

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036225**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.15

(51) Int. Cl. **C07K 14/705 (2006.01)**
C07K 16/28 (2006.01)

(21) Номер заявки
201491686

(22) Дата подачи заявки
2013.03.13

(54) МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/610,494; 61/721,831; 61/751,286

(56) WO-A1-2009094561

(32) 2012.03.14; 2012.11.02; 2013.01.11

WO-A2-0109186

(33) US

WO-A1-2011147986

(43) 2014.12.30

WO-A2-2009120922

(86) PCT/US2013/030636

(87) WO 2013/138400 2013.09.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Пападопулос Николас Дж., Мерфи
Эндрю Дж., Экономидис Арис Н.,
Сиджнэр Кэтрин Диана (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение представляет мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и их применения. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает молекулу-мишень, и второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывает интернализующийся эффекторный белок. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению могут в некоторых вариантах осуществления являться биспецифическими антителами, которые способны к связыванию, как молекулы-мишени, так и интернализирующегося эффекторного белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения одновременное связывание молекулы-мишени и интернализирующегося эффекторного белка мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой по данному изобретению приводит к аттенуации активности молекулы-мишени в большей степени, чем связывание молекулы-мишени отдельно. В других вариантах осуществления изобретения молекула-мишень является ассоциированным с опухолью антигеном, и одновременное связывание ассоциированного с опухолью антигена и интернализирующегося эффекторного белка мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой по данному изобретению вызывает или облегчает направленное умерщвление опухолевых клеток.

B1

036225

036225

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к области терапевтических белков, и в частности, к области терапевтических белков, которые способны к инактивированию, блокированию, аттенуированию, элиминированию и/или снижению концентрации одной или более молекул-мишеней *in vitro* или *in vivo*.

Уровень техники

Для терапевтического лечения обычно требуется инактивация или блокирование одной или более молекул-мишеней, которые действуют на клетке или вблизи от клетки. Например, терапевтические средства на основе антитела обычно функционируют посредством связывания с конкретным антигеном, экспрессируемым на поверхности клетки, или с растворимым лигандом, тем самым препятствуя нормальной биологической активности антигена. Антитела и другие связывающие конструкторы, направленные против различных цитокинов (например, IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-22, IL-25, IL-33 и т.д.), или, например, их соответствующих рецепторов, как было показано, являются пригодными для лечения широкого набора человеческих недугов и заболеваний. Терапевтические агенты этого типа, как правило, функционируют посредством блокирования взаимодействия между цитокином и его рецептором для того, чтобы аттенуировать или ингибировать клеточную сигнализацию. В некоторых случаях, однако, может быть терапевтически выгодно инактивировать или ингибировать активность молекулы-мишени таким образом, который необязательно задействует блокирование ее физического взаимодействия с другим компонентом. Одним путем, в котором такая неблокирующая аттенуация молекулы-мишени может быть достигнута, может быть снижение внеклеточной концентрации или концентрации молекулы-мишени на клеточной поверхности. Хотя генетическая и основанная на нуклеиновой кислоте стратегии для снижения количества или концентрации заданной молекулы-мишени известны в данной области, такие стратегии часто являются чреватыми существенными техническими затруднениями и непредусмотренными побочными эффектами в терапевтических планах. Соответственно, альтернативные неблокирующие стратегии необходимы для облегчения инактивации или аттенуации различных молекул-мишеней для терапевтических целей.

Краткое описание сущности изобретения

Данное изобретение по меньшей мере частично основано на концепции аттенуирования или инактивирования молекулы-мишени облегчением или осуществлением физического соединения между молекулой-мишенью и интернализирующимся эффекторным белком. Посредством этого типа физического межмолекулярного связывания молекула-мишень может быть принудительно интернализирована в клетку вместе с интернализирующимся эффекторным белком и подвержена внутриклеточному деструктивному механизму или иным образом аттенуирована, изолирована или инактивирована. Этот механизм представляет новую и изобретательную стратегию для инактивирования или аттенуирования активности молекулы мишени без обязательного блокирования взаимодействия между молекулой-мишенью и ее партнерами по связыванию.

Соответственно, данное изобретение предоставляет мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая способна к одновременному связыванию молекулы-мишени (Т) и интернализирующегося эффекторного белка (Е). Более конкретно, данное изобретение предоставляет мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую первый антигенсвязывающий домен (D1) и второй антигенсвязывающий домен (D2), где D1 специфично связывает Т и D2 специфично связывает Е и где одновременное связывание Т и Е мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой аттенуирует активность Т в большей степени, чем связывание Т посредством D1 отдельно. Усиленная аттенуация активности Т может быть обусловленной вынужденной интернализацией/деградацией Т посредством его физической связи с Е; однако другие механизмы действия возможны и не исключаются из объема данного изобретения.

В дополнение, данное изобретение представляет способы применения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы для инактивирования или аттенуирования активности молекулы мишени (Т). В частности, данное изобретение предоставляет способ инактивирования или аттенуирования активности Т посредством приведения в контакт Т и интернализирующегося эффекторного белка (Е) с мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, где мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый антигенсвязывающий домен (D1) и второй антигенсвязывающий домен (D2), где D1 специфично связывает Т и D2 специфично связывает Е и где одновременное связывание Т и Е мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой аттенуирует активность Т в большей степени, чем связывание Т посредством D1 отдельно.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения D1 и/или D2 содержат(ит) по меньшей мере одну переменную область антитела. Например, мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула может в некоторых вариантах осуществления являться биспецифическим антителом, где D1 содержит пару переменных областей легкой и тяжелой цепи антитела (HCVR/LCVR), которая специфично связывает Т, и где D2 содержит пару HCVR/LCVR, которая специфично связывает Е. Альтернативно, D1 и/или D2 может содержать пептид или полипептид, который специфично взаимодействует с молекулой-мишенью (Т) и/или интернализирующимся эффекторным белком (Е). Например, если молекула-мишень является рецептором на клеточной поверхности, то D1 может содержать участок лиганда, который спе-

цифично связывает рецепторную молекулу-мишень на клеточной поверхности. Подобным образом, если интернализирующийся эффекторный белок является интернализирующимся рецептором на клеточной поверхности, то D2 может содержать участок лиганда, который специфично связывает интернализирующийся рецептор на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления D1 содержит варибельную область антитела, которая специфично связывает Т, и D2 содержит пептид или полипептид, который специфично связывает Е. В еще одних вариантах осуществления D1 содержит пептид или полипептид, который специфично связывает Т, и D2 содержит варибельную область антитела, которая специфично связывает Е. Однако в любой конфигурации конечным результатом является то, что Т и Е способны к тому, чтобы быть связанными физически напрямую или опосредованно через одновременное связывание Т и Е посредством мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы.

Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 (панели А-Д) представляет схематические представления четырех общих иллюстративных механизмов действия мультиспецифических антигенсвязывающих молекул данного изобретения.

В каждой проиллюстрированной конфигурации D1 является первым антигенсвязывающим доменом; D2 является вторым антигенсвязывающим доменом; Т является молекулой-мишенью; Е является интернализирующимся эффекторным белком и R является рецептором, который интернализуется при связывании Е. Панель А изображает ситуацию, в которой оба Т и Е являются ассоциированными с мембраной. Панель В изображает ситуацию, в которой Т является растворимым и Е ассоциированным с мембраной. Панель С изображает ситуацию, в которой Т является ассоциированным с мембраной и Е является растворимым белком, который взаимодействует с и интернализуется в клетку посредством взаимодействия Е и R. Панель D изображает ситуацию, в которой Т является растворимым и Е является растворимым белком, который взаимодействует с и интернализуется в клетку посредством взаимодействия Е и R.

Фиг. 2 демонстрирует результаты иммунопреципитационного эксперимента, выполненного на двух различных клетках (Cell-1, экспрессирующая FcγR1 отдельно, и Cell-2, экспрессирующая Kgm2 и FcγR1) после инкубации в течение различных промежутков времени (0, 15, 30 и 60 мин) с DKK1-mFc мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой.

Фиг. 3 демонстрирует относительную IL-4-индуцированную люминесценцию, выработанную Stat6-luc репортерными клетками НЕК293 в присутствии и в отсутствие мультиспецифического антигенсвязывающего белка анти-IL-4R/анти-CD63 ("Ab конъюгат") или контрольных конструкторов ("контроль 1" и "контроль 2") с различными концентрациями IL-4.

Фиг. 4 демонстрирует результаты эксперимента осуществленного таким же образом, как в эксперименте, показанном на фиг. 3, за исключением того, что экспрессия CD63 была значительно снижена в репортерной клеточной линии миРНК, направленной против CD63.

Фиг. 5 демонстрирует результаты эксперимента, осуществленного подобным образом как в эксперименте, показанных на фиг. 3 и 4, за исключением того, что репортерные клетки инкубировали с мультиспецифическим антигенсвязывающим белком ("Ab конъюгат") или контрольными конструкторами ("контроль 1" и "контроль 2") в течение 2 ч или в течение ночи перед добавлением лиганда IL-4. Верхний ряд столбиковой диаграммы представляет результаты экспериментов, проведенных в клетках, экспрессирующих нормальные уровни CD63 ("нетрансфицированные"), тогда как нижний ряд столбиковой диаграммы представляет результаты экспериментов, проведенных в клетках, в которых экспрессия CD63 была значительно снижена в репортерной клеточной линии миРНК, направленной против CD63.

Фиг. 6 демонстрирует результаты эксперимента, осуществленного образом, подобным экспериментам, показанным на фиг. 3 и 4, за исключением того, что репортерные клетки инкубировали с мультиспецифическим антигенсвязывающим белком анти-IL-4R/анти-CD63 ("Ab конъюгат") или контрольными конструкторами ("контроль 1" и "контроль 2") в течение 15, 30 мин, 1 или 2 ч перед добавлением лиганда IL-4.

Фиг. 7 демонстрирует результаты эксперимента, в котором репортерные клетки Stat6-luc обрабатывали с 10 пМ IL-4 в присутствии различных разбавлений биспецифического антитела анти-IL-4R × анти-CD63 ("биспецифического") или контрольных конструкторов (анти-IL-4R моноспецифическое или имитационно биспецифическое, которое связывает только IL-4R).

Фиг. 8 демонстрирует результаты экспериментов, в которых клетки НЕК293 обрабатывали с SOST конструктором, меченным с тус меткой и рН-чувствительной меткой (которая вырабатывает флуоресцентный сигнал при низком рН), вместе с различными моноспецифическими и биспецифическими антителами, как показано. Результаты выражены исходя из количества флуоресцентных точек (т.е. меченых везикул) в расчете на клетку. Панель А демонстрирует результаты после инкубации на льду в течение 3 ч, панель В демонстрирует результаты после 1 ч инкубации при 37°C, и панель С демонстрирует результаты после 3 ч инкубации при 37°C.

Фиг. 9 демонстрирует результаты экспериментов, в которых клетки HEK293 обрабатывали с флуоресцентно меченым липополисахаридом (LPS) из *E. coli* (Панель А) или *S. minnesota* (Панель В), вместе с биспецифическим антителом анти-CD63 × анти-LPS, контрольными антителами или только с LPS, в течение различного времени, с последующим гашением неинтернализированного (т.е. связанного с поверхностью) флуорофора. Флуоресцентный сигнал вследствие этого отражает интернализируемый LPS при различных условиях. Результаты выражены исходя из количества флуоресцентных точек (т.е. меченых везикул) в расчете на клетку.

Подробное описание

Перед описанием данного изобретения необходимо понимать, что это изобретение не ограничено конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, так как такие способы и условия могут варьироваться. Необходимо понимать, что терминология, применяемая в данном документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не подразумевается, она является ограничивающей, так как объем данного изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если особым образом не оговорено иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, что общепринятое среди рядовых специалистов в области, к которой относится данное изобретение. В используемом в данном документе значении термин "приблизительно", когда он применяется по отношению к конкретной приведенной численной величине, означает, что величина может варьироваться от приведенной величины не более чем на 1%. Например, в используемом в данном документе значении экспрессия "приблизительно 100" включает 99 и 101 и все величины (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть применены на практике или тестировании данного изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны далее.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы.

Авторы данного открытия неожиданно обнаружили, что активность молекулы-мишени может быть аттенуирована связыванием молекулы-мишени с интернализирующимся эффекторным белком через мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу.

Соответственно, данное изобретение представляет мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен (также обозначаемый в данном документе "D1") и второй антигенсвязывающий домен (также обозначаемый в данном документе "D2"). Каждый из D1 и D2 связывает различные молекулы. D1 специфично связывает "молекулу-мишень". Молекула-мишень также обозначается в данном документе "Т". D2 специфично связывает "интернализующийся эффекторный белок". Интернализирующийся эффекторный белок также обозначается в данном документе "Е". В соответствии с данным изобретением одновременное связывание Т и Е мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой аттенуирует активность Т в большей степени, чем связывание Т посредством D1 отдельно. В используемом в данном документе значении выражение "одновременное связывание" в контексте мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы означает, что мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула способна к взаимодействию как с молекулой-мишенью (Т), так и с интернализирующимся эффекторным белком (Е) по меньшей мере в течение некоторого промежутка времени при физиологически релевантных условиях для облегчения физической связи между Т и Е. Связывание мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы с Т и Е компонентами может быть последовательным; например, мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула может сперва связывать Т и затем связывать Е или она может сперва связывать Е первый и затем связывать Т. В любом случае, если Т и Е являются связанными мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой в течение некоторого промежутка времени (независимо от последовательного порядка связывания), будет считаться, что мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула "одновременно связывает" Т и Е в целях данного открытия. Не желая быть связанным какой-либо теорией, полагается, что усиленная инактивация Т вызвана интернализацией и деструктивным изменением пути Т в клетке из-за его физической связи с Е. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению, таким образом, пригодны для инактивирования и/или снижения активности и/или внеклеточной концентрации молекулы мишени без прямого блокирования или антагонирования функции молекулы-мишени.

В соответствии с данным изобретением мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула может являться одиночным многофункциональным полипептидом или она может являться мультимерным комплексом двух или более полипептидов, которые являются ковалентно или нековалентно ассоциированными друг с другом. Как будет очевидно из данного открытия любой антигенсвязывающий конструктор, который имеет способность одновременно связывать Т и Е молекулу, считается мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой. Любая из мультиспецифических антигенсвязывающих молекул по изобретению или ее варианты могут быть сконструированы с применением стандартных технологий молекулярной биологии (например, рекомбинантная ДНК и технология экспрессии белка), как известно рядовому специалисту в данной области.

Антигенсвязывающие домены.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению содержат по меньшей мере два отдельных антигенсвязывающих домена (D1 и D2). В используемом в данном документе значении выражение "антигенсвязывающий домен" означает любой пептид, полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты, молекулу остова типа, молекулу для пептидного дисплея или полипептид-содержащий конструктор, который способен к специфичному связыванию конкретного целевого антигена.

Термин "специфично связывает" или подобный в используемом в данном документе значении означает, что антигенсвязывающий домен формирует комплекс с конкретным антигеном, характеризуемый константой диссоциации (K_D) 500 пМ или менее, и не связывает другие неродственные антигены в условиях обычного тестирования. "Неродственные антигены" являются белками, пептидами или полипептидами, которые имеют менее чем 95% идентичности аминокислот друг с другом.

Иллюстративные категории антигенсвязывающих доменов, которые могут быть применены в контексте данного изобретения, содержат антитела, антигенсвязывающие участки антител, пептиды, которые специфично взаимодействуют с конкретным антигеном (например, пептидные антитела), рецепторные молекулы, которые специфично взаимодействуют с конкретным антигеном, белки, содержащие лигандсвязывающий участок рецептора, который специфично связывает конкретный антиген, антигенсвязывающие остовы (например, DARPin, белки с HEAT-повтором, белки с ARM-повтором, белки с тетрарикопептидным повтором и другие остовы, основанные на встречающихся в природе повторах белки и т.д., [см., например, Boersma and Pluckthun, 2011, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:849-857 и приведенные там ссылки]), и аптамеры или их участки.

В некоторых вариантах осуществления, в которых молекула-мишень или интернализирующийся эффекторный белок представляет собой рецепторную молекулу, "антигенсвязывающий домен" в целях данного изобретения может содержать или состоять из лиганда или участка лиганда, который является специфичным к рецептору. Например, если молекула-мишень (Т) представляет собой IL-4R, D1 компонент мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы может содержать лиганд IL-4 или участок IL-4 лиганда, который способен к специфичному взаимодействию с IL-4R; или, если интернализирующийся эффекторный белок (Е) является трансферриновым рецептором, D2 компонент мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы может содержать трансферрин или участок трансферрина, который способен к специфичному взаимодействию с трансферриновым рецептором.

В некоторых вариантах осуществления, в которых молекула-мишень или интернализирующийся эффекторный белок представляет собой лиганд, который специфично распознается конкретным рецептором (например, растворимая молекула-мишень), "антигенсвязывающий домен" в целях данного изобретения может содержать или состоять из рецептора или лигандсвязывающего участка рецептора. Например, если молекула-мишень (Т) представляет собой IL-6, то D1 компонент мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы может содержать лигандсвязывающий домен IL-6 рецептора; или, если интернализирующийся эффекторный белок (Е) представляет собой ненапрямую интернализируемый белок (этот термин определен в другом месте в данном документе), D2 компонент мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы может содержать лигандсвязывающий домен рецептора, специфичный к Е.

Способы определения того, если две молекулы специфично связывают друг друга, хорошо известны в данной области и содержат, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Например, антигенсвязывающий домен, как это применяется в контексте данного изобретения, включает полипептиды, которые связывают конкретный антиген (например, молекулу-мишень [Т] или интернализирующийся эффекторный белок [Е]) или их участок с K_D менее чем приблизительно 500 пМ, менее чем приблизительно 400 пМ, менее чем приблизительно 300 пМ, менее чем приблизительно 200 пМ, менее чем приблизительно 100 пМ, менее чем приблизительно 90 пМ, менее чем приблизительно 80 пМ, менее чем приблизительно 70 пМ, менее чем приблизительно 60 пМ, менее чем приблизительно 50 пМ, менее чем приблизительно 40 пМ, менее чем приблизительно 30 пМ, менее чем приблизительно 20 пМ, менее чем приблизительно 10 пМ, менее чем приблизительно 5 пМ, менее чем приблизительно 4 пМ, менее чем приблизительно 2 пМ, менее чем приблизительно 1 пМ, менее чем приблизительно 0,5 пМ, менее чем приблизительно 0,2 пМ, менее чем приблизительно 0,1 пМ или менее чем приблизительно 0,05 пМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс" в используемом в данном документе значении относится к оптическому явлению, которое позволяет анализ взаимодействий в реальном времени детектированием изменений в концентрациях белка внутри биосенсорной матрицы, например, с применением системы BiAcore™ (Biacore Life Sciences division of GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Термин " K_d " в используемом в данном документе значении означает равновесную константу диссоциации конкретного белок-белкового взаимодействия (например, взаимодействие антитело-антиген). Если особо не указано иное, величины K_D , раскрытые в данном документе, относятся к величинам K_D , определенным анализом поверхностным плазмонным резонансом при 25°C.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител.

Как указано выше "антигенсвязывающий домен" (D1 и/или D2) может содержать или состоять из антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела. Термин "антитело" в используемом в данном документе значении означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфично связывается с или взаимодействует с конкретным антигеном (например, T или E). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулинов, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные внутренними дисульфидными связями, так же как и их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). V_H и V_L области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, обозначаемые определяющие комплементарности области (CDR), разделенные областями, которые являются более консервативными, обозначаемыми каркасные области (FR). Каждая V_H и V_L составлена из трех CDR и четырех FR, упорядоченных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В других вариантах осуществления изобретения FR антитела по изобретению (или их антигенсвязывающий участок) могут являться идентичными человеческим последовательностям зародышевой линии или могут быть естественно искусственно модифицированными. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основании анализа участок за участком (side-by-side) двух или более CDR.

D1 и/или D2 компоненты мультиспецифических антигенсвязывающих молекул по данному изобретению могут содержать или состоять из антигенсвязывающих фрагментов полных молекул антитела. Термины "антигенсвязывающий участок" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п. в используемом в данном документе значении содержат любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген для образования комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антитела с применением любых пригодных стандартных технологий, таких как протеолитическое расщепление или технологии рекомбинантной генетической инженерии, включая манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или без труда доступна, например, из коммерческих источников, ДНК библиотек (включая, например, фаговые библиотеки антител) или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и подвергаться манипулированию химически или посредством использования технологий молекулярной биологии, например, для расположения одного или более вариабельных и/или константных доменов в пригодную конфигурацию или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модифицирования, добавления или делеции аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов содержат (i) Fab фрагменты; (ii) $F(ab')_2$ фрагменты; (iii) Fd фрагменты; (iv) Fv фрагменты; (v) одноцепочечные Fv (scFv) молекулы; (vi) dAb фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как CDR3 пептид) или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфичные антитела, однодоменные антитела, антитела с делетированным доменом, химерные антитела, CDR-трансплантированные антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), малые модулярные иммунофармацевтические средства (SMIP) и акульи вариабельные IgNAR домены также включены в экспрессию "антигенсвязывающего фрагмента" в применяемом в данном документе значении.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, будет содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или аминокислотную композицию и обычно будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая является смежной к или в рамке с одной или более каркасных последовательностей. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих V_H домен, ассоциированный с V_L доменом, V_H и V_L домены могут быть расположены относительно друг друга в любом пригодном расположении. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры V_{H-V_H} , V_H-V_L или V_L-V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно соединенный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые могут находиться внутри антигенсвязывающего фрагмента антитела по данному изобретению содержат (i) V_H-C_{H1} ; (ii) V_H-C_{H2} ; (iii) V_H-C_{H3} ; (iv) $V_H-C_{H1}-C_{H2}$; (v) $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$;

(vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$ и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации переменные и константные домены, включая любую из иллюстративных конфигураций, приведенных выше, переменный и константные домены могут быть или напрямую соединены друг с другом, или соединены полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит в результате к гибкой или полугибкой связи между смежными переменными и/или константными доменами в одиночной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любых из конфигураций переменного и константного домена, приведенных выше, в нековалентном объединении друг с другом и/или с одним или более из мономерного V_H или V_L домена (например, посредством дисульфидной(ых) связи(ей)).

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению могут содержать или состоять из человеческих антител и/или рекомбинантных человеческих антител или их фрагментов. Термин "человеческое антитело" в используемом в данном документе значении включает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей человеческих зародышевых линий иммуноглобулина, человеческие антитела могут тем не менее содержать аминокислотные остатки, не кодируемые иммуноглобулиновые последовательности человеческой зародышевой линии (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфичным мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако в используемом в данном документе значении не подразумевается, что термин "человеческое антитело" содержит антитела, в которых CDR последовательности, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были трансплантированы на человеческие каркасные последовательности.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению могут содержать или состоять из рекомбинантных человеческих антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В используемом в данном документе значении подразумевается, что термин "рекомбинантное человеческое антитело" содержит все человеческие антитела, которые приготовлены, экспрессированы, сконструированы или выделены рекомбинантным средством, таким как антитела, экспрессированные с применением рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетки хозяина (дополнительно описанные далее), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител (дополнительно описанные далее), антитела, выделенные из животного (например, мышь), которое является трансгенным по генам человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992), Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, приготовленные, экспрессированные, сконструированные или выделенные любым другим средством, что включает сплайсинг последовательности гена человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей человеческих зародышевых линий иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, однако, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются *in vitro* мутагенезу (или когда применяются животные, трансгенные по последовательностям человеческого Ig, *in vivo* соматический мутагенез), и, таким образом, аминокислотные последовательности V_H и V_L областей рекомбинантных антител являются последовательностями, которые получены из и относятся к человеческой зародышевой линии V_H и V_L последовательностей, могут являться не существующими в природе в репертуаре зародышевых линий человеческих антител *in vivo*.

Биспецифические антитела.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы по изобретению являются биспецифическими антителами; например биспецифическими антителами, содержащими антигенсвязывающее плечо, которое специфично связывает молекулу-мишень (Т) и антигенсвязывающее плечо, которое специфично связывает интернализующийся эффекторный белок (Е). Способы создания биспецифических антител известны в данной области и могут быть применены для конструирования мультиспецифических антигенсвязывающих молекул по данному изобретению.

Иллюстративные биспецифические форматы, которые могут быть применены в контексте данного изобретения, содержат, без ограничения, например, основанные на scFv биспецифические форматы диател, слияния IgG-scFv, двойной переменной домен (DVD)-Ig, квадрому, выступы-во-впадины, общую легкую цепь (например, общая с выступами-во-впадинах и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, лейциновую застежку, Duobody, IgG1/IgG2, Fab двойного действия (DAF)-IgG и биспецифические форматы Mab2 (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-1 и приведенные там ссылки, для обзора вышеприведенных форматов).

Мультимеризующиеся компоненты.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы данного изобретения в некоторых вариантах осуществления могут также содержать один или более мультимеризующихся компонентов. Мультимеризующиеся компоненты могут функционировать для поддержания объединения между антигенсвязывающими доменами (D1 и D2). В используемом в данном документе значении "мультимеризующийся

компонент" является любой макромолекулой, белком, полипептидом, пептидом или аминокислотой, которая имеет способность ассоциироваться со вторым мультимеризующимся компонентом той же или схожей структурой или строением. Например, мультимеризующийся компонент может являться полипептидом, содержащим домен C_{H3} иммуноглобулина.

Неограничивающий пример мультимеризующегося компонента представляет собой Fc участок иммуноглобулина, например, Fc домен IgG, выбранного из изоформ, IgG2, IgG3, и IgG4, так же как и любого аллотипа в каждой изотипной группе. В некоторых вариантах осуществления мультимеризующийся компонент представляет собой Fc фрагмент или аминокислотную последовательность от 1 до приблизительно 200 аминокислот в длину, содержащий по меньшей мере один цистеиновый остаток. В других вариантах осуществления мультимеризующийся компонент представляет собой цистеиновый остаток или короткий цистеин-содержащий пептид. Другие мультимеризующиеся домены содержат пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой застёжки, мотива петля-спираль или мотива суперспираль.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению содержат два мультимеризующихся домена, M1 и M2, где D1 присоединен к M1 и D2 присоединен к M2 и где ассоциация M1 с M2 облегчает физическую связь D1 и D2 друг с другом в одиночной мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле. В некоторых вариантах осуществления M1 и M2 являются идентичными друг другу. Например, M1 может являться Fc доменом, имеющим конкретную аминокислотную последовательность и M2 является Fc доменом с той же аминокислотной последовательностью, как M1. Альтернативно, M1 и M2 могут отличаться от друга в одном или более аминокислотных положениях. Например, M1 может содержать первый иммуноглобулиновый (Ig) C_{H3} домен и M2 может содержать второй Ig C_{H3} домен, где первый и второй Ig C_{H3} домены отличаются друг от друга по меньшей мере по одной аминокислоте и где отличие по меньшей мере в одной аминокислоте снижает связывание направленного конструктора с белком А по сравнению с референсным конструктором, имеющим идентичные M1 и M2 последовательности. В одном варианте осуществления Ig C_{H3} домен M1 связывает белок А и Ig C_{H3} домен M2 содержит мутацию, которая снижает или устраняет связывание белка А, такую как модификация H95R (нумерации экзонов по IMGT; H435R по EU нумерации). C_{H3} M2 может дополнительно содержать Y96F модификацию (по IMGT; Y436F по EU). Дополнительно модификации, которые могут быть обнаружены в C_{H3} M2, содержат D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, и V422I по EU) в случае Fc домена IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае Fc домена IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае Fc домена IgG4.

Интернализирующиеся эффекторные белки (E).

В контексте данного изобретения D2 компонент мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы специфично связывает интернализирующийся эффекторный белок ("E").

Интернализирующийся эффекторный белок является белком, который способен к тому, чтобы быть интернализируемым в клетку или который иным образом участвует в или вносит вклад в ретроградный транспорт через мембрану. В некоторых случаях интернализирующийся эффекторный белок является белком, который подвергается транцитозу; то есть белок интернализуется на одной стороне клетки и переносится на другую сторону клетки (например, с апикальной на базальную). Во многих вариантах осуществления интернализирующийся эффекторный белок является клеточным экспрессируемым на поверхности белком или растворимым внеклеточным белком. Однако данное изобретение также предполагает варианты осуществления, в которых интернализирующийся эффекторный белок экспрессирован во внутриклеточном компартменте, таком как эндосома, эндоплазматический ретикулум, Гольджи, лизосома и т.д. Например, белки, вовлеченные в ретроградный транспорт через (например, пути от ранних/рециклирующихся эндосом на транс-Гольджи сети), могут служить в качестве интернализирующихся эффекторных белков в различных вариантах осуществления данного изобретения. В любом случае связывание D2 с интернализирующимся эффекторным белком вызывает то, что целая мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула и любые молекулы, ассоциированные с ней (например, молекула-мишень, связанная посредством D1), также становятся интернализируемыми в клетку. Как объяснено далее интернализирующиеся эффекторные белки содержат белки, которые являются напрямую интернализируемыми в клетку, так же как и белки, которые являются ненапрямую интернализируемыми в клетку.

Интернализирующиеся эффекторные белки, которые являются напрямую интернализируемыми в клетку, содержат ассоциированные с мембраной молекулы по меньшей мере с одним внеклеточным доменом (например, трансмембранные белки, GPI-заякоренные белки и т.д.), которые подвергаются клеточной интернализации, и предпочтительно являются переработанными через внутриклеточный деструктивный и/или путь рециклизации. Специфичные неограничивающие примеры интернализирующихся эффекторных белков, которые являются напрямую интернализируемыми в клетку, содержат, например, CD63, MHC-I (например, HLA-B27), Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, трансферриновый рецептор, LDL-рецептор, родственный LDL рецептору белок 1, ASGR1, ASGR2, амилоидный белок, подобный белку-2 (APLP2), апелиновый рецептор (APLNR), MAL (миелиновый и лимфоцитный белок, a.k.a.

VIP17), IGF2R, H⁺ АТФазу вакуолярного типа, рецептор дифтерийного токсина, фолатный рецептор, глутаматные рецепторы, глутатионовый рецептор, лептиновые рецепторы, фагоцитарные рецепторы (например, SCARA1-5, SCARB1-3, CD36) и т.д.

В вариантах осуществления, в которых Е является напрямую интернализируемым эффекторным белком, D2 компонент мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы может являться, например, антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела, который специфично связывает Е или лигандом, или участком лиганда, который специфично взаимодействует с эффекторным белком. Например, если Е представляет собой Kremen-1 или Kremen-2, D2 компонент может содержать или состоять из лиганда Kremen (например, DKK1) или его Kremen-связывающего участка. В качестве другого примера, если Е является рецепторной молекулой, такой как ASGR1, D2 компонент может содержать или состоять из лиганда, специфичного в отношении рецептора (например, асиалоорозомукоид [ASOR] или Beta-GalNAc), или его рецептор-связывающего участка.

Интернализирующиеся эффекторные белки, которые являются ненапрямую интернализируемыми в клетку, содержат белки и полипептиды, которые не интернализируются сами по себе, но становятся интернализируемыми в клетку после связывания с или ассоциирования иным образом со вторым белком или полипептидом, который является напрямую интернализируемым в клетку. Белки, которые являются ненапрямую интернализируемыми в клетку, содержат, например, растворимые лиганды, которые способны к связыванию с интернализуемой экспрессируемой на клеточной поверхности рецепторной молекулой. Неограничивающим примером растворимого лиганда, который является (опосредованно) интернализируемым в клетку через его взаимодействие с интернализуемой экспрессируемой на клеточной поверхности рецепторной молекулой, является трансферрин. В вариантах осуществления, где Е представляет собой трансферрин (или другой ненапрямую интернализируемый белок), связывание D2 Е и взаимодействие Е с трансферриновым рецептором (или с другой интернализуемой экспрессируемой на клеточной поверхности рецепторной молекулой) вызывает то, что целая мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула и любые молекулы, ассоциированные с ней (например, молекула-мишень, связанная посредством D1), становятся интернализованными в клетку параллельно с интернализацией Е и его партнера по связыванию.

В вариантах осуществления, в которых Е является ненапрямую интернализируемым эффекторным белком, таким как растворимый лиганд, D2 компонент мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы может являться, например, антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела, которое специфично связывает Е, или рецептором или участком рецептора, который специфично взаимодействует с растворимым эффекторным белком. Например, если Е является цитокином, D2 компонент может содержать или состоять из соответствующего цитокинового рецептора или его лигандсвязывающего участка.

Молекулы-мишени (Т).

В контексте данного изобретения D1 компонент мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы специфично связывает молекулу-мишень ("Т"). Молекула-мишень является любым белком, полипептидом или другой макромолекулой, для которой желательно, чтобы активность или внеклеточная концентрация была аттенуирована, снижена или устранена. Во многих случаях молекула-мишень, с которой связывается D1, является белком или полипептидом [т.е. "белок-мишень"]; однако данное изобретение также включает варианты осуществления, где молекула-мишень ("Т") представляет собой углевод, гликопротеин, липид, липопротеин, липополисахарид или другой полимер небелковой природы или молекулу, с которой связывается D1. В соответствии с данным изобретением Т может являться экспрессируемым на клеточной поверхности белком-мишенью или растворимым белком-мишенью. Связывание мишени мультиспецифической антигенсвязывающей

молекулой может иметь место вне клетки или на клеточной поверхности. Однако в некоторых вариантах осуществления мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула связывает молекулу-мишень внутри клетки, например во внутриклеточном компоненте, таком как эндоплазматический ретикулум, Гольджи, эндосома, лизосома и т.д.

Примеры экспрессируемых на клеточной поверхности молекул-мишеней содержат экспрессируемые на клеточной поверхности рецепторы, мембраносвязанные лиганды, ионные каналы и любой другой мономерный или многомерный полипептидный компонент с внеклеточным участком, который присоединен к или ассоциирован с клеточной мембраной. Неограничивающие, иллюстративные экспрессируемые на клеточной поверхности молекулы-мишени, которые могут направляться мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой по данному изобретению содержат, например, цитокиновые рецепторы (например, рецепторы для IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-22, IL-25, IL-33 и т.д.), так же как и мишени на клеточной поверхности, включая другие трансмембранные рецепторы типа 1, такие как PRLR, сопряженные с G-белком рецепторы, такие как GCGR, ионные каналы, такие как Nav1.7, ASIC1 или ASIC2, нерцепторные поверхностные белки, такие как MHC-I (например, HLA-B*27) и т.д.

В вариантах осуществления, в которых Т является экспрессируемым на клеточной поверхности белком-мишенью, D1 компонент мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы может являться, например, антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела, которое специфично связывает Т,

или лигандом или участком лиганда, который специфично взаимодействует с экспрессируемым на клеточной поверхности белком-мишенью. Например, если Т представляет собой IL-4R, D1 компонент может содержать или состоять из IL-4 или его рецепторсвязывающего участка.

Примеры растворимых молекул-мишеней содержат цитокины, факторы роста и другие лиганды и сигнальные белки. Неограничивающий иллюстративный растворимый белок-мишень, который может быть мишенью мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по данному изобретению, содержит, например, IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-22, IL-25, IL-33, SOST, DKK1 и т.д. Растворимые молекулы-мишени также содержат, например, нечеловеческие молекулы-мишени, такие как аллергены (например, Fel D1, Betvl, CryJ1), патогены (например, *Candida albicans*, *S. aureus* и т.д.), и патогенные молекулы (например, липополисахарид [LPS], липотехоевая кислота [LTA], Белок А., токсины и т.д.). В вариантах осуществления, в которых Т является растворимой молекулой-мишенью, D1 компонент мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы может являться, например, антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела, которое специфично связывает Т, или рецептором или участком рецептора, который специфично взаимодействует с растворимой молекулой-мишенью. Например, если Т является IL-4, D1 компонент может содержать или состоять из IL-4R или его лигандсвязывающего участка.

Молекулы-мишеней также содержат опухоль-ассоциированные антигены, как описано в другом месте в данном документе.

pH-зависимое связывание.

Данное изобретение предоставляет мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен (D1) и второй антигенсвязывающий домен (D2), где один или оба из антигенсвязывающих доменов (D1 и/или D2) связывают свой антиген (Т или Е) pH-зависимым образом. Например, антигенсвязывающий домен (D1 и/или D2) может проявлять сниженное связывание с его антигеном при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. Альтернативно, антигенсвязывающий домен (D1 и/или D2) может проявлять усиленное связывание с его антигеном при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. Антигенсвязывающие домены с pH-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, например, скринингом популяции антител на сниженное (или увеличенное) связывание с конкретным антигеном при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. Дополнительно, модификации антигенсвязывающего домена на аминокислотном уровне могут привести к антигенсвязывающим доменам с pH-зависимыми характеристиками. Например, посредством замещения одной или более аминокислот антигенсвязывающего домена (например, внутри CDR) гистидиновым остатком может быть получен антигенсвязывающий домен со сниженным связыванием антигена при кислотном pH относительно нейтрального pH.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение включает мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие D1 и/или D2 компонент, который связывает его соответствующий антиген (Т или Е) при кислотном pH с K_D , которая по меньшей мере приблизительно в 3, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 раз или более больше, чем K_D D1 и/или D2 компонента для связывания с их соответствующим антигеном при нейтральном pH. pH зависимое связывание может также быть выражено исходя из $t_{1/2}$ антигенсвязывающего домена по отношению к его антигену при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. Например, данное изобретение включает мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие D1 и/или D2 компонент, который связывает его соответствующий антиген (Т или Е) при кислотном pH с $t_{1/2}$, который по меньшей мере приблизительно в 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или более раз короче, чем $t_{1/2}$ D1 и/или D2 компонента для связывания с его соответствующим антигеном при нейтральном pH.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению, которые содержат D1 и/или D2 компонент со сниженным связыванием антигена при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH, при введении животным объектам, могут в некоторых вариантах осуществления проявлять более медленное выведение из кровообращения по сравнению с сопоставимыми молекулами, которые не проявляют pH-зависимые характеристики связывания. В соответствии с этим вариантом изобретения предусмотрены мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы со сниженным связыванием антигена или с Т, и/или с Е при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH, которые проявляют по меньшей мере в 2 раза более медленное выведение из кровообращения относительно сопоставимых антигенсвязывающих молекул, которые не предоставляют снижения связывания антигена при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH. Скорость выведения может быть выражена исходя из времени полужизни антитела, где более медленное выведение коррелирует с более длительным временем полужизни.

В используемом в данном документе значении выражение "кислотный pH" означает pH 6,0 или менее. Выражение "кислотный pH" включает величины pH приблизительно 6,0, 5,95, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0, или менее. В используемом в данном документе значении выражение "нейтральный pH" означает pH от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4. Выражение "нейтральный pH" включает pH величины приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

Аттенуация активности молекулы-мишени.

Как отмечено в другом месте в данном документе и как продемонстрировано рабочими примерами в данном документе далее, авторы данного открытия обнаружили, что одновременное связывание молекулы мишени (Т) и интернализирующегося эффекторного белка (Е) мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой аттенуирует активность Т в большей степени, чем связывание Т первым антигенсвязывающим доменом (D1) компонента мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы отдельно. В используемом в данном документе значении выражение "аттенуирует активность Т в большей степени, чем связывание Т посредством D1 отдельно" означает что, в анализе, в котором активность Т может быть измерена с применением клеток, которые экспрессируют Е, уровень активности Т, измеряемый в присутствии мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, является по меньшей мере на 10% более низким, чем уровень Т активности, измеряемый в присутствии контрольного конструкта, содержащего D1 сам по себе (т.е. не соединенный физически со вторым антигенсвязывающим доменом (D2)). К примеру, уровень Т активности, измеряемый в присутствии мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы может являться приблизительно на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% более низким, чем уровень Т активности, измеряемый в присутствии контрольного конструкта, содержащего D1 сам по себе.

Неограничивающий иллюстративный формат анализа для определения того, аттенуирует ли мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула активность молекулы мишени в большей степени, чем связывание молекулы-мишени D1 доменом отдельно, показан в рабочих примерах 1 и 2 далее в данном документе. В примере 1, к примеру, "Т" представляет собой рецептор интерлейкина-4 (IL-4R) и "Е" представляет собой CD63.

Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула примера 1 представляет собой конъюгат двух антител, содержащий анти-IL-4R mAb, соединенное с анти-CD63 mAb через стрептовидин/биотиновый линкер. Таким образом, "D1" в этом иллюстративном конструкте является антигенсвязывающим доменом (пара HCVR/LCVR) анти-IL-4R антитела и "D2" является антигенсвязывающим доменом (пара HCVR/LCVR) анти-CD63 антитела. Для экспериментов примеров 1 и 2 формат анализа на основе клетки применяли для продуцирования репортерного сигнала, когда активность IL-4R стимулировали добавлением экзогенного лиганда IL-4. Величина IL-4-индуцированной репортерной активности, детектированная в присутствии мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, по сравнению с величиной IL-4-индуцированной репортерной активности, детектированной в присутствии контрольных конструктов, содержащих анти-IL-4R антитело, или соединенной с нерелевантным контрольным иммуноглобулином (контроль 1), или комбинированной, но не соединенной физически с анти-CD63 антителом (контроль 2). Контрольные конструкты, таким образом, продуцируют состояние, в котором Т является связанным D1 отдельно (т.е. где D1 не является частью мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы сам по себе). Если степень активности молекулы-мишени (представленная репортерным сигналом), наблюдаемая в присутствии мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, составляет по меньшей мере на 10% меньше, чем величина активности молекулы-мишени, наблюдаемая в присутствии контрольного конструкта, содержащего D1 компонент, не соединенный физически с D2 компонентом (например, контроль 1 или контроль 2), то в целях данного открытия делается вывод, что "одновременное связывание Т и Е мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой аттенуирует активность Т в большей степени, чем связывание Т посредством D1 отдельно".

Связывание Т посредством D1 отдельно может в некоторых вариантах осуществления привести в результате к частичной аттенуации активности Т (как в случае примера 1, где обработка репортерных клеток с анти-IL-4R антителом отдельно [т.е. контроли 1 и 2] вызывала маленький уровень аттенуации IL-4 сигнализации относительно необработанных клеток). В других вариантах осуществления связывание Т посредством D1 отдельно приведет к необнаруживаемой аттенуации активности Т; это означает, что биологическая активность Т может быть не затронута связыванием Т посредством D1 отдельно. Однако в любом случае одновременное связывание Т и Е мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой по изобретению будет аттенуировать активность Т в большей степени, чем связывание Т посредством D1 отдельно.

Альтернативные форматы анализа и вариации формата(ов) анализа, проиллюстрированные в данном документе, будут очевидны для рядовых специалистов в данной области, принимая во внимание природу специфичной молекулы-мишени и эффекторных белков, к которым любая заданная мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула может быть направлена. Любой такой формат может быть применен в контексте данного изобретения для определения того, если одновременное связывание Т и Е мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой аттенуирует активность Т в большей степени, чем связывание Т посредством D1 отдельно.

Направление к опухолям.

В другом варианте изобретения мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы пригодны для направления к опухолевым клеткам. В соответствии с этим вариантом изобретения молекула-мишень "Т", с которой связывается D1, является ассоциированным с опухолью антигеном. В некоторых вариантах ассоциированный с опухолью антиген является антигеном, который обычно не является интернализуемым. Интернализирующийся эффекторный белок "Е", с которым связывается D2, может являться

специфичным к опухоли, или он может быть экспрессируемым как на опухолевых, так и на неопухолевых клетках индивидуума. Любой из интернализирующихся эффекторных белков, упомянутых в другом месте в данном документе, может быть направлен на антиопухолевые применения по изобретению.

В используемом в данном документе значении термин "ассоциированный с опухолью антиген" включает белки или полипептиды, которые являются предпочтительно экспрессируемыми на поверхности опухолевой клетки. Выражение "предпочтительно экспрессируемый", как это применяется в данном контексте, означает, что антиген экспрессируется на опухолевой клетке с уровнем, который по меньшей мере на 10% больше (например, на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 150, 200, 400% или более), чем уровень экспрессии антигена на неопухолевых клетках.

В некоторых вариантах осуществления молекула-мишень представляет собой антиген, который является предпочтительно экспрессируемым на поверхности опухолевой клетки, выбранной из группы, состоящей из почечной опухолевой клетки, опухолевой клетки толстой кишки, опухолевой клетки молочной железы, яичниковой опухолевой клетки, опухолевой клетки кожи, опухолевой клетки легкого, опухолевой клетки простаты, панкреатической опухолевой клетки, клетки глиобластомы, опухолевой клетки головы и шеи и клетки меланомы. Неограничивающие примеры специфичных ассоциированных с опухолью антигенов, содержат, например, AFP, ALK, BAGE белки, Р-катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбонангидразу IX, каспазу-8, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, белки GAGE (например, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, белки MAGE (например, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 и -12), MART-1, мезотелин, ML-IAP, Muc1, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ES01, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), белки RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвивин, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, тирозиназу и уроплакин -3.

Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула с соответствии с этим вариантом изобретения может быть конъюгирована с лекарственным средством, токсином, радиоизотопом или другим веществом, которое является причиняющим ущерб жизнеспособности клетки. Альтернативно, лекарственное средство или токсин могут являться веществом, которое не убивает клетку напрямую, но делает клетку более восприимчивой к умерщвлению другими внешними агентами. В других вариантах осуществления, содержащих направление к опухоли, мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по изобретению сама по себе не конъюгируется с лекарственным средством, токсином или радиоизотопом, но вместо этого вводится в комбинации со второй антигенсвязывающей молекулой, специфичной к мишени (Т) (в данном документе обозначаемой "молекула-сообщник"), где молекула-сообщник конъюгирована с лекарственным средством, токсином или радиоизотопом. В таких вариантах осуществления мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула будет предпочтительно связываться с эпитопом на молекуле-мишене (Т), который является отличающимся и/или неперекрывающимся с эпитопом, распознаваемым молекулой (т.е. для позволения одновременного связывания мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы и молекулы-сообщника с мишенью).

В похожем варианте осуществления данное изобретение также включает противоопухолевые комбинации, и терапевтические способы, содержащие (а) конъюгированную с токсином или лекарственным средством антигенсвязывающую молекулу, которая специфично связывает ассоциированный с опухолью антиген; и (b) мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую (i) первый связывающий домен, который специфично связывает интернализирующийся эффекторный белок (например, с низкой аффинностью) и (ii) второй связывающий домен, который специфично связывает конъюгированную с токсином или лекарственным средством антигенсвязывающую молекулу. В этом варианте осуществления мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула функционирует для соединения конъюгированной с токсином или лекарственным средством антигенсвязывающей молекулы с интернализирующимся эффекторным белком, который посредством этого функционирует для физического соединения, ассоциированного с опухолью антигена с интернализирующимся эффекторным белком. Интернализация меченного токсином ассоциированного с противоопухолевым антигеном антитела посредством объединения с интернализирующимся эффекторным белком может впоследствии привести к умерщвлению меченой опухолевой клетки.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления направления к опухоли по изобретению мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула (или антитело-сообщник) может быть конъюгирована с одним или более цитотоксических лекарственных средств, выбранных из группы, состоящей из калихеамицина, эсперамицина, метотрексата, доксорубина, мелфалана, хлорамбуцила, АРА-С, виндезина, митомицина С, цисплатина, этопозида, блеомицина, 5-фтороурацила, эстрамустина, винкристина, этопозида, доксорубина, паклитаксела, ларотаксела, тезетаксела, оратаксела, доцетаксела, доластатина 10, ауристатины Е, ауристатины РНЕ и соединений на основе майтансина (например, DM1, DM4 и т.д.).

Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула (или антитело-сообщник) может также или альтернативно быть конъюгированной с токсином, таким как дифтерийный токсин, экзотоксин *A Pseudomonas aeruginosa*, А цепь рицина, А цепь абрина, А цепь модессина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* и т.д. Мультиспецифическая антигенсвязывающая

молекула (или антитело-сообщник) может также или альтернативно быть конъюгированной с одним или более радиоизотопов, выбранных из группы, состоящей из ^{225}Ac , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{131}I , ^{67}Cu , ^{125}I , ^{123}I , ^{77}Br , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{64}Cu , ^{121}Pb , ^{224}Ra и ^{223}Ra . Таким образом, этот аспект изобретения включает мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые являются конъюгатами антитело-лекарственное средство (ADC) или конъюгатами антитело-радиоизотоп (ARC).

В контексте убивающих опухоль применений D2 компонент может в некоторых обстоятельствах связываться с низкой аффинностью с интернализирующимся эффекторным белком "E". Таким образом, мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула будет предпочтительно направлять к опухолевым клеткам, которые экспрессируют ассоциированный с опухолью антиген. В используемом в данном документе значении "низкая аффинность" связывания означает, что аффинность связывания D2 компонента по отношению к интернализирующемуся эффекторному белку (E) по меньшей мере на 10% слабее (например, на 15% слабее, 25% слабее, 50% слабее, 75% слабее, 90% слабее и т.д.), чем аффинность связывания D1 компонента с молекулой-мишенью (T). В некоторых вариантах осуществления "низкая аффинность" связывания означает, что D2 компонент взаимодействует с интернализирующимся эффекторным белком (E) с K_D от больше чем приблизительно 10 нМ до приблизительно 1 пМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при приблизительно 25°C.

Одновременное связывание мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы с интернализирующимся эффекторным белком и с ассоциированным с опухолью антигеном может привести к предпочтительной интернализации мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы в опухолевые клетки. Если, например, мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула конъюгирована с лекарственным средством, токсином или радиоизотопом (или если мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула вводится в комбинации с антителом, которое конъюгировано с лекарственным средством, токсином или радиоизотопом), направленная интернализация ассоциированного с опухолью антигена в опухолевую клетку посредством ее связи с мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, приведет к крайне специфичному умерщвлению опухолевых клеток.

Фармацевтические композиции и способы введения.

Данное изобретение включает фармацевтические композиции, содержащие мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу. Фармацевтические композиции по изобретению могут быть составлены с пригодными носителями, наполнителями и другими агентами, которые предоставляют улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п.

Данное изобретение также включает способы инактивирования или аттенуирования активности молекулы мишени (T). Способы по данному изобретению содержат приведение молекулы-мишени в контакт с мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы в соответствии с этим аспектом изобретения содержат введение фармацевтической композиции, содержащей мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу пациенту, для которого желательно и/или выгодно инактивировать, аттенуировать, или иным образом снижать внеклеточную концентрацию молекулы-мишени.

Различные системы доставки известны в данной области и могут быть применены для введения фармацевтических композиций по данному изобретению пациенту. Способы введения, которые могут быть применены в контексте данного изобретения, содержат, но не ограничены ими, внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, внутримышечный, эпидуральный и оральный пути. Фармацевтические композиции по изобретению могут быть введены любым подходящим путем, например вливанием или болюсной инъекцией, абсорбцией через эпителиальные или слизисто-кожные выстилки (например, оральная слизистая оболочка, ректальная и кишечная слизистая оболочка и т.д.), и могут быть введены вместе с другими биологически активными агентами. Введения могут быть системными или местными. Например, фармацевтическая композиция по данному изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно со стандартной иглой и шприцом. В дополнение, относительно подкожной доставки устройство для доставки в виде ручки может быть применено для введения фармацевтической композиции по данному изобретению пациенту.

Примеры

Следующие примеры приведены далее для предоставления рядовому специалисту в данной области полного раскрытия и описания того, как создать и применять способы и композиции по изобретению, и не подразумевается, что они ограничивают объем того, что авторы считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности по отношению к применяемым числам (например, количества, температура и т.д.), но некоторые экспериментальные ошибки и отклонение должны быть приняты в расчет. Если особым образом не указано иное, части являются частями по массе, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура выражена в градусах по Цельсию, и давление является или близко к атмосферному.

Пример 1. Применение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы для индуцирования деградации рецептора на клеточной поверхности посредством связи с интернализирующимся эффекторным белком.

В качестве начального эксперимента для подтверждения концепции создавали мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая способна к связыванию с (а) интернализирующейся эффекторной молекулой и (б) молекулой-мишенью рецептора на клеточной поверхности. В этом примере интернализирующийся эффекторный белок представляет собой Kremen-2 (Krm2), и молекула-мишень рецептора на клеточной поверхности представляет собой Fc рецептор (FcγR1 [Fc-gamma-R1]).

Молекулы Kremen (Krm1 и Krm2) являются белками клеточной поверхности, которые, как известно, опосредуют WNT сигнализацию направлением интернализации и деградации сигнальных молекул LRP5 и LRP6 пути. Интернализация LRP5/6 совершается через растворимый взаимодействующий белок DKK1. В частности, DKK1 соединяет Kremen с LRP5/6 на клеточной поверхности, и из-за этой связи, интернализация Kremen направляет интернализацию и деградацию LRP5 и LRP6. (см., Li et al., PLoS One 5(6):e11014).

Авторы данного изобретения стремились использовать свойства Kremen-связывания DKK1 и интернализационные свойства Kremen для индуцирования интернализации FcγR1. Для облегчения Kremen-опосредованной интернализации/деградации FcγR1 сконструировали мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, состоящую из DKK1, слитого с мышинным Fc (DKK1-mFc, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1). Как объяснено в другом месте в данном документе, мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула определяется как молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен (D1), который специфично связывает молекулу-мишень, и второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфично связывает интернализирующийся эффекторный белок. В этом примере для подтверждения концепции "первый антигенсвязывающий домен" является mFc компонентом, который специфично связывает молекулу-мишень FcγR1, и "второй антигенсвязывающий домен" является DKK1 компонентом, который специфично связывает интернализирующийся эффекторный белок Kremen.

Эксперимент был первым, проведенным для определения того, если DKK1-mFc может быть подвержен эндоцитозу в клетки Kremen-зависимым образом. Для этого эксперимента применяли две клеточные линии: Cell-1, клеточная линия HEK293, сконструированная для экспрессирования FcγR1, но не Kremen-2, и Cell2, клеточная линия HEK293, сконструированная для экспрессирования как FcγR1, так и Kremen-2. Разбавление 1:10 DKK1-mFc ограниченной среды добавляли в соответствующие клеточные линии и позволяли инкубироваться при 37°C в течение 90 мин. После 90 мин инкубации клетки окрашивали Alexa-488-меченым антимышиным IgG антителом для детектирования DKK1-mFc молекулы. Применяя флуоресцентную микроскопию, наблюдали, что практически не было локализовано DKK1-mFc внутри Cell1 (отсутствие Kremen); однако существенные количества DKK1-mFc детектировали в Cell2, которая экспрессирует Kremen-2. Таким образом, эти результаты демонстрируют, что мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула DKK1-mFc может быть интернализированной в клетки Kremen-зависимым образом.

Затем эксперимент с зависимостью от времени проводили для определения того, если DKK1-mFc может индуцировать FcγR1 деградацию Kremen-зависимым образом. Краткое описание экспериментального протокола было следующим: Cell1 (экспрессирующие только FcγR1) и Cell2 (экспрессирующие Kremen-2 и FcγR1) обрабатывали с 2 мг/мл NHS-сульфобиотина в течение 15 мин на льду для мечения всех экспрессируемых на клеточной поверхности белков. Клетки затем промывали и ресуспендировали в 400 мкл среды и разделяли на четыре 100 мкл аликвоты, которые обрабатывали с DKK1-mFc в течение варьирующихся промежутков времени (0, 15, 30 и 60 мин) при 37°C. После DKK1-mFc инкубации клетки осаждали и обрабатывали ингибиторами протеазы. Лизаты клеток из различных временных точек инкубации подвергали FcγR1 иммунопреципитации. Для FcγR1 иммунопреципитации мышинное анти-FcγR1 антитело добавляли к клеточным лизатам и инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Затем добавляли гранулы с белком G и смесь инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Затем гранулы промывали и белки элюировали и подвергали ДСН-ПААГ-электрофорезу. Белки переносили на мембрану и подвергали зондированию с меченым HRP стрептовидином для выявления относительных количеств оставшегося экспонированного на поверхность белка FcγR1 в каждом образце. Результаты показаны на фиг. 2.

Как проиллюстрировано на фиг. 2, величина экспонированного на поверхность белка FcγR1 в Cell1 образцах (экспрессирующий FcγR1, но не Kremen-2) оставалась относительно константной независимо от количества времени, которое клетки подвергались DKK1-mFc. В противоположность, количество экспонированного на поверхность белка FcγR1 в Cell2 образцах (экспрессирующих как Kremen-2, так и FcγR1) снижалось существенно с увеличением времен инкубации с DKK1-mFc. Таким образом, этот эксперимент демонстрирует, что DKK1-mFc индуцирует деградацию экспрессируемого на клеточной поверхности FcγR1 Kremen-2-зависимым образом.

В совокупности вышеприведенные результаты демонстрируют, что мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая одновременно связывает молекулу-мишень на клеточной поверхности (FcγR1) и интернализирующийся эффекторный белок (Kremen-2), может индуцировать деградацию молекулы-мишени зависимым от эффекторного белка образом.

Пример 2. Активность IL-4R аттенуирована с применением мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы со специфичностью к IL-4R и CD63.

В дополнительном наборе экспериментов для подтверждения концепции сконструировали мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая способна к одновременному связыванию экспрессируемой на клеточной поверхности молекулы-мишени (т.е. IL-4R) и экспрессируемого на клеточной поверхности интернализирующегося эффекторного белка (т.е. CD63). Цель этих экспериментов заключалась в определении того, может ли активность IL-4R в отношении клетки быть аттенуирована в большей степени физическим соединением IL-4R с эффекторной молекулой, которая является интернализированной и направленной для деградации в лизосому (в этом случае, CD63). Другими словами, этот пример разрабатывали для тестирования того, если нормальная интернализация и деградация CD63 может быть применена для вызывания интернализации и деструктивного изменения пути IL-4R в клетке.

Сначала конструировали мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая способна связываться как с IL-4R, так и с CD63. Конкретно, стрептовидин-конъюгированное анти-IL-4R антитело и биотинилированное анти-CD63 антитело комбинировали в соотношении 1:1 для продуцирования конъюгата анти-IL-4R:анти-CD63 (т.е. мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая специфично связывает как IL-4R, так и CD63). Анти-IL-4R антитело, применяемое в этом примере, является полностью человеческим mAb, выращенным против внеклеточного домена IL-4R. (Анти-IL-4R антитело содержало вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 4). Анти-CD63 антитело, применяемое в этом примере, является мышинным античеловеческим CD63 mAb клоном MEM-259, полученным у Biolegend (San Diego, CA), номер. по каталогу 312002.

Также создавали два контрольных конструкта:

Контроль-1 = стрептовидин-конъюгированное анти-IL-4R антитело, комбинированное в соотношении 1:1 с биотинилированным контрольным мышинным IgG1 каппа антителом; и

Контроль-2 = стрептовидин-конъюгированное анти-IL-4R антитело, комбинированное в соотношении 1:1 с небитинилированным анти-CD63 антителом.

Анти-IL-4R антитело, применяемое в экспериментальных и контрольных конструктах для этого примера, является антителом, которое, как известно, специфично связывает IL-4R и только частично блокирует IL-4-опосредованную сигнализацию.

Экспериментальная клеточная линия, применяемая в этом примере, является клеточной линией HEK293, содержащей репортерный конструкт STAT6-люцефераза и дополнительный STAT6 ("клетки HEK293/STAT6-luc"). Клетки, применяемые в этом эксперименте, экспрессируют как IL-4R, так и CD63 на их поверхности. При обработке с IL-4 в отсутствие любых ингибиторов эта клеточная линия продуцирует дозозависимый обнаруживаемый хемолуминесцентный сигнал, который отражает степень IL-4-опосредованной сигнализации.

В начальном эксперименте экспериментальную мультиспецифическую молекулу анти-IL-4R/анти-CD63 или контрольные конструкты добавляли к клеткам HEK293/STAT6-luc так, чтобы конечная концентрация анти-IL-4R антитела в среде составляла 12,5 нМ. Репортерный сигнал измеряли при увеличивающихся концентрациях IL-4 в присутствии и отсутствии экспериментальных и контрольных конструктов (фиг. 3). Как видно на фиг. 3, мультиспецифическая молекула анти-IL-4R/анти-CD63 ("ab конъюгат") ингибировала IL-4-опосредованную сигнализацию в значительно большей степени, чем контрольный конструкт.

Для подтверждения того, что эффект, который наблюдали на фиг. 3, являлся зависимым от CD63, осуществляли такой эксперимент, как описано выше за исключением того, что экспрессия CD63 была значительно снижена в репортерной клеточной линии с применением мiPНК, направленной против CD63. При значительно сниженной экспрессии CD63 больше не наблюдали усиленную ингибиторную активность мультиспецифической молекулы анти-IL-4R/анти-CD63 (фиг. 4). Эти результаты предполагают, что способность мультиспецифической молекулы анти-IL-4R/анти-CD63 аттенуировать IL-4-опосредованную сигнализацию обусловлена одновременным связыванием мультиспецифической молекулы с IL-4R и CD63 и последующей интернализацией и деградацией целого комплекса антитело-IL-4R-CD63.

Далее осуществляли подобные эксперименты, в которых мультиспецифической молекуле анти-IL-4R/анти-CD63 или контрольным конструктам позволяли инкубироваться с репортерной клеточной линией HEK293/STAT6-luc в течение различных промежутков времени перед добавлением IL-4. В первом наборе таких экспериментов молекулам позволяли инкубироваться с репортерной клеточной линией в течение 0 ч (т.е. добавляли одновременно с IL-4), 2 ч или в течение ночи перед добавлением 50 пМ IL-4. Люцеферазную активность измеряли через 6 ч после добавления IL-4. Результаты показаны на верхней панели фиг. 5 ("нетрансфицированные"). В дополнительной серии экспериментов выполняли схожий

протокол, за исключением того, что экспериментальным или контрольным молекулам позволяли инкубироваться с репортерной клеточной линией в течение 15, 30 мин, 1 или 2 ч перед добавлением 50 пМ IL-4. Результаты показаны на фиг. 6.

Результаты, суммированные на фиг. 5 и 6, демонстрируют, что мультиспецифическая молекула анти-IL-4R/анти-CD63 способна ингибировать IL-4-опосредованную сигнализацию и что этот ингибиторный эффект усиливается при более продолжительных временах инкубации. Как в начальной серии экспериментов подтверждали с применением CD63 миРНК, что ингибиторный эффект мультиспецифической молекулы анти-IL-4R/анти-CD63 являлся зависимым от экспрессии CD63 (фиг. 5 нижняя панель ["CD63 миРНК"]).

В итоге этот пример предоставляет дополнительное подтверждение концепции для ингибирования активности молекулы мишени посредством применения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая способна к одновременному связыванию как молекулы-мишени (в этом случае IL-4R), так и интернализирующегося эффекторного белка (в этом случае CD63) для вызывания посредством этого интернализации и деструктивного изменения пути молекулы-мишени в клетке. Другими словами, одновременное связывание IL-4R и CD63 иллюстративной мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой аттенуировало активность IL-4R в существенно большей степени (т.е. >10%), чем связывание IL-4R контрольными конструктами отдельно.

Пример 3. Биспецифическое антитело анти-IL-4R × анти-CD63 аттенуирует активность IL-4R зависимым от CD63 образом.

Эксперименты примера 2 в данном документе демонстрируют, что мультиспецифическая молекула анти-IL-4R/анти-CD63 ингибирует IL-4-опосредованную сигнализацию CD63-зависимым образом. В этих экспериментах мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула состояла из двух отдельных моноклональных антител (анти-IL-4R и анти-CD63), которые были соединены биотин-стрептоvidoиновой связью. Для подтверждения того, что результаты, которые наблюдали в подтверждении концепции с мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, являются распространяемыми на другие форматы мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, конструировали настоящее биспецифическое антитело.

Применяли стандартную технологию биспецифических антител для конструирования биспецифического антитела, состоящего из первого плеча, специфичного в отношении IL-4R, и второго плеча, специфичного в отношении CD63. IL-4R-специфичное плечо содержало тяжелую цепь анти-IL-4R, спаренную с CD63-специфичной легкой цепью. CD63-специфичную легкую цепь спаривали с IL-4R-специфичной тяжелой цепью исключительно для удобства конструирования; тем не менее, спаренная с анти-CD63 легкой цепью тяжелая цепь анти-IL-4R сохраняла полную специфичность к IL-4R и не проявляла связывания с CD63. CD63-специфичное плечо содержало тяжелую цепь анти-CD63, спаренную с легкой цепью анти-CD63 (ту же легкую цепь, как применяли в IL-4R плече). Тяжелую цепь анти-IL-4R (содержащую SEQ ID NO: 3) получали из полного анти-IL-4R антитела, как применено в примере 2; однако тяжелую и легкую цепи анти-CD63 получали из анти-CD63 антитела, обозначенного H5C6, полученного у Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa Department of Biology, Iowa City, IA). Как с полным анти-IL-4R антителом, применяемым в примере 2, анти-IL-4R компонент биспецифического антитела, применяемого в этом примере, проявлял только умеренную блокирующую IL-4R активность сам по себе.

Люциферазный анализ IL-4 выполняли для оценки блокирующей активности биспецифического антитела анти-IL-4R × анти-CD63. Кратко, серийные разбавления биспецифического антитела анти-IL-4R × анти-CD63 или контрольных молекул добавляли к репортерным клеткам HEK293/STAT6-luc (см., пример 2). При нормальных условиях, эти клетки продуцировали обнаруживаемый люциферазный сигнал при обработке с IL-4. Для этого эксперимента затем к клеткам добавляли 10 пМ IL-4 и определяли количественно люциферазную активность для каждого применяемого разбавления антитела. Контроли, применяемые в этом анализе, являлись следующими: (а) имитационно биспецифическое антитело, которое связывает IL-4R с одним плечом и имеет нефункциональное анти-CD63 плечо (т.е. содержащее одну тяжелую цепь анти-IL-4R и одну тяжелую цепь анти-CD63, обе спаренные с легкой цепью анти-IL-4R); (b) моноспецифическое антитело анти-IL-4R; и (с) только буфер (PBS) (без антитела). Результаты показаны на фиг. 7. Как показано на фиг. 7, для применяемых контрольных образцов люциферазная активность оставалась относительно высокой даже при наибольших концентрациях антитела, тогда как для биспецифического антитела люциферазная активность снижалась значительно по мере возрастания концентрации антитела. Эти результаты подтверждают, что одновременное связывание IL-4R и CD63 биспецифическим антителом вызывает существенное ингибирование активности IL-4R.

Пример 4. Интернализация SOST с применением мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая одновременно связывает SOST и CD63.

В этом примере оценивали способность мультиспецифических антигенсвязывающих молекул стимулировать интернализацию растворимой молекулы-мишени SOST (склеростин). Для этих экспериментов молекула-мишень являлась слитым белком, состоящим из человеческого SOST белка, меченного с

группой pHrodo™ (Life Technologies, Carlsbad, CA) и меткой мус. Группа pHrodo™ является pH-чувствительным красителем, который является практически не флуоресцентным при нейтральном pH и ярко флуоресцентным в кислотной среде, такой как эндосома. Флуоресцентный сигнал вследствие этого может быть применен в качестве индикатора клеточной интернализации SOST слитого белка. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы для этих экспериментов являлись биспецифическими антителами со специфичностью связывания по отношению к обоим CD63 (интернализующийся эффекторный белок) и SOST слитому белку (растворимая молекула-мишень), как описано более подробно далее.

Эксперименты проводили следующим образом: кратко, клетки HEK293 высевали с 10000 клеток/лунку на покрытые поли-D-лизином 96-луночные планшеты (Greiner Bio-One, Monroe, NC). После предоставления клеткам возможности осесть в течение ночи среду замещали средой, содержащей антитело (5 мкг/мл, как описано далее), pHrodo™-мус-меченый-SOST (5 мкг/мл), гепарин (10 мкг/мл), и Hoechst 33342. Клетки затем инкубировали в течение или 3 ч на льду, или 3 ч при 37°C. Все клетки промывали два раза в PBS перед визуализацией и подсчитывали количество флуоресцентных точек в расчете на клетку, так же как и соответствующую интенсивность флуоресценции для установления степени pHrodo-мус-меченой-SOST клеточной интернализации в присутствии различных конструкций антител.

Антитела, применяемые в этом примере, являлись следующими:

(1) моноспецифическое антитело анти-CD63 (клон H5C6, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa Department of Biology, Iowa City, IA);

(2) антитело анти- мус (клон 9E10, Schiweck et al., 1997, FEBS Lett. 414 (1):33-38);

(3) антитело анти-SOST (антитело, имеющее вариабельные области легкой и тяжелой цепи антитела, обозначенного "Ab-B" в патенте США № 7592429);

(4) биспецифическое антитело анти-CD63 × анти-мус (т.е. мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая анти-CD63 плечо, полученное из антитела H5C6, и анти-мус плечо, полученное из 9E10);

(5) биспецифическое антитело #1 анти-CD63 × анти-SOST (т.е. мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая анти-CD63 плечо, полученное из антитела H5C6, и анти-SOST плечо, полученное из "Ab-B"); и

(6) биспецифическое антитело #2 анти-CD63 × анти-SOST (т.е. мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая анти-CD63 плечо, полученное из антитела H5C6, и анти-SOST плечо, полученное из антитела, обозначенного "Ab-20" в патенте США № 7592429). Биспецифические антитела, применяемые в этих экспериментах, собирали с применением так называемой методологии "выступы-воплады" (см., например, Ridgway et al., 1996, Protein Eng. 9(7):617-621).

Результаты интернализационных экспериментов показаны на фиг. 8. Фиг. 8 демонстрирует количество точек (меченые везикулы) в расчете на клетку при различных тестируемых условиях лечения. В совокупности результаты этих экспериментов демонстрируют, что биспецифические конструкторы, которые одновременно связывают CD63 и SOST (или напрямую, или через метку мус), вызывали наибольшие величины SOST интернализации, что отражалось в интенсивности флуоресценции и количестве флуоресцентных точек в расчете на клетку с течением времени при 37°C. Таким образом, мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, применяемые в этом примере, способны эффективно направлять интернализацию растворимой молекулы-мишени.

Пример 5. Изменения в минеральной плотности костей в мышцах, обработанных с мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, которая связывает CD63 и SOST.

Мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу анти-CD63 × анти-SOST, как описано в примере 4, далее тестировали на ее способность повышать минеральную плотность костей у мышей. Пять групп мышей (приблизительно 6 мышей на группу) применяли в этих экспериментах. Группы лечения группы являлись следующими:

(I) необработанные мыши, негативный контроль;

(II) мыши, обработанные с блокирующим анти-SOST моноспецифическим антителом, которое, как известно, повышает минеральную плотность костей само по себе (позитивный контроль);

(III) мыши, обработанные с биспецифическим антителом, которое специфично связывает CD63 и SOST, но не ингибирует SOST активность само по себе или лишь слегка ингибирует SOST активность само по себе;

(IV) мыши, обработанные с родительским антителом анти-CD63 (т.е. моноспецифическое антитело, содержащее тот же анти-CD63 антигенсвязывающий домен, как в биспецифическом антителе); и

(V) мыши, обработанные с родительским антителом анти-SOST (т.е. моноспецифическое антитело, содержащее тот же анти-SOST антигенсвязывающий домен, как биспецифическое антитело). Количество антитела, введенного мышам в каждой группе, составляет приблизительно от 10 до 25 мг/кг.

Полагали, что мыши в группе III (обработанные с биспецифическим антителом анти-SOST × анти-CD63) будут проявлять повышение минеральной плотности костей, которое по меньшей мере сопоставима с тем, которое наблюдали в мышцах группы II (обработанных с известным блокирующим анти-SOST

антителом), хотя анти-SOST компонент биспецифического антитела не ингибирует SOST активность сам по себе (как было подтверждено по мышам в группе V, которые, как полагали, не проявляют возрастание минеральной плотности костей). Возрастание минеральной плотности костей, которое ожидали в мышках группы III, как предполагается, направляется CD63-опосредованной интернализацией SOST, как наблюдали в клеточных экспериментах примера 4 выше.

Пример 6. Клеточная интернализация липополисахарида (ЛПС), опосредованная мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, которая одновременно связывает ЛПС и CD63.

Этот пример иллюстрирует применение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по изобретению для направления интернализации небелковой молекулы-мишени, а именно липополисахарида (ЛПС). ЛПС является компонентом внешней мембраны грамотрицательной бактерии и, как известно, вносит вклад в септический шок. Анти-ЛПС антитела исследовали как возможные лечащие агенты от сепсиса. Разрабатывали эксперименты данного примера для оценки способности мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы стимулировать интернализацию ЛПС.

Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, применяемая в этом примере, являлась биспецифическим антителом с одним плечом, направленным на ЛПС (мишень), и другим плечом, направленным на CD63 (интернализующийся эффекторный белок). Анти-ЛПС плечо получали из антитела, известного как WN1 222-5. (DiPadova et al., 1993, *Infection and Immunity* 61 (9):3863-3872; Muller-Loennies et al., 2003, *J. Biol. Chem.* 278 (28):25618-25627; Gomery et al., 2012, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109 (51):20877-20882; US 5858728). Анти-CD63 плечо получали из антитела H5C6 (см. пример 4). Биспецифическое антитело анти-ЛПС × анти-CD63 (т.е. мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула) собирали с применением так называемой методологии "выступы-во-впадины" (см., например, Ridgway et al., 1996, *Protein Eng.* 9(7):617-621).

Два образца ЛПС применяли в этих экспериментах: ЛПС *E. coli* и ЛПС *Salmonella minnesota*. Обе версии получали в виде флуоресцентно-меченных молекул (ALEXA-FLUOR®-488-меченый ЛПС, Life Technologies, Carlsbad, CA).

Эксперименты проводили следующим образом: клетки HEK293 высевали на 96-луночные покрытые PDL планшеты для визуализации. После состояния покоя в течение ночи среду замещали свежей средой. Флуоресцентно меченый ЛПС (полученный или из *E. coli* или *S. minnesota*) добавляли в обычную среду. Затем биспецифическое антитело анти-ЛПС × анти-CD63 или контрольные половинные антитела, спаренные с имитационными Fc, добавляли к образцам. После инкубации при различном времени при 37°C (1 и 3 ч) или на льду (3 ч) клетки из обработанных ЛПС образцов подвергались следующим процессам: промывали, гасили с анти-ALEXA-FLUOR®-488 антителом, промывали и фиксировали. Антитело анти-ALEXA-FLUOR®-488 гасит флуоресценцию неинтернализированного (т.е. связанного с поверхностью) флуорофора. Таким образом, любая флуоресценция, наблюдаемая при гашении обработанных антителом образцов, обусловлена интернализированным ЛПС. Измеряли уровень флуоресценции из каждого образца в различные временные точки.

Фиг. 9 отображает результаты этих экспериментов исходя из количества меченных везикул в расчете на клетку. Как показано на фиг. 9, только клетки, обработанные с биспецифическим антителом анти-CD63 × анти-ЛПС, демонстрировали количества меченных везикул, которые возрастали со временем. Клетки, обработанные с меченым ЛПС, и контрольные антитела не проявляли количества флуоресцентных везикул, что указывает на то, что ЛПС не был интернализирован в этих условиях обработки.

Следовательно, этот пример демонстрирует, что биспецифическое антитело анти-ЛПС × анти-CD63 вызывает интернализацию ЛПС в клетки таким образом, для которого требуется одновременное связывание ЛПС и CD63. Соответственно, эти результаты подтверждают применение мультиспецифических антигенсвязывающих молекул по изобретению для стимулирования клеточной интернализации молекул-мишеней, таких как ЛПС, для лечения заболеваний и расстройств, таких как сепсис.

Данное изобретение не ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. В действительности, различные модификации изобретения в дополнение к описанному в данном документе будут очевидны специалисту в данной области из вышеприведенного описания и прилагаемых фигур. Подразумевается, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий домен (D1) и второй антигенсвязывающий домен (D2), где

D1 специфично связывается с молекулой-мишенью (Т), и D1 образован вариабельной областью легкой цепи иммуноглобулина D1 и вариабельной областью тяжелой цепи иммуноглобулина D1;

D2 специфично связывается с интернализирующимся эффекторным белком (Е), который экспрессирован на поверхности клетки, подвергается клеточной интернализации и процессируется посредством пути внутриклеточной деградации, и D2 образован вариабельной областью легкой цепи иммуноглобулина D2 и вариабельной областью тяжелой цепи иммуноглобулина D2; и

Т и Е являются разными антигенами, где:

(i) Е выбран из группы, состоящей из CD63, МНС-I, ASGR1 и APLP2, или

(ii) Е выбран из группы, состоящей из CD63, МНС-I, ASGR1 и предшественника амилоидного белка, подобного белку 2 (APLP2), и D2 связывается с Е с более низкой аффинностью, чем D1 связывается с Т, так, что биспецифическое антитело предпочтительно нацелено на Т, и

где одновременное связывание обоих Т и Е с помощью молекулы биспецифического антитела приводит к непосредственной интернализации и деградации Т посредством физического связывания с Е клеткой и/или к ослаблению активности Т в большей степени, чем связывание только Т посредством D1.

2. Биспецифическое антитело по п.1, где Е выбран из группы, состоящей из CD63, МНС-I, ASGR1 и APLP2.

3. Биспецифическое антитело по п.2, где аффинность связывания D2 с Е по меньшей мере на 90% слабее, чем аффинность связывания D1 с Т, или D2 взаимодействует с Е при K_D более 10 нМ, как измерено с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

4. Биспецифическое антитело по п.1, где Т является мишеневой молекулой, экспрессируемый на клеточной поверхности.

5. Биспецифическое антитело по п.1, где Т выбран из группы, состоящей из Nav1.7, GCGR, HLA-B27, аллергена и опухолевого антигена (ТАА).

6. Биспецифическое антитело по п.1, где Т является растворимой мишеневой молекулой.

7. Биспецифическое антитело по п.6, где Т выбран из группы, состоящей из FelD1 и Betv1.

8. Биспецифическое антитело по п.1, где D1 и/или D2 проявляет рН-зависимое связывание с антигеном.

9. Биспецифическое антитело по п.8, где D1 связывается с Т с более низкой аффинностью при кислом рН по сравнению с нейтральным рН и/или где D2 связывается с Е с более низкой аффинностью при кислом рН по сравнению с нейтральным рН.

10. Биспецифическое антитело по п.1, где D1 получен из антигенсвязывающей молекулы, которая сама по себе связывается, но существенно не инактивирует, Т.

11. Биспецифическое антитело по п.1, где D2 содержит антигенсвязывающую часть анти-CD63 антитела.

12. Биспецифическое антитело по п.1, где D1 содержит антигенсвязывающую часть анти-МНС-I антитела.

13. Биспецифическое антитело по п.1, где D1 содержит антигенсвязывающую часть анти-APLP2 антитела.

14. Конъюгат, содержащий биспецифическое антитело по п.1 и лекарственное средство, токсин или радиоизотоп.

15. Способ усиления интернализации и деградации мишеневой молекулы (Т) клеткой, который включает приведение Т и интернализирующегося эффекторного белка (Е) в контакт с биспецифическим антителом, где

Т и Е представляют собой различные антигены и Е экспрессируется на поверхности клетки, подвергается клеточной интернализации и процессируется посредством пути внутриклеточной деградации;

биспецифическое антитело содержит (1) первый антигенсвязывающий домен (D1), полученный из вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина D1 и вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина D1, и (2) второй антигенсвязывающий домен (D2), полученный из вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина D2 и вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина D2,

где (i) Е выбран из группы, состоящей из CD63, МНС-I, ASGR1 и APLP2, или

(ii) Е выбран из группы, состоящей из CD63, МНС-I, ASGR1 и предшественника амилоидного белка, подобного белку 2 (APLP2), и D2 связывается с Е с более низкой аффинностью, чем D1 связывается с Т, так, что биспецифическое антитело предпочтительно нацелено на Т; и

D1 связывается с Т и D2 связывается с Е так, что одновременное связывание Т и Е биспецифическим антителом вызывает деградацию Т при интернализации клеткой при физическом связывании с Е.

16. Способ по п.15, где Е выбран из группы, состоящей из CD63, МНС-I, ASGR1 и APLP2.

17. Способ по п.15, где аффинность связывания D2 с Е по меньшей мере на 90% слабее, чем аффин-

ность связывания D1 с T, или D2 взаимодействует с E при K_D более 10 нМ, как измерено с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

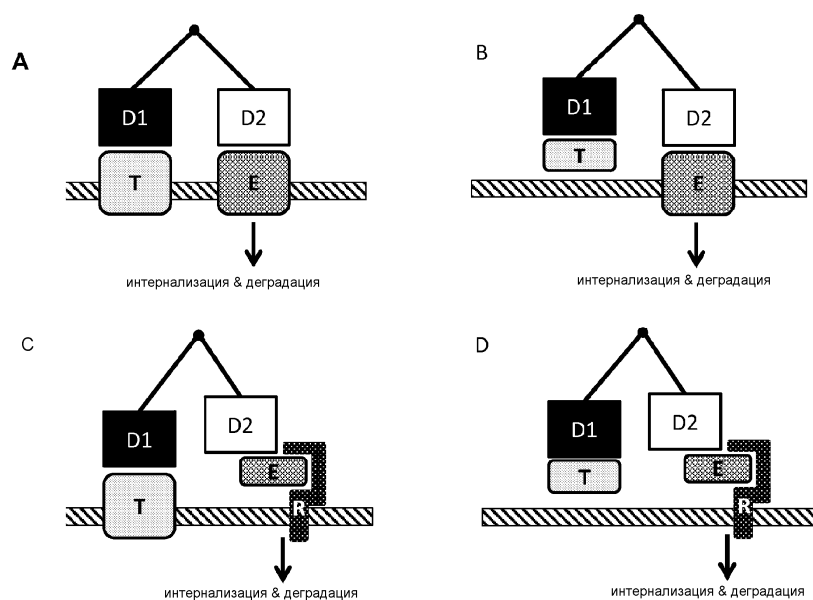
18. Способ по п.15, где T выбран из группы, состоящей из Nav1.7, GCGR, HLA-B27 и опухолевого антигена (ТАА).

19. Способ по п.15, где T представляет собой ТАА, выбранный из группы, состоящей из AFP, ALK, белков BAGE, β -катенина, BORIS, CA9, карбонангидразы IX, каспазы-8, CD40, CEA, CTLA4, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, белков GAGE (например, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, глипикана-3, GM3, gp100, Her2, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, белков MAGE (например, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 и -12), MART-1, мезотелина, ML-IAP, Muc1, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), белки RAGE, Steap-1, Steap-2, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, Tn и уроплакина-3.

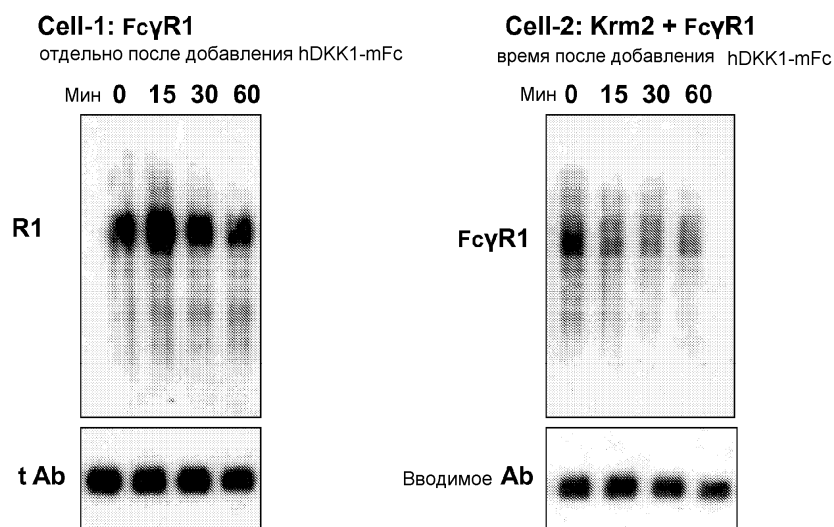
20. Способ по п.19, где ТАА связывается со вторым антигенсвязывающим белком, который связывается с T на эпитопе, который не перекрывается с эпитопом, с которым связывается D1, и где одновременное связывание T и E биспецифическим антителом вызывает непосредственную интернализацию второго антигенсвязывающего белка посредством его связи с T.

21. Способ по п.15, где второй антигенсвязывающий белок конъюгирован с лекарственным средством, токсином или радиоизотопом.

22. Способ по п.15, где биспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело по любому из пп.1-13.

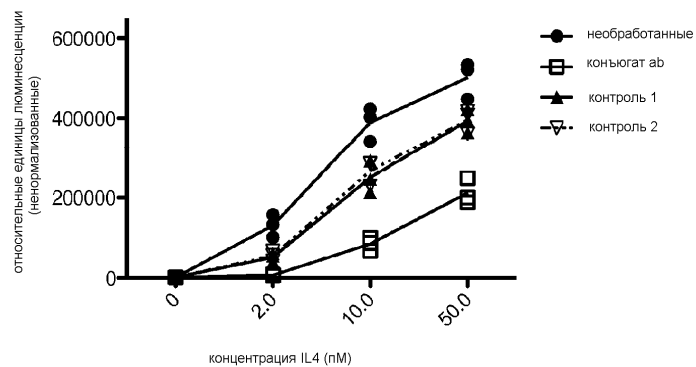


Фиг. 1



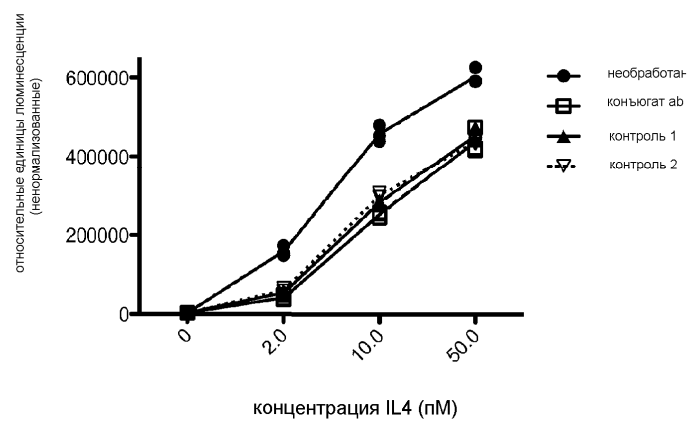
Фиг. 2

Stat6-luc репортерные HEK293

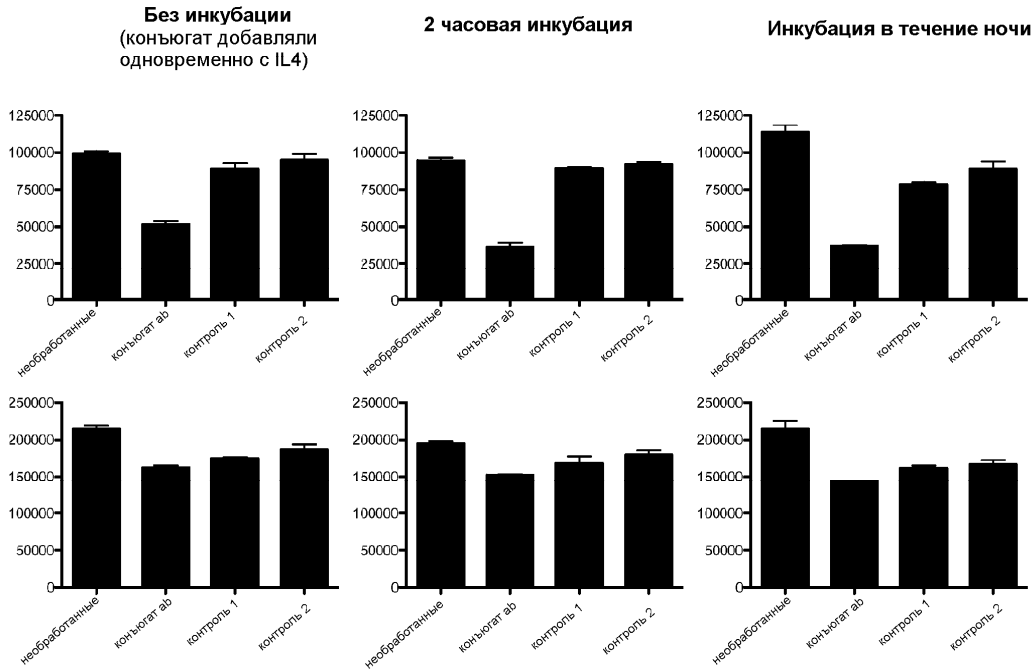
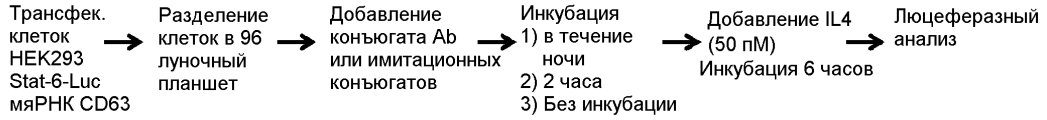


Фиг. 3

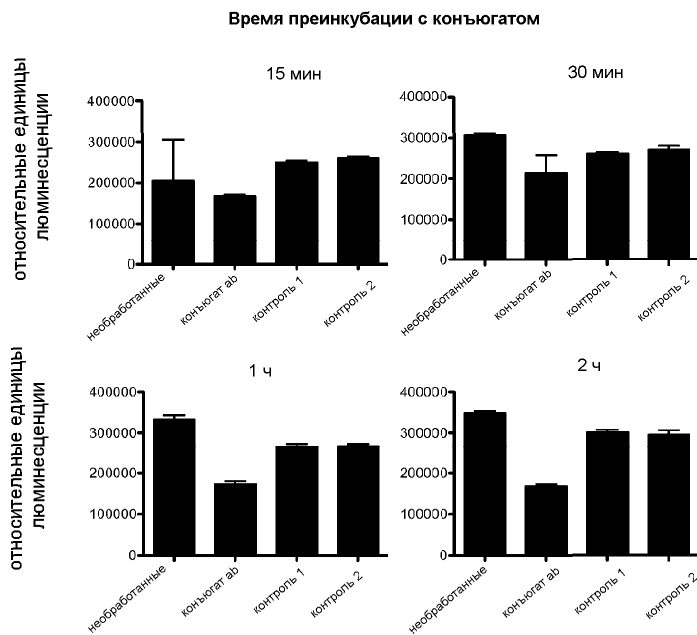
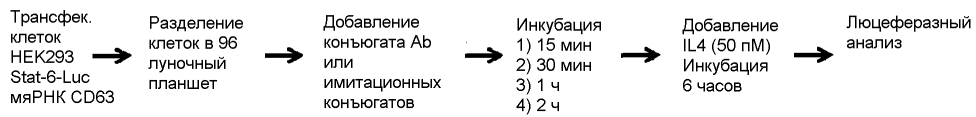
Stat6-luc репортер с мРНК CD63



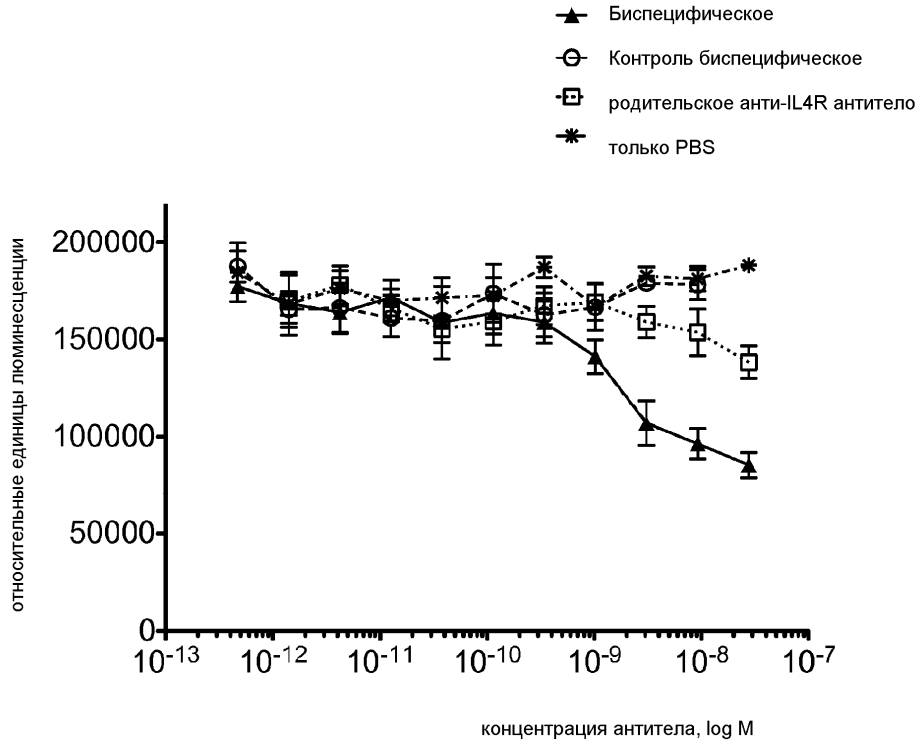
Фиг. 4



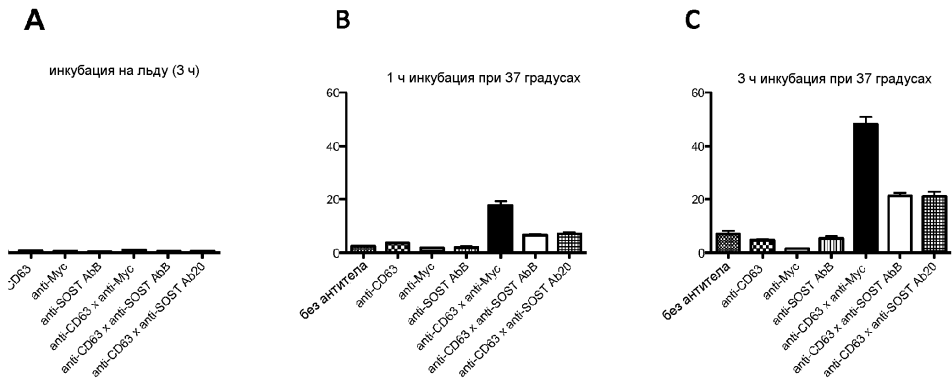
Фиг. 5



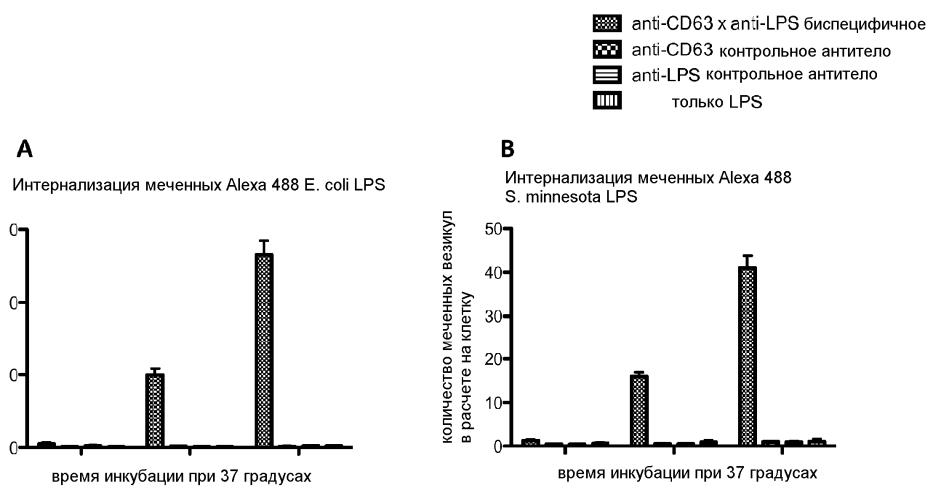
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

