буфер, содержащий приблизительно 150 мМ хлорид-ионов, pH 7,5) посредством диализа. Для реакции KalbTG антитело смешивали с избытком К-меченного олигонуклеотида и добавляли KalbTG (Roche Diagnostics, Мангейм, Германия). Реакционную смесь инкубировали при 37°C при встряхивании, а затем реакцию гасили добавлением к раствору 10 мМ сульфата аммония. Для удаления неконъюгированной полезной нагрузки и остаточного фермента конъюгированное модифицированное антитело очищали эксклюзионной хроматографией с использованием колонки Superdex 200TM (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США) в PBS, 250 мМ аргинина, pH 7,5. Очищенные конъюгаты хранили при -80°C.

2-шаговая конъюгация с применением KalbTG и Click химической конъюгации

Очищенные антитела, содержащие Q-метку, переносили в буфер для конъюгации (гистидиновый буфер, содержащий NaCl, pH 8,5) посредством диализа. Для реакции KalbTG антитело смешивали с избытком К-меченного линкера, содержащего первую часть Click конъюгации (10-кратный молярный избыток), и добавляли KalbTG. Реакционную смесь инкубировали при 37°C при встряхивании, а затем реакцию гасили добавлением к раствору 10 мМ сульфата аммония. Для удаления неконъюгированного линкера и остаточного фермента конъюгированное модифицированное антитело очищали эксклюзионной

хроматографией с использованием колонки Superdex 200TM (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США) в PBS, 250 мМ аргинина, pH 7,5. Очищенный конъюгат антитело-линкер добавляли к избытку олигонуклеотида, конъюгированного с соответствующей другой частью Click конъюгации в PBS, 250 мМ аргинина, pH 7,5, и реакционную смесь инкубировали в течение ночи при комнатной температуре при встряхивании. Конъюгат антитело-олигонуклеотид очищали эксклюзионной хроматографией, как описано выше, и очищенные конъюгаты хранили при -80°C.

Анализ конъюгатов

Количественную оценку конъюгатов олигонуклеотидов проводили с помощью УФ/Вид-спектрометрии при 260, 280 и 350 нм с помощью системы SoloVPE (C Technologies, Бриджуотер, Нью-Джерси, США). Концентрации конъюгатов и количественное соотношение лекарственного средства к антителу (DAR) рассчитывали с помощью уравнения Ламберта-Бера. Кроме того, качественные измерения DAR проводили с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия, как описано в примере 4 ниже. Чистоту конъюгатов анализировали методом CE-SDS в денатурирующих и восстанавливающих условиях с использованием системы определения характеристик белков Caliper LabChip® GXII TouchTM (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс, США). Содержание агрегатов определяли методом SEC с использованием аналитической эксклюзионной колонки TSKgel UP-SW3000 (Tosoh Bioscience, Грисхайм, Германия), уравновешенной 0,2 М K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0,25 М KCl, pH 6,2, на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии (Ultimate Система ВЭЖХ 3000, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Идентичность конъюгатов была подтверждена с помощью ESI-Q-ToF-MS (Bruker maXis 433, Bruker, Биллерика, Массачусетс, США). Для MS-анализа образцы дегликозилировали с использованием N-гликозидазы F (Roche, Базель, Швейцария), а затем обессоливали до 2% муравьиной кислоты и 40% ацетонитрила.

Таблица 3. Эффективность конъюгации нуклеиновой кислоты, состоящей из 15 или 20 нуклеотидов, с разными антителами с Q-метками в различных положениях

конъюгация эффективность [DAR2] → положение Q- метки ↓	МАТ-1 (CD163)	МАТ-2 (HER2)		МАТ-4 (TfR)
	(ХГВ)	(ХГВ)	(УФВ-СС)	(ХГВ)
НС118	1,5	1,9	1,8	н.о.
НС177	2,0	1,9	1,8	н.о.
НС297 асимметричное симметричное	н.о. 2,0	н.о. 1,9	н.о. 1,7	0,9 1,9
НС341	2,0	1,8	1,8	н.о.
НС401	1,9	1,8	1,7	н.о.
НС446 асимметричное симметричное	н.о. 2,0	н.о. 1,9	н.о. 1,8	0,9 1,8
LC110	2,0	1,8	1,7	н.о.
LC143	1,9	1,9	1,7	н.о.
LC214 асимметричное симметричное	н.о. 2,0	н.о. 1,8	н.о. 1,7	1,0 н.о.

5 н.о. = не определено

На конъюгацию модифицированного антитела влияет положение введенной Q-метки. Введение после положения LC110, LC143, LC214, НС118, НС177, НС297 и НС341 привело к наилучшей эффективности конъюгации.

Таблица 4. Выходы экспрессии и эффективность конъюгации модифицированных антител с различными Q-метками

10

положение Q-метки → Последовательность Q-метки ↓	НС297		НС446		LC143	
	выход	конъюгация эффективность	выход	конъюгация эффективность	выход	конъюгация эффективность
RYGQR (SEQ ID NO: 11)	90	1,6/1,5	144	1,8/1,7	42	0,7/0,6
RWRQR (SEQ ID NO: 12)	136	1,7/1,6	114	1,8/1,7	12,2	1,1/0,8
YRQRT	102	1,7/1,7	0	н.о.	28	1,8/1,7

положение Q-метки → Последовательность Q-метки ↓	НС297		НС446		LC143	
	выход	конъюгация эффективность	выход	конъюгация эффективность	выход	конъюгация эффективность
(SEQ ID NO: 13)						
IRQRQ (SEQ ID NO: 14)	132	3,1/3,1	124	2,8/2,8	44	2,6/2,2
FRYRQ (SEQ ID NO: 15)	136	1,6/1,7	62	1,5/1,3	22	1,7/1,7

н.о. = не определено

Пример 4

5 Хроматография гидрофобного взаимодействия модифицированного антитела, конъюгированного с KalbTG, согласно изобретению

Хроматографию гидрофобного взаимодействия (ХГВ) проводили на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии (система Ultimate 3000 HPLC, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) с использованием колонки TSKgel Butyl-NPR (2,5 мкм, 4,6 x 35 мм, TOSOH Bioscience, Токио, Япония) со скоростью потока 1 мл/мин. Колонку уравнивали элюентом А (20 мМ дигидрат Na₂HPO₄, 1,5 М (NH₄)₂SO₄, pH 7,0) и в колонку загружали 60 мкг каждого образца. Затем применяли градиент между элюентом А и элюентом В (20 мМ дигидрата Na₂HPO₄, 25 % (об./об.) изопропанола, pH 7,0).

Градиент:

15 0 мин. 5 % В
0-30 мин. 5 % В -> 80 % В
30 - 34 мин. 80 % В -> 100 % В
34 - 44 мин. 100 % В
45 - 55 мин. 0 % В

20 Профиль элюирования получали путем непрерывного измерения оптической плотности при 280 нм. Отношение лекарственного средства к антителу (DAR) определяли путем интегрирования пика с использованием Chromeleon 7.2 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

Образцовый результат показан на фигуре 1.

Таблица 5. Время удерживания модифицированных антител, конъюгированных с нуклеиновой кислотой, состоящей из 15 нуклеотидов (мАт-2) и 20 нуклеотидов (мАт-4).

относительное время удерживания → положение Q-метки ↓	мАт 2 (HER2)		мАт 4 (TfR)	
	не конъюгировано	конъюгировано с нуклеиновой кислотой	не конъюгировано	конъюгировано с нуклеиновой кислотой
мАт-2 (дт) (эталон)	0,246	н.о.	0,023	н.о.
НС118	0,311	0,685	н.о.	н.о.
НС177	0,221	0,647	н.о.	н.о.
НС297 асимметричное симметричное	н.о. 0,233	н.о. 0,446	0,023 0,070	0,472 0,670
НС341	0,269	0,566	н.о.	н.о.
НС401	0,247	0,634	н.о.	н.о.
НС446 асимметричное симметричное	н.о. 0,215	н.о. 0,745	0,015 0,001	0,845 0,994
LC110	0,402	0,732	н.о.	н.о.
LC143	0,291	0,691	н.о.	н.о.
LC214	0,246	0,501	0,020	0,556

5 Гидрофильный маркер имел время удерживания 9,25 мин. а гидрофобный маркер имел относительное время удерживания 25,9 мин. (мАт-2,) или 9,00 мин. и 24,7 мин. (мАт-4), соответственно.

10 На гидрофобность конъюгата влияет положение введенной Q-метки. Введение после положения LC110, LC214 и НС297 приводило не более чем к 2-кратному изменению неконъюгированного модифицированного антитела на конъюгированное, тогда как НС177 имело наименьшее относительное время удерживания среди всех протестированных внутренних сайтов вставки.

Пример 5**Анализ in vivo****Дизайн исследования**

5 Трансгенных мышей по FcRn человека (мышь hFcRn Tg32 +/+) случайным образом распределяли на 12 когорт (n = 3 на группу) в соответствии с 12 различными тестируемыми соединениями.

10 Все соединения основаны на одноплечем антителе к рецептору трансферрина, содержащему родственную пару полноразмерной легкой цепи антитела и пару полноразмерной тяжелой цепи антитела с фрагментом Fc-области антитела (шарнир - CH2 - CH3; DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALGA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS
15 LSLSPGK; SEQ ID NO: 33).

Q-метка имела аминокислотную последовательность GGGSYRYRQGGGS (SEQ ID NO: 25), вставленную после соответствующего положения.

Соединение 1: эталон без конъюгированной нуклеиновой кислоты.

20 Соединение 2: одна нуклеиновая кислота, конъюгированная с Q-меткой, вставленной после положения HC118 полноразмерной тяжелой цепи

Соединение 3: одна нуклеиновая кислота, конъюгированная с Q-меткой, вставленной после положения HC177 полноразмерной тяжелой цепи

Соединение 4: одна нуклеиновая кислота, конъюгированная с Q-меткой, вставленной после положения HC295 полноразмерной тяжелой цепи

25 Соединение 5: одна нуклеиновая кислота, конъюгированная с Q-меткой, вставленной после положения HC297 полноразмерной тяжелой цепи

Соединение 6: одна нуклеиновая кислота, конъюгированная с Q-меткой, вставленной после положения HC341 полноразмерной тяжелой цепи

30 Соединение 7: одна нуклеиновая кислота, конъюгированная с Q-меткой, вставленной после положения HC401 полноразмерной тяжелой цепи

Соединение 8: одна нуклеиновая кислота, конъюгированная с Q-меткой, вставленной после положения HC446 полноразмерной тяжелой цепи

Соединение 9: одна нуклеиновая кислота, конъюгированная с Q, вставленной после положения LC214

Соединение 10: две нуклеиновые кислоты, конъюгированные с Q-меткой, вставленной после положения HC297 полноразмерной тяжелой цепи и фрагмента Fc-области

5 Соединение 11: две нуклеиновые кислоты, конъюгированные с Q-меткой, вставленной после положения HC341 полноразмерной тяжелой цепи и фрагмента Fc-области

Соединение 12: две нуклеиновые кислоты, конъюгированная с Q-меткой, вставленной после положения HC446 полноразмерной тяжелой цепи и фрагмента Fc-области

10 Соединения были составлены в виде раствора в 20 мМ гистидина (рН 6) и вводились внутривенно в виде однократной номинальной дозы 20 мг/кг массы тела и объема дозы 2 мл/кг (в исключительных случаях соединение 1 вводили в объеме дозы 3,3 мл/кг и уровне дозы 16,7 мг/кг). Каждый состав вводили медленным болюсом в одну из двух боковых хвостовых вен. Серийный микроотбор проб крови (20 мкл/точка времени/мышь) осуществляли путем
15 пункции хвостовой вены. Образцы крови собирали через 5 минут, 1 час, 7 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов и 336 часов после введения дозы в покрытую K3-EDTA Minivette® РОСТ. После заполнения Minivette® кровь немедленно переносили в пробирку Eppendorf Tube ® для ПЦР емкостью 0,2 мл и
20 центрифугировали при 4°C, примерно 10 000 x g, примерно 5 мин. Для терминального отбора проб кровь собирали пункцией сердца и переносили в полипропиленовые пробирки, покрытые K3-EDTA. Образцы плазмы хранились при температуре -20°C для дальнейшей обработки и анализа.

Биоанализ

25 Фармакокинетику (ФК) соединений определяли двумя отдельными методами: один метод для количественного определения компонента антитела и второй метод для количественного определения компонента запертой нуклеиновой кислоты конъюгата.

30 Для определения ФК в образцах плазмы использовали общий метод электрохемилюминесцентного иммуноанализа (ECLIA), специфичный для доменов CH2 человека, на приборе cobas® e411 (Roche Diagnostics GmbH, Мангейм, Германия) в условиях, не соответствующих GLP, на основе Stubenrauch et al. Вкратце, тестируемые образцы поэтапно добавляли в сосуд для обнаружения с первым антителом для обнаружения (биотинилированным),

вторым антителом для обнаружения (рутенилированным) и SA-гранулами. Калибровочный диапазон конкретных стандартных кривых для каждого из соединений составлял от 0,69 нг/мл до 1500 нг/мл аналитической концентрации в 1% мышинной плазме C57BL/6. Аналитическая чувствительность составила 69 нг/мл в 100% плазме. Стандартные кривые, контроль качества и разведения образцов получали в буфере для анализа, включающем плазму мышей C57BL/6, что приводило к концентрации матрицы 1%. Образцы плазмы анализировали в двух разных разведениях (от 1:100 до 1:800).

Идентичные образцы плазмы анализировали с использованием гибридационного иммуноферментного анализа (hELISA) в условиях, не соответствующих GLP.

Для метода hELISA стандарты, контроль качества и предварительно разведенные образцы получали с использованием неконъюгированной нуклеиновой кислоты в качестве эталона. Зонд биотинилированного захватывающего олигонуклеотида и зонд диоксигенилированного олигонуклеотида для обнаружения добавляли для гибридизации и переносили на покрытый стрептавидином микротитровальный планшет. Для обнаружения использовали поликлональные Fab-фрагменты анти-диоксигенина-POD и раствор ТМБ. Интенсивность цвета анализировали фотометрически при длине волны 450 нм (эталонная длина волны 690 нм). Интенсивность окраски была пропорциональна концентрации анализируемого вещества в исследуемом образце. Калибровочный диапазон стандартной кривой для аналитической концентрации от 0,8 до 111 пМ в 1% мышинной плазме C57BL/6. Для анализа образцов плазмы, стандартной кривой и контроля качества все разведения получали в аналитическом буфере, включающем плазму мышей C57BL/6, что приводило к концентрации матрицы 1%. Образцы плазмы анализировали в двух разных разведениях (от 1:100 до 1:400 000). Аналитическая чувствительность составила 90 пМ в 100 % плазме.

Результаты

Таблица 6. Определены скорости клиренса конъюгатов антитело-нуклеиновая кислота.

Сайт конъюгации	Клиренс часть антитела (мл/день/кг) [CV]	Клиренс часть ASO (мл/день/кг) [CV]
Соединение 1	23 [4,7%]	-
Соединение 2	83,2 [11,9%]	241 [7,8%]
Соединение 3	20,6 [17,4%]	92,1 [14,4%]
Соединение 4	10,8 [25,3%]	117 [15,4%]
Соединение 5	14,4 [15,5%]	85,7 [9,7%]
Соединение 6	33,9 [3,9%]	231 [7,9%]
Соединение 7	29,4 [8,2%]	166 [21,8%]
Соединение 8	46,2 [13,4%]	279 [4,6%]
Соединение 9	23,9 [4%]	105 [15,4%]
Соединение 10	28,6 [14,5%]	145 [15,2%]
Соединение 11	214 [20,3%]	219 [4,8%]
Соединение 12	152 [29,7%]	190 [14,7%]

ССЫЛКИ НА ЛИТЕРАТУРНЫЕ ИСТОЧНИКИ

- 5 - Adem, Y.T., et al., «Auristatin Antibody Drug Conjugate Physical Instability and the Role of Drug Payload», *Bioconj. Chem.* 25 (2014) 656-664; <https://doi.org/10.1021/bc400439x>.
- Agarwal, P. and Bertozzi, C. R., «Site-specific antibody-drug conjugates: the nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development», *Bioconj. Chem.* 26 (2015) 176-192; doi:10.1021/bc5004982.
- 10 - Ando, H., et al., «Purification and Characteristics of a Novel Transglutaminase Derived from Microorganisms», *Agri. Biol. Chem.* 53 (2014) 2613-2617; doi:10.1080/00021369.1989.10869735.
- Chichili, V.P.R., et al., «Linkers in the structural biology of protein-protein interactions», *Prot. Sci.* 22 (2013) 153-167; <https://doi.org/10.1002/pro.2206>.
- 15 - Steffen, W., et al., «Discovery of a microbial transglutaminase enabling highly site-specific labeling of proteins», *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 15622-15635; doi:10.1074/jbc.M117.797811.
- Stubenrauch, K., et al., «Evaluation of an immunoassay for human-specific quantitation of therapeutic antibodies in serum samples from non-human primates», *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 1003-1008; doi: 20 10.1016/j.jpba.2009.01.030.
- Strop, P., et al., «Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates», *Chem. Biol.* 20 (2013) 161-167; doi:10.1016/j.chembiol.2013.01.010.
- WO 2021/174091
- 25 - WO 2017/102759
- Zhou, Q. and Kim, J., «Advances in the Development of Site-Specific Antibody-Drug Conjugation», *Anticancer Agents Med. Chem.* 15 (2015) 828-836; doi: 10.2174/1871520615666150302125448.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированное антитело, содержащее по меньшей мере тяжелую цепь антитела, при этом тяжелая цепь антитела содержит один, или два, или три, или четыре, или более первых сайтов распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 118 (НС118), положение 177 (НС177), положение 297 (НС297), положение 341 (НС341) и положение 401 (НС401) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них.

2. Модифицированное антитело, содержащее по меньшей мере легкую цепь антитела, при этом легкая цепь антитела содержит один, или два, или три, или четыре, или более первых сайтов распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 110 (LC110), положение 143 (LC143) и положение 214 (LC214) легкой цепи антитела (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них.

3. Модифицированное антитело, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь и/или легкая цепь содержит один, или два, или три, или четыре, или более первых сайтов распознавания трансглутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 110 (LC110), положение 143 (LC143) и положение 214 (LC214) легкой цепи антитела, и положение 118 (НС118), положение 177 (НС177), положение 297 (НС297), положение 341 (НС341) и положение 401 (НС401) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них.

4. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-3, в котором первый сайт распознавания KalbTG находится внутри аминокислотной последовательности соответствующей цепи антитела.

5. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-4, причем модифицированное антитело дополнительно содержит первый сайт распознавания KalbTG на С-конце тяжелой цепи антитела или слит с ним.

6. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-5, причем модифицированное антитело дополнительно содержит первый сайт

распознавания KalbTG в положении 446 (HC446) или положении 447 (HC447) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату).

7. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-6, причем модифицированное антитело содержит две идентичные тяжелые цепи антитела.

5 8. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-6, причем модифицированное антитело содержит две разные тяжелые цепи антитела.

9. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-8, причем модифицированное антитело содержит в дополнение к сайту(ам) распознавания KalbTG следующие мутации (нумерация согласно Кабату):

- 10 а) L234A, L235A в обоих полипептидах Fc-области;
 б) P329G в обоих полипептидах Fc-области;
 в) T366W в одном полипептиде Fc-области и T366S, L368A, Y407V в другом полипептиде Fc-области;
 г) S354C в одном полипептиде Fc-области и Y349C в другом
 15 полипептиде Fc-области;
 д) а) и б);
 е) а), и б), и в); или
 ж) а), и б), и в), и г).

20 10. Модифицированная Fc-область антитела, содержащая по меньшей мере один модифицированный полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела, при этом модифицированный полипептид Fc-области тяжелой цепи антитела содержит один, или два, или три, или четыре, или более первых сайтов распознавания трансклутаминазы из *Kutzneria albida* (KalbTG) в одном или более из положений, выбранных независимо друг от друга из группы положений, включающей положение 118 (HC118), положение 177 (HC177), положение 297 (HC297), положение 341 (HC341) и положение 401 (HC401) тяжелой цепи антитела (нумерация согласно Кабату), или вставленных после них.

25

30 11. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из пп. 1-10, причем первый(ые) сайт(ы) распознавания KalbTG независимо друг от друга выбран(ы) из группы первых сайтов распознавания, содержащих аминокислотные последовательности RYGQR (SEQ ID NO: 11), RWRQR (SEQ ID NO: 12), YRQRT (SEQ ID NO: 13), IRQRQ (SEQ ID NO: 14), FRYRQ (SEQ ID NO: 15), YRYRQ (SEQ ID NO: 17) и RVRQR (SEQ ID NO: 18).

12. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из пп. 1-11, причем сайт(ы) распознавания KalbTG вставлен(ы) после положения.

5 13. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по любому из пп. 1-12, причем сайт(ы) распознавания KalbTG расположен(ы) между двумя гибкими пептидными линкерами.

10 14. Модифицированное антитело или модифицированная Fc-область антитела по п. 13, причем пептидные линкеры содержат одну, или две, или три, или четыре или пять повторяющихся единиц, каждая из которых имеет аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly-Ser (n=1, 2, 3, 4, 5; SEQ ID NO: 19).

15 15. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-14, причем модифицированное антитело содержит константную область тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 01
 A⁺STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS⁺GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN⁺STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG⁺QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD⁺GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG⁺⁺,

20 при этом после одного или более положений, обозначенных «⁺», вставлен первый сайт распознавания KalbTG, и при этом после положения, обозначенного «⁺⁺», первый сайт распознавания KalbTG вставлен только в том случае, если
 25 дополнительный первый сайт распознавания KalbTG вставлен в одно из положений, обозначенных «⁺».

30 16. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-14, причем модифицированное антитело содержит константную область тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 02
 A⁺STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS⁺GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN⁺STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG⁺QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG

QPENNYKTTTPVLDSD⁺GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPG⁺⁺, при этом после одного или более положений, обозначенных «⁺»,
 вставлен первый сайт распознавания KalbTG, и при этом после положения,
 обозначенного «⁺⁺», первый сайт распознавания KalbTG вставлен только в том
 5 случае, если дополнительный первый сайт распознавания KalbTG вставлен в
 одно из положений, обозначенных «⁺».

17. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-14, причем
 модифицированное антитело содержит константную область тяжелой цепи
 антитела с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 03

10 A⁺STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSS⁺GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP
 PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQFN⁺STFRVVSVLTVHVDWLNQKEYKCKVSNKGLPAPIEK
 TISKTKG⁺QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 15 NNYKTTTPMLDS⁺GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
 LSLSP G⁺⁺,

при этом после одного или более положений, обозначенных «⁺», вставлен
 первый сайт распознавания KalbTG, и при этом после положения, обозначенного
 «⁺⁺», первый сайт распознавания KalbTG вставлен только в том случае, если
 20 дополнительный первый сайт распознавания KalbTG вставлен в одно из
 положений, обозначенных «⁺».

18. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-14, причем
 модифицированное антитело содержит константную область тяжелой цепи
 антитела с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 04

25 A⁺STKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSS⁺GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDT
 THTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYN⁺STFRVVSVLTVLHQDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK
 30 G⁺QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNT
 TPPMLDS⁺GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG⁺
⁺,

при этом после одного или более положений, обозначенных «⁺», вставлен
 первый сайт распознавания KalbTG, и при этом после положения, обозначенного

«⁺»», первый сайт распознавания KalbTG вставлен только в случае, если дополнительный первый сайт распознавания KalbTG вставлен в одно из положений, обозначенных «⁺».

5 19. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-14, причем модифицированное антитело содержит константную область тяжелой цепи антитела с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 05
 A⁺STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFP
 AVLQSS⁺GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVKDKRVSPNMPVPHAN
 HAQAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG
 10 VEVHNAKTKPREEQFN⁺STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
 KTISKAKG⁺QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDS⁺GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNNHYTQ
 KSLSLSL G⁺», при этом после одного или более положений, обозначенных «⁺»,
 вставлен первый сайт распознавания KalbTG, и при этом после положения,
 15 обозначенного «⁺», первый сайт распознавания KalbTG вставлен только в том
 случае, если дополнительный первый сайт распознавания KalbTG вставлен в
 одно из положений, обозначенных «⁺».

20 20. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-14, причем модифицированное антитело содержит константную область тяжелой цепи антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

21. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-14, причем модифицированное антитело содержит константную область тяжелой цепи антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

25 22. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-14, причем модифицированное антитело содержит константную область тяжелой цепи антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

30 23. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-22, причем модифицированное антитело содержит константную область легкой цепи антитела с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 06
 RTV⁺AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE⁺AKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
 C⁺,

при этом после одного или более положений, обозначенных «⁺», вставлен первый сайт распознавания KalbTG.

24. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-22, причем модифицированное антитело содержит константную область легкой цепи антитела с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 07 QPK⁺AAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA⁺VTVAWKADSSPVKAGVE
 5 TTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVARTEC⁺S при этом после одного или более положений, обозначенных «⁺», вставлен первый сайт распознавания KalbTG.

25. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-22, причем модифицированное антитело содержит константную область легкой цепи антитела, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.
 10

26. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-25, причем модифицированное антитело специфически связывается с рецептором, индуцируя рецептор-опосредованный эндоцитоз.

27. Модифицированное антитело по любому из пп. 1-26, причем модифицированное антитело специфически связывается с антигеном, выбранным из группы антигенов, состоящей из рецептора 1 трансферрина человека (TfR1), рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 человека (IGF-1R), белка 1, родственного рецептору липопротеинов низкой плотности человека (LRP1), и белка 8, родственного рецептору липопротеинов низкой плотности человека (LRP8).
 15
 20

28. Ковалентный конъюгат, содержащий:

(i) модифицированное антитело по любому из пп. 1-27, и (ii) один или более не относящихся к антителу доменов, ковалентно конъюгированных с одним или более первыми сайтами распознавания KalbTG модифицированного антитела (i), причем не относящийся к антителу домен содержит второй сайт распознавания KalbTG.
 25

29. Ковалентный конъюгат по п. 28, в котором не относящийся к антителу домен содержит:

(i) терапевтический компонент,
 30 (ii) второй сайт распознавания KalbTG, который комплементарен первому сайту распознавания, присутствующему в модифицированном антителе, и
 (iii) необязательно второй линкер между терапевтическим компонентом и вторым сайтом распознавания.

30. Ковалентный конъюгат по любому из пп. 28-29, в котором второй сайт распознавания KalbTG представляет собой К-метку, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности пептидной последовательности RYESK (SEQ ID NO: 16).

5 31. Ковалентный конъюгат по любому из пп. 29-30, в котором второй линкер представляет собой алкильный линкер, или полиэтиленовый линкер, или пептидный линкер, или их смесь.

10 32. Способ ковалентного конъюгирования модифицированного антитела по любому из пп. 1-27 с терапевтическим компонентом, причем способ включает:

а) предоставление модифицированного антитела по любому из пп. 1-27,

б) предоставление не относящегося к антителу домена, причем не относящийся к антителу домен содержит:

15 (i) терапевтический компонент,

(ii) второй сайт распознавания KalbTG, который комплементарен первому сайту распознавания, присутствующему в модифицированном антителе, представленном в пункте (i), и

20 (iii) необязательно второй линкер между терапевтическим компонентом и вторым сайтом распознавания KalbTG; и

25 в) инкубирование модифицированного антитела из а) и не относящегося к антителу домена из б) в присутствии KalbTG или его функционально активного варианта или фрагмента и, образование таким образом изопептидной связи между первым и вторым сайтом распознавания KalbTG,

и конъюгирование таким образом модифицированного антитела с терапевтическим компонентом.

33. Способ по п. 32, в котором второй сайт распознавания KalbTG имеет аминокислотную последовательность RYESK (SEQ ID NO: 16).

30 34. Модифицированное антитело, модифицированная Fc-область, ковалентный конъюгат и способ по любому из пп. 1-33, причем KalbTG содержит аминокислотную последовательность (трехбуквенный код) Met His Lys Trp Phe Leu Arg Ala Ala Val Val Ala Ala Val Gly Phe Gly Leu Pro Thr Leu Ile Ala Thr Thr Ala Gln Ala Ala Ala Val Ala Ala Pro Thr Pro Arg Ala Pro Leu

Ala Pro Pro Leu Ala Glu Asp Arg Ser Tyr Arg Thr Trp Arg Val Glu Asp Tyr Val Glu
 Ala Trp Glu Arg Tyr His Gly Arg Glu Met Thr Glu Asp Glu Arg Glu Asn Leu Ala
 Arg Gly Cys Ile Gly Val Thr Val Val Asn Leu Asn Arg Glu Asp Leu Ser Asn Pro Pro
 5 Leu Asn Leu Ser Phe Gly Ser Leu Arg Thr Ala Glu Ala Val Gln Ala Ala Leu Asn Lys
 Ile Val Asp Thr His Pro Ser Pro Ala Gln Tyr Glu Ala Ala Val Ala Lys Asp Pro Ile
 Leu Lys Arg Leu Lys Asn Val Val Lys Ala Leu Pro Ser Trp Ile Asp Ser Ala Lys Leu
 Lys Ala Ser Ile Phe Ser Lys Arg Phe Tyr Ser Trp Gln Asn Pro Asp Trp Ser Glu Glu
 Arg Ala His Thr Thr Tyr Arg Pro Asp Arg Glu Thr Asp Gln Val Asp Met Ser Thr Tyr
 Arg Tyr Arg Ala Arg Pro Gly Tyr Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Asp Gln Asp
 10 Thr Asn Thr Trp Trp His Ala Asn His Glu Glu Pro Arg Met Val Val Tyr Gln Ser Thr
 Leu Arg His Tyr Ser Arg Pro Leu Gln Asp Phe Asp Glu Gln Val Phe Thr Val Ala Phe
 Ala Lys Lys Asp (SEQ ID NO: 31).

35. Фармацевтическая композиция, содержащая ковалентный конъюгат по любому из пп. 29-31 и 34.

15 36. Ковалентный конъюгат по любому из пп. 29-31 и 34 или полученный в соответствии со способом по любому из пп. 32-34 для применения в качестве лекарственного средства.

37. Применение по п. 36, причем неврологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из нейропатического расстройства, нейродегенеративного
 20 заболевания, рака, заболевания глаз, судорожного расстройства, лизосомальной болезни накопления, амилоидоза, вирусного или микробного заболевания, ишемии, поведенческого расстройства, воспаления ЦНС, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, рассеянного склероза, CD20-положительного рака с метастазами в головной мозг и HER2-положительного рака с метастазами в
 25 головной мозг.

38. Нуклеиновая кислота или композиция нуклеиновых кислот, кодирующая модифицированное антитело по любому из пп. 1-27.

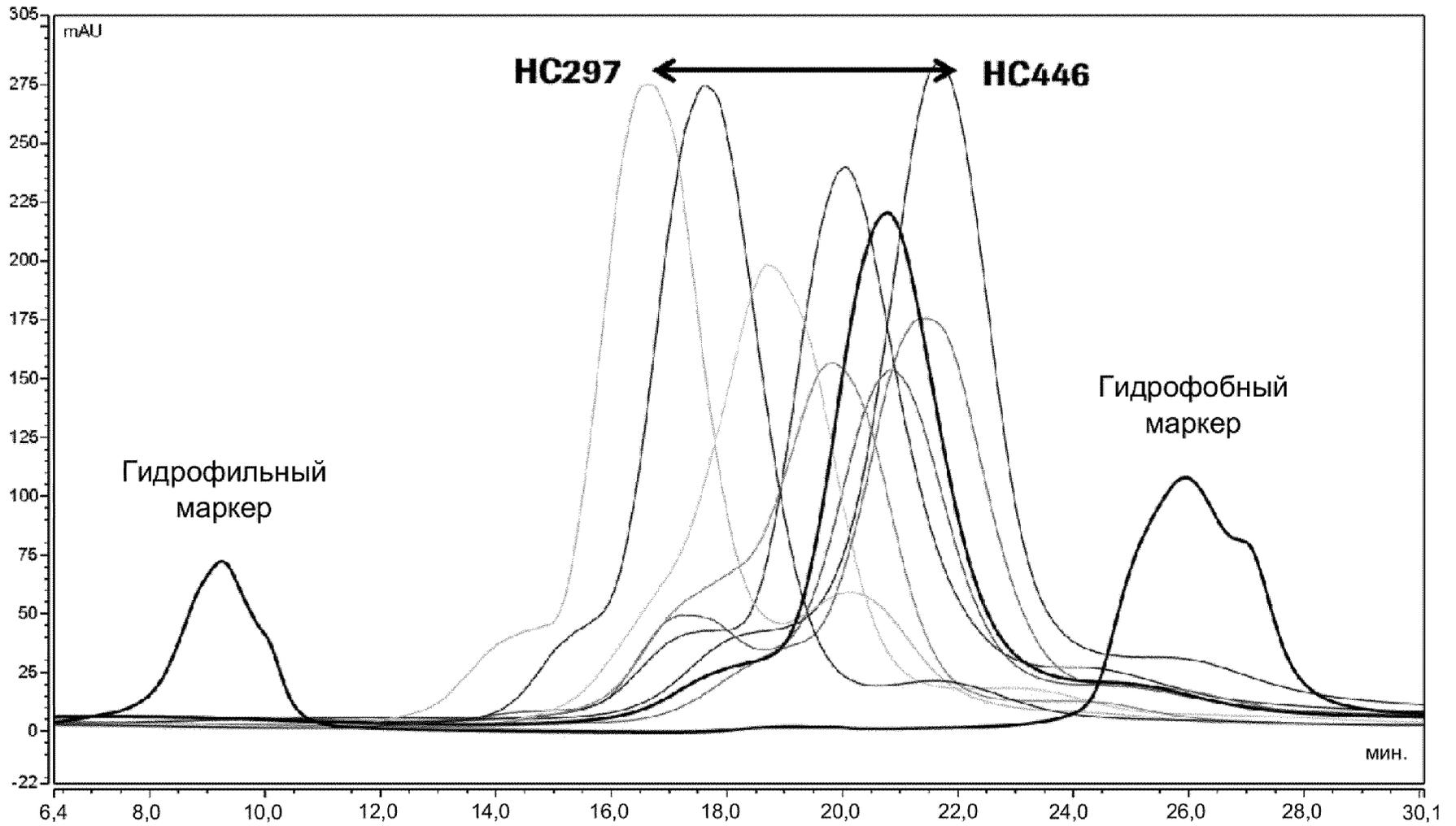
39. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту или композицию нуклеиновых кислот по п. 38.

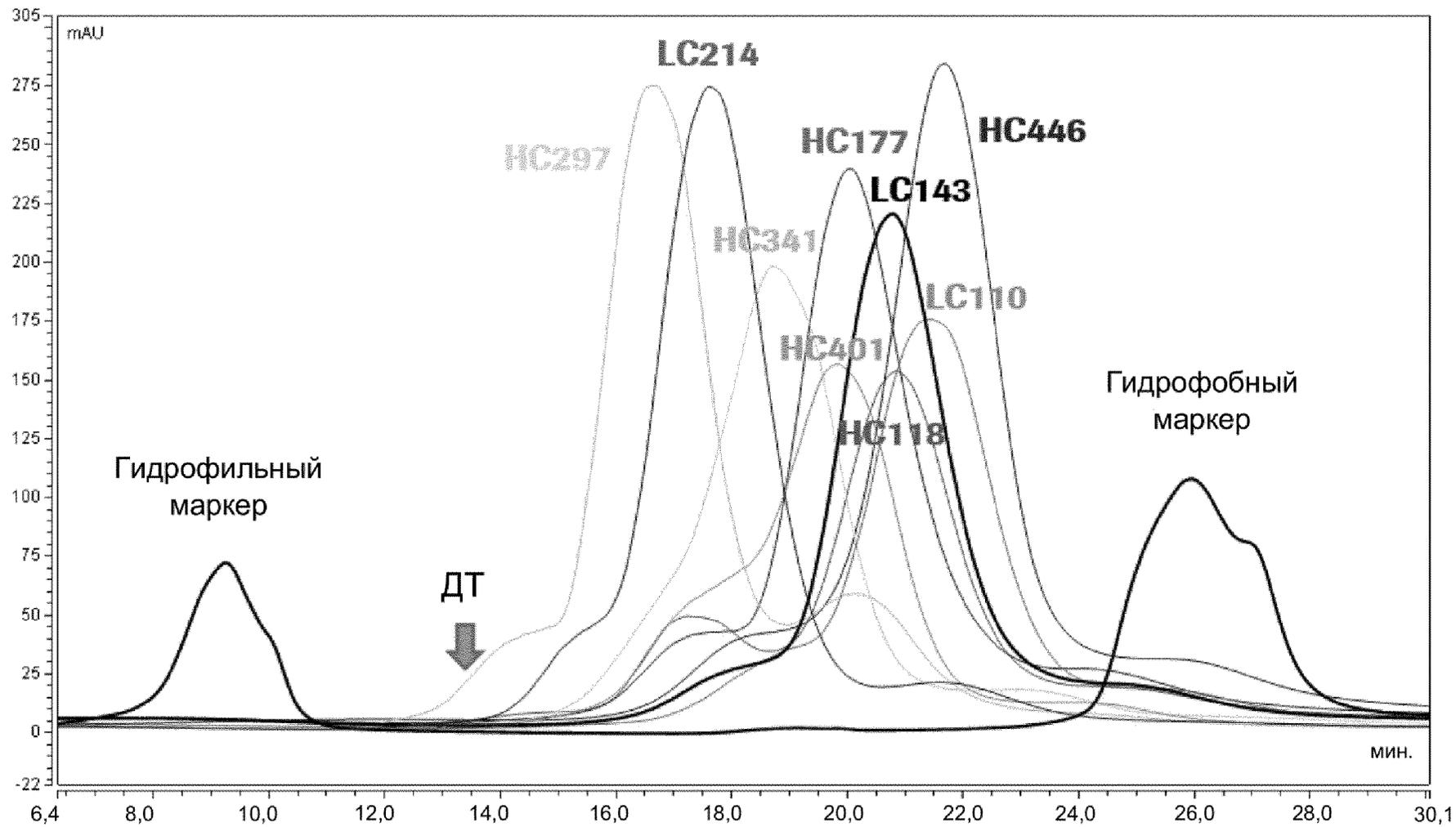
30 40. Способ получения модифицированного антитела по любому из пп. 1-27, включающий следующие шаги:

- культивирование клетки по п. 39,
- извлечение модифицированного антитела из клетки и/или среды для культивирования, и

получение таким образом модифицированного антитела по любому из пп.
1-27.

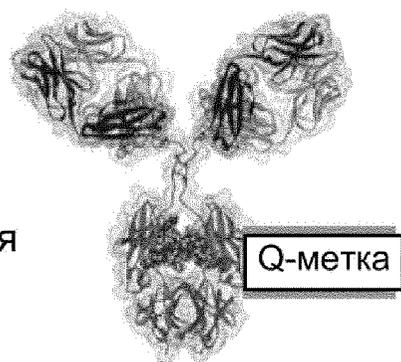
Фигура 1А





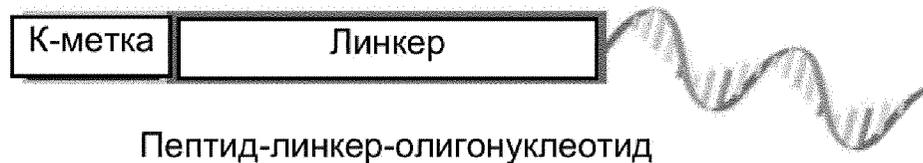
Фигура 2

Одношаговая реакция



Реакция
КТГ

+



Антитело

Пептид-линкер-олигонуклеотид