(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 038973 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.17

(21) Номер заявки
201890222

(22) Дата подачи заявки
2016.07.06

(51) Int. Cl. ***C07K 16/28*** (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/188,860; 62/328,900; 62/347,179**
(32) **2015.07.06; 2016.04.28; 2016.06.08**
(33) **US**
(43) **2018.06.29**
(86) **PCT/US2016/041055**
(87) **WO 2017/007796 2017.01.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Андреев Джулиан, Тхамби Нитхя, Дельфино Фрэнк, Мартин Джоэл, Терстон Гэвин, Сиджнэр Кэтрин, Пападопулос Николас (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2013138400
JOHN M. LAMBERT ET AL.: "Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): An Antibody-Drug Conjugate (ADC) for HER2-Positive Breast Cancer", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 57, no. 16, 28 August 2014 (2014-08-28), pages 6949-6964, XP055264705, US, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/jm500766wwhole document, especially the Abstract

(57) Изобретение предусматривает полиспецифические антигенсвязывающие молекулы и их применение. Полиспецифические антигенсвязывающие молекулы содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает целевую молекулу, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает интернализирующий эффекторный белок. Полиспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению могут в некоторых вариантах осуществления быть биспецифическими антителами, которые способны связывать как целевую молекулу, так и интернализирующий эффекторный белок. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения одновременное связывание целевой молекулы и интернализирующего эффекторного белка с помощью полиспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению приводит к ослаблению активности целевой молекулы в большей степени, чем связывание целевой молекулы отдельно. В других вариантах осуществления настоящего изобретения целевая молекула является опухольассоциированным антигеном, и одновременное связывание опухольассоциированного антигена и интернализирующего эффекторного белка с помощью полиспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению вызывает целенаправленное уничтожение опухолевых клеток или способствует ему.

038973 B1

038973 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области терапевтических белков и, в частности, к области терапевтических белков, которые способны инактивировать, блокировать, ослаблять, устранять и/или уменьшать концентрацию одной или более целевых молекул in vitro или in vivo.

Предпосылки изобретения

Методы терапевтического воздействия часто требуют инактивации или блокирования одной или более целевых молекул, которые действуют вблизи клетки или на ее поверхности. Например, терапевтические средства на основе антител зачастую функционируют при связывании с определенным антигеном, экспрессируемым на поверхности клетки, или с растворимым лигандом, тем самым препятствуя нормальной биологической активности антигена. Антитела и другие связывающие конструкции, направленные против различных цитокинов (например, IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-22, IL-25, IL-33 и т.д.) или их соответствующих рецепторов, например, как было показано, применимы в лечении широкого спектра болезненных состояний и заболеваний человека. Терапевтические средства этого типа обычно функционируют путем блокирования взаимодействия между цитокином и его рецептором для ослабления или ингибирования клеточной передачи сигнала. Однако в определенных случаях с терапевтической точки зрения было бы выгодно инактивировать или ингибировать активность целевой молекулы таким способом, который не обязательно включает в себя блокирование ее физического взаимодействия с другим компонентом. Одним из способов достижения такого ослабления, не связанного с блокированием целевой молекулы, может быть уменьшение концентрации целевой молекулы вне клетки или на клеточной поверхности. Хотя генетические и основанные на нуклеиновых кислотах стратегии для уменьшения количества или концентрации данной целевой молекулы известны из уровня техники, такие стратегии зачастую чреваты значительными техническими сложностями и нежелательными побочными эффектами в терапевтических условиях. Соответственно необходимы альтернативные стратегии, не связанные с блокированием, для содействия инактивации или ослаблению воздействия различных целевых молекул в терапевтических целях.

Краткое описание

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере, частично на концепции ослабления воздействия или инактивации целевой молекулы путем содействия или обеспечения физической связи между целевой молекулой и интернализирующим эффекторным белком. Благодаря этому типу физической межмолекулярной связи целевая молекула может быть принудительно интернализирована в клетку вместе с интернализирующим эффекторным белком и процессирована посредством внутриклеточного механизма деградации или иным образом ослаблять, изолировать или инактивировать. Этот механизм представляет собой новую и заявляемую авторами настоящего изобретения стратегию для инактивации целевой молекулы или ослабления ее активности без необходимости блокирования взаимодействия между целевой молекулой и ее партнерами по связыванию.

Соответственно настоящее изобретение предусматривает полиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая способна одновременно связывать целевую молекулу (T) и интернализирующий эффекторный белок (E). Более конкретно настоящее изобретение предусматривает полиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую первый антигенсвязывающий домен (D1) и второй антигенсвязывающий домен (D2), где D1 специфически связывает T и D2 специфически связывает E и где одновременное связывание T и E с помощью полиспецифической антигенсвязывающей молекулы ослабляет активность T в большей степени, чем связывание T посредством только D1. Повышенное ослабление активности T может быть обусловлено принудительной интернализацией/деградацией T вследствие ее физической связи с E; однако другие механизмы действия возможны и не исключаются из объема настоящего изобретения.

Кроме того, настоящее изобретение предусматривает способы применения полиспецифической антигенсвязывающей молекулы для инактивации или ослабления активности целевой молекулы (T). В частности, настоящее изобретение предусматривает способ инактивации или ослабления активности T путем приведения T и интернализующего эффекторного белка (E) в контакт с полиспецифической антигенсвязывающей молекулой, где полиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый антигенсвязывающий домен (D1) и второй антигенсвязывающий домен (D2), где D1 специфически связывает T и где D2 специфически связывает E; и где одновременное связывание T и E полиспецифической антигенсвязывающей молекулой ослабляет активность T в большей степени, чем связывание T посредством только D1.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения D1 и/или D2 содержит(содержат) по меньшей мере одну вариабельную область антитела. Например, полиспецифическая антигенсвязывающая молекула может в некоторых вариантах осуществления представлять собой биспецифическое антитело, где D1 содержит пару вариабельных областей тяжелой и легкой цепей антитела (HCVR/LCVR), которая специфически связывает T, и где D2 содержит пару HCVR/LCVR, которая специфически связывает E. В качестве альтернативы, D1 и/или D2 может содержать пептид или полипептид, который специфически взаимодействует с целевой молекулой (T) и/или интернализирующим эффекторным белком (E). Например, если целевая молекула является рецептором клеточной поверхности, то D1

может содержать часть лиганда, который специфически связывает целевую молекулу, являющуюся рецептором клеточной поверхности. Аналогично, если интернализирующий эффекторный белок является интернализирующим рецептором клеточной поверхности, то D2 может содержать часть лиганда, который специфически связывает интернализирующий рецептор клеточной поверхности. В определенных вариантах осуществления D1 содержит вариабельную область антитела, которая специфически связывает T, и D2 содержит пептид или полипептид, который специфически связывает E. В еще одних вариантах осуществления D1 содержит пептид или полипептид, который специфически связывает T, и D2 содержит вариабельную область антитела, которая специфически связывает E. Однако в любой конфигурации конечный результат состоит в том, что T и E способны физически связываться, прямо или опосредованно, за счет одновременного связывания T и E полиспецифической антигенсвязывающей молекулой.

Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора следующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 (панели A-D) представлены схематические изображения четырех общих иллюстративных механизмов действия для полиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению. В каждой проиллюстрированной конфигурации D1 представляет собой первый антигенсвязывающий домен; D2 представляет собой второй антигенсвязывающий домен; T представляет собой целевую молекулу; E представляет собой интернализирующий эффекторный белок, и R представляет собой рецептор, который интернализируется при связывании E. На панели A изображена ситуация, в которой T и E оба связаны с мембраной. На панели B изображена ситуация, в которой T является растворимой и E связан с мембраной. На панели C изображена ситуация, в которой T связана с мембраной и E является растворимым белком, который взаимодействует и интернализируется в клетку благодаря взаимодействию E и R. На панели D изображена ситуация, в которой T является растворимой и E является растворимым белком, который взаимодействует и интернализируется в клетку благодаря взаимодействию E и R.

На фиг. 2 показаны результаты эксперимента по иммунопреципитации, проведенного на двух разных клетках (Cell-1, экспрессирующая только FcγR1, и Cell-2, экспрессирующая Krm2 и FcγR1), после инкубации в течение разных промежутков времени (0, 15, 30 и 60 мин) с полиспецифической антигенсвязывающей молекулой DKK1-mFc.

На фиг. 3 показана относительная люминесценция, индуцированная IL-4, продуцируемая клетками HEK293 с репортерной системой Stat6-luc в присутствии и отсутствие и полиспецифического антигенсвязывающего белка, связывающегося с IL-4R/CD63 ("ab-конъюгат"), или контрольных конструкций ("контроль 1" и "контроль 2") при различных концентрациях IL-4.

На фиг. 4 показаны результаты эксперимента, проведенного таким же образом, как эксперимент, показанный на фиг. 3, за исключением того, что экспрессия CD63 была значительно снижена в линии репортерных клеток с помощью siRNA, направленной против CD63.

На фиг. 5 показаны результаты эксперимента, проведенного таким же образом, как эксперименты, показанные на фиг. 3 и 4, за исключением того, что репортерные клетки инкубировали с полиспецифическим антигенсвязывающим белком ("Ab-конъюгат") или контрольными конструкциями ("контроль 1" и "контроль 2") в нулевой момент времени (панели A и B), в течение 2 ч (панели C и D) или в течение ночи (панели E и F) до добавления лиганда IL-4. Верхний ряд гистограмм (панели A, C и E) представляет результаты экспериментов, проведенных с клетками, экспрессирующими нормальные уровни CD63 ("нетрансфицированными"), тогда как нижний ряд гистограмм (панели B, D и F) представляет результаты экспериментов, проведенных с клетками, в которых экспрессия CD63 была значительно снижена в линии репортерных клеток с помощью siRNA, направленной против CD63.

На фиг. 6 показаны результаты эксперимента, проведенного таким же образом, как эксперименты, показанные на фиг. 3 и 4, за исключением того, что репортерные клетки инкубировали с полиспецифическим антигенсвязывающим белком, связывающимся с IL-4R/CD63 ("Ab-конъюгат"), или контрольными конструкциями ("контроль 1" и "контроль 2") в течение 15 мин (панель A), 30 мин (панель B), 1 ч (панель C) или 2 ч (панель D) до добавления лиганда IL-4.

На фиг. 7 показаны результаты эксперимента, в котором клетки с репортерной системой Stat6-luc обрабатывали 10 пМ IL-4 в присутствии различных разведений биспецифического антитела к IL-4R×CD63 ("биспецифическое") или контрольных конструкций (моноспецифической к IL-4R или имитирующей биспецифической, которая связывает только IL-4R).

На фиг. 8 показаны результаты экспериментов, в которых клетки HEK293 обрабатывали конструкцией SOST, меченой тус-меткой и pH-чувствительной меткой (которая продуцирует флуоресцентный сигнал при низком pH), а также различными моноспецифическими и биспецифическими антителами, такими как показано. Результаты выражены в виде числа флуоресцентных пятен (т.е. меченых везикул) на клетку. На панели A показаны результаты, полученные после инкубации на льду в течение 3 ч, на панели B показаны результаты после 1 ч инкубации при 37°C и на панели C показаны результаты после 3 ч инкубации при 37°C.

На фиг. 9 показаны результаты экспериментов, в которых клетки HEK293 обрабатывали флуоресцентно-меченым липополисахаридом (LPS) из E. coli (панель A) или S. minnesota (панель B), вместе с

биспецифическим антителом к CD63×LPS, контрольными антителами или только LPS в течение различных промежутков времени с последующим гашением неинтернализированного (т.е. связанного с поверхностью) флуорофора. Таким образом, флуоресцентный сигнал отражает интернализированный LPS при различных показанных условиях. Результаты выражены в виде числа флуоресцентных пятен (т.е. меченых везикул) на клетку.

На фиг. 10 показаны средние значения флуоресценции в условных единицах от меченых Alexa488 FelD1-mycv-myc-his. На синих гистограммах показана метка клеточной поверхности. На красных гистограммах изображена интернализированная метка. Группа 1 по оси X представляет клетки, обработанные биспецифическим антителом к HLA-B×FelD1; группа 2 представляет клетки, обработанные исходным бивалентным моноспецифическим антителом к HLA-B; группа 3 представляет обработку изотипическими контролями IgG. На панели A показаны связывание и интернализация FelD1-mmh-488 B-лимфобластоидными клетками C1Rneo, которые не экспрессируют MHC1. На панели B показаны связывание и интернализация FelD1-mmh-488 B-лимфобластоидными клетками C1Rneo, которые экспрессируют MHC1.

На фиг. 11 показана интернализация рецептора пролактина (PRLR) и HER2 на клетках T47D путем измерения количества PRLR или HER2, оставшихся на клеточной поверхности через 0-60 мин после переноса клеток из 4°C в 37°C. Показана процентная доля поверхностного рецептора, оставшегося с течением времени. Квадратами представлен PRLR, а треугольниками представлен HER2.

На фиг. 12 изображена совместная локализация рецептора пролактина (PRLR) и HER2 в лизосомах в клетках T47D. Показана процентная доля рецептора, связанного с лизосомами, с течением времени. Квадратами представлен PRLR, а треугольниками представлен HER2.

На фиг. 13 схематически изображены усечения и химеры PRLR и HER2.

На фиг. 14 изображены микрофотографии флуоресценции клеток HEK293, экспрессирующих различные конструкции и химеры PRLR и HER2. На подпанелях слева на каждой панели показаны клетки при 4°C до интернализации. На подпанели справа на каждой панели показаны клетки через час при 37°C. На панели A показаны клетки, экспрессирующие полноразмерный PRLR (PRLR FL). На панели B показаны клетки, экспрессирующие полноразмерный HER2 (PRLR FL). На панели C показаны клетки, экспрессирующие конструкцию PRLRectoHER2cytoTM. На панели D показаны клетки, экспрессирующие конструкцию HER2ectoPRLRcytoTM.

На фиг. 15 изображены микрофотографии флуоресценции клеток HEK293, экспрессирующих различные конструкции и усечения PRLR. На панели A показаны клетки, экспрессирующие полноразмерный PRLR, окрашенные по PRLR, через 1 ч при 4°C. На панели B показаны клетки, экспрессирующие полноразмерный PRLR, окрашенные по PRLR, через 1 ч при 37°C. На панели C показаны клетки, экспрессирующие усеченный PRLR с 42 остатками цитоплазматического домена, окрашенные по PRLR, через 1 ч при 4°C. На панели D показаны клетки, экспрессирующие усеченный PRLR с 42 остатками цитоплазматического домена, окрашенные по PRLR, через 1 ч при 37°C. На панели E показаны клетки, экспрессирующие усеченный PRLR только с 21 остатком цитоплазматического домена, окрашенные по PRLR, через 1 ч при 4°C. На панели F показаны клетки, экспрессирующие усеченный PRLR только с 21 остатком цитоплазматического домена, окрашенные по PRLR, через 1 ч при 37°C.

На фиг. 16 показаны вестерн-блоты клеточных лизатов клеток, экспрессирующих полноразмерный PRLR (панель A), клеток, экспрессирующих усеченный PRLR с 42 остатками оставшегося цитоплазматического домена (панель B), и клеток, экспрессирующих усеченный PRLR с 21 остатком оставшегося цитоплазматического домена (панель C). На верхних подпанелях показано окрашивание антителом к PRLR. На нижних подпанелях показано окрашивание по бета-актину для контроля нагрузки.

На фиг. 17 показана процентная доля клеток в раннем митозе по сравнению с уровнями экспрессии PRLR, или HER2, или PRLRectoHER2cytoTM (панель A), PRLR или HER2ectoPRLRcytoTM (панель B) на поверхности клетки после обработки либо PRLR-DM1, либо HER2-DM1.

На фиг. 18 показан вестерн-блот общих лизатов клеток, экспрессирующих различные конструкции PRLR с усечениями и заменами, через 0 и 4 ч после обработки CHX. На верхней панели показано окрашивание по PRLR, а на нижней панели показано окрашивание по бета-актину для контроля нагрузки.

На фиг. 19 показан вестерн-блот общих лизатов клеток из клеток HEK293, индуцированных для экспрессии полноразмерного PRLR, через 0, 1, 2 и 4 ч после обработки CHX. На верхней панели показано окрашивание по HER2, а на нижней панели показано окрашивание по PRLR.

На фиг. 20 показан вестерн-блот общих лизатов клеток из клеток HEK293, индуцированных для экспрессии формы PRLR с цитоплазматическим усечением через 0, 2 и 4 ч после обработки CHX. На верхней панели показано окрашивание по HER2, а на нижней панели показано окрашивание по PRLR.

На фиг. 21 показана совместная локализация HER2 с лизосомами в клетках T47D, обработанных биспецифическим антителом к HER2×PRLR. Процентная доля лизосом, связанных с рецептором HER2, показана с течением времени. Квадратами представлены клетки, обработанные биспецифическим антителом к HER2×PRLR, а треугольниками представлены клетки, обработанные несвязывающими контрольными антителами.

Фиг. 22 представляет собой гистограмму, показывающую процентное содержание клеток T47D/HER2 с арестом клеточного цикла (ось Y), обработанных 1, 10 или 30 нМ PRLR-ADC (A), HER2-ADC плюс биспецифическое антитело к HER2×PRLR (B), только HER2-ADC (C), несвязывающим контрольным ADC (D) или без обработки (E).

На фиг. 23 представлен точечный график, показывающий процентное содержание жизнеспособных клеток T47D, экспрессирующих HER2, в зависимости от повышения количества лекарственного средства: PRLR-ADC (A; квадраты), HER2-ADC плюс биспецифическое антитело к HER2×PRLR (B; ромбы), только HER2-ADC (C; треугольники вершиной вверх), несвязывающий контроль ADC (D; круги) или несвязывающий контроль ADC плюс биспецифическое антитело к HER2×PRLR (E; треугольники вершиной вниз).

На фиг. 24 показана панель результатов вестерн-блоттинга мышиной сыворотки крови, зондированной антителом к FelD1 в различные моменты времени (15 мин, 6 ч, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня и 6 дней) после обработки биспецифическим антителом к HLAB×FelD1, фосфатным буферным раствором, бивалентным моноспецифическим антителом к FelD1 и бивалентным моноспецифическим антителом к HLAB.

На фиг. 25 показана гистограмма, изображающая долю выделенного из мышиной сыворотки крови FelD1-Fc выше исходных уровней и нормализованную по отношению к исходному значению (ось Y). Под номером 1 показана обработка биспецифическим антителом к HLAB×FelD1; под номером 2 показана обработка бивалентным моноспецифическим антителом к FelD1 и под номером 3 показана обработка бивалентным моноспецифическим антителом к HLAB (ось X).

Фиг. 26 представляет собой гистограмму, показывающую поглощение pHrodo®-hHJV-mmh клетками HEK293. По оси Y показана интегрированная интенсивность (в условных единицах) сигнала pHrodo®. По оси X Anti-Myc::PCSK9 демонстрирует влияние на поглощение HJV отсутствия антитела (незакрашенный столбик), α-Myc::PCSK9FL (полностью закрашенный столбик), α-Myc::PCSK9LC (закрашенный горизонтальными линиями столбик) и α-Myc::PCSK9SC (закрашенный штрихом столбик); Anti-HJV::PCSK9 демонстрирует влияние на поглощение HJV отсутствия антитела (незакрашенный столбик), α-HJV-N:: PCSK9FL (полностью закрашенный столбик), α-HJV-N::PCSK9LC (закрашенный горизонтальными линиями столбик) и α-HJV-N::PCSK9SC (закрашенный штрихом столбик) и контролей без антитела для фонового поглощения.

Фиг. 27 представляет собой точечный график, показывающий уровни железа в сыворотке крови в микрограммах на децилитр сыворотки крови (ось Y) через одну неделю после обработки трансгенных мышей hHLAB с помощью блокирующего антитело к HJV бивалентного моноспецифического антитела (1); полноразмерного слитого белка anti-Myc::PCSK9 (2); неблокирующего антитело к HJV бивалентного моноспецифического антитела (3) и неблокирующего антитело к HJV::PCSK9 полноразмерного слитого белка (4).

Подробное описание изобретения

Перед описанием настоящего изобретения необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями экспериментов, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена быть ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как это обычно понимает специалист в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Используемое в данном документе выражение "приблизительно" при использовании в отношении конкретного указанного числового значения означает, что значение может отличаться от указанного значения не более чем на 1%. Например, используемое в данном документе выражение "приблизительно 100" включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные с описанными в данном документе или эквивалентные им, в данном документе описаны только предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Полиспецифические антигенсвязывающие молекулы.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что активность целевой молекулы можно ослабить путем связывания целевой молекулы с интернализирующимся эффекторным белком через полиспецифическую антигенсвязывающую молекулу.

Соответственно настоящее изобретение предусматривает полиспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен (также упоминается в данном документе как "D1") и второй антигенсвязывающий домен (также упоминается в данном документе как "D2"). D1 и D2

связывают разные молекулы. D1 специфически связывает "целевую молекулу". Целевая молекула также упоминается в данном документе как "Т". D2 специфически связывает "интернализирующий эффекторный белок". Интернализирующий эффекторный белок также упоминается в данном документе как "Е". В соответствии с настоящим изобретением одновременное связывание Т и Е посредством полиспецифической антигенсвязывающей молекулы ослабляет активность Т в большей степени, чем связывание Т посредством только D1. Используемое в данном документе выражение "одновременное связывание" в контексте полиспецифической антигенсвязывающей молекулы означает, что полиспецифическая антигенсвязывающая молекула способна вступать в контакт как с целевой молекулой (Т), так и с интернализирующим эффекторным белком (Е) в течение, по меньшей мере, некоторого периода времени в физиологически соответствующих условиях для содействия физической связи между Т и Е. Связывание полиспецифической антигенсвязывающей молекулы с компонентами Т и Е может быть последовательным; например полиспецифическая антигенсвязывающая молекула может сначала связывать Т, а затем связывать Е, или может сначала связывать Е, а затем связывать Т. В любом случае пока Т и Е оба связаны полиспецифической антигенсвязывающей молекулой в течение некоторого периода времени (независимо от последовательности связывания), полиспецифическая антигенсвязывающая молекула будет считаться "одновременно связывающей" Т и Е для целей настоящего изобретения. Не вдаваясь в теорию, полагают, что усиленная инактивация Т вызвана интернализацией и перенаправлением на деградацию Т в клетке вследствие ее физической связи с Е. Таким образом, полиспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению применимы для инактивации и/или снижения активности и/или концентрации вне клетки целевой молекулы без прямой блокировки или нарушения функции целевой молекулы.

В соответствии с настоящим изобретением полиспецифическая антигенсвязывающая молекула может представлять собой один многофункциональный полипептид или может представлять собой мультимерный комплекс из двух или более полипептидов, ковалентно или нековалентно связанных друг с другом. Как будет ясно из настоящего изобретения, любая антигенсвязывающая конструкция, которая обладает способностью одновременно связывать молекулы Т и Е, рассматривается как полиспецифическая антигенсвязывающая молекула. Любые из полиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению или их вариантов можно сконструировать с использованием стандартных молекулярно-биологических методов (например, технологии рекомбинантных ДНК и экспрессии белков), известных специалисту в данной области.

Антигенсвязывающие домены.

Полиспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению содержат по меньшей мере два отдельных антигенсвязывающих домена (D1 и D2). Используемое в данном документе выражение "антигенсвязывающий домен" означает любой пептид, полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты, молекулу каркасного типа, молекулу пептидного дисплея или конструкцию, содержащую полипептид, которая способна специфически связывать определенный антиген, представляющий интерес. Термин "специфически связывает" или подобный, используемый в данном документе, означает, что антигенсвязывающий домен образует комплекс с определенным антигеном, характеризующийся константой диссоциации (K_D) 500 пМ или меньше, и не связывает другие неродственные антигены в обычных условиях тестирования. "Неродственные антигены" представляют собой белки, пептиды или полипептиды, которые характеризуются менее чем 95% идентичностью аминокислот по отношению друг к другу.

Иллюстративные категории антигенсвязывающих доменов, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают антитела, антигенсвязывающие части антител, пептиды, которые специфически взаимодействуют с определенным антигеном (например, пептитела), рецепторные молекулы, которые специфически взаимодействуют с определенным антигеном, белки, содержащие лигандсвязывающую часть рецептора, которая специфически связывает определенный антиген, антигенсвязывающие каркасы (например, DARPin, белки с повтором HEAT, белки с повтором ARM, белки с тетратрикопептидным повтором и другие каркасы на основе белков с встречающимися в природе повторами и т.д. [см., например, Boersma and Pluckthun, 2011, Curr. Opin. Biotechnol. 22:849-857 и источники, упоминаемые в нем]) и аптамеры или их части.

В определенных вариантах осуществления, в которых целевая молекула или интернализирующий эффекторный белок является рецепторной молекулой, "антигенсвязывающий домен" для целей настоящего изобретения может содержать или состоять из лиганда или части лиганда, который является специфическим в отношении рецептора. Например, если целевая молекула (Т) является IL-4R, D1-компонент полиспецифической антигенсвязывающей молекулы может содержать лиганд IL-4 или часть лиганда IL-4, которые способны специфически взаимодействовать с IL-4R; или если интернализирующий эффекторный белок (Е) является рецептором трансферрина, D2-компонент полиспецифической антигенсвязывающей молекулы может содержать трансферрин или часть трансферрина, которые способны специфически взаимодействовать с рецептором трансферрина.

В определенных вариантах осуществления, в которых целевая молекула или интернализирующий эффекторный белок является лигандом, который специфически распознается определенным рецептором (например, растворимая целевая молекула), "антигенсвязывающий домен" для целей настоящего изобретения может содержать или состоять из рецептора или лигандсвязывающей части рецептора. Например,

если целевая молекула (T) представляет собой IL-6, D1-компонент полиспецифической антигенсвязывающей молекулы может содержать лигандсвязывающий домен рецептора IL-6; или если интернализирующий эффекторный белок (E) является белком, интернализируемым опосредованно (как этот термин определен в другом месте в данном документе), D2-компонент полиспецифической антигенсвязывающей молекулы может содержать лигандсвязывающий домен рецептора, специфического в отношении E.

Способы определения наличия специфического связывания двух молекул друг с другом хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Например, антигенсвязывающий домен, используемый в контексте настоящего изобретения, включает полипептиды, которые связывают определенный антиген (например, целевую молекулу [T] или интернализирующий эффекторный белок [E]) или его часть 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", используемый в данном документе, относится к оптическому явлению, которое обеспечивает возможность анализа взаимодействий в реальном времени посредством выявления изменений концентраций белков в биосенсорной матрице, например, с помощью системы BIAcore™ (подразделение Biacore Life Sciences в GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси).

Используемый в данном документе термин "K_D" означает равновесную константу диссоциации конкретного белок-белкового взаимодействия (например, взаимодействия антитело-антиген). Если не указано иное, значения K_D, раскрытые в данном документе, относятся к значениям K_D, определяемым методом поверхностного плазмонного резонанса 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. Используемый в данном документе термин "антитело" означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащие по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с определенным антигеном (например, T или E). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулинов, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как 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 как 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, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения FR антител по настоящему изобретению (или их антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основании анализа "бок о бок" двух или более CDR.

D1- и/или D2-компоненты полиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению могут содержать или состоять из антигенсвязывающих фрагментов молекул полных антител. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в данном документе, включают какой-либо встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или полученный с помощью методик генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полных антител с помощью любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные технологии генной инженерии, включающих манипуляцию с ДНК, кодирующей вариабельные и необязательно константные домены антител, и ее экспрессию. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и с ней можно проводить химические манипуляции или манипуляции с применением методик молекулярной биологии, например, для расположения одного или более вариабельных и/или константных доменов с образованием подходящей конфигурации или для введения кодонов, включения остатков цистеина, модификации, добавления или уда-

ления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают (i) Fab-фрагменты; (ii) $F(ab')_2$-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), как, например, CDR3-пептид) или ограниченный FR3-CDR3-FR4-пептид. Другие сконструированные молекулы, такие как доменспецифические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, мини-тела, нанотела (например, моновалентные антитела, бивалентные антитела и т.д.), иммунофармацевтические препараты на основе модульного белка малого размера (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", используемое в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может быть любого размера или аминокислотного состава и будет, как правило, содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями или прилегает к ней. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих V_H-домен, связанный с V_L-доменом, V_H- и V_L-домены могут располагаться относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H- или V_L-домен.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые можно найти в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (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 какой-либо конфигурации вариабельных и константных доменов, в том числе любых иллюстративных конфигурациях, изложенных выше, вариабельные и константные домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны с помощью целой шарнирной или линкерной области или ее части. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые обеспечивают образование гибкой или полугибкой связи между смежными вариабельными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) из любых конфигураций вариабельных и константных доменов, изложенных выше, нековалентно связанных друг с другом и/или с одним или более мономерными V_H- или V_L- доменами (например, с помощью дисульфидной(дисульфидных) связи(связей)).

Полиспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать или состоять из антител человека и/или рекомбинантных антител человека или их фрагментов. Термин "антитело человека", используемый в данном документе, включает антитела, содержащие вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека по настоящему изобретению могут, тем не менее, включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, за счет мутаций, вводимых с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза in vitro или введения соматической мутации in vivo), например в CDR и, в частности, в CDR3. Однако термин "антитело человека", используемый в данном документе, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего, например мыши, привиты на каркасные последовательности человека.

Полиспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать или состоять из рекомбинантных антител человека или их антигенсвязывающих фрагментов. Подразумевается, что используемый в данном документе термин "рекомбинантное антитело человека" включает все антитела человека, получаемые, экспрессируемые, создаваемые или выделяемые рекомбинантными способами, такие как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описанную ниже), антитела, выделяемые из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека (дополнительно описанной ниже), антитела, выделяемые у животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулинов человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, получаемые, экспрессируемые, создаваемые или выделяемые любым другим способом, который включает соединение последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу in vitro (или, если используется трансгенное животное для последовательностей Ig человека, соматическому му-

тагенезу in vivo) и, следовательно, аминокислотные последовательности V_H- и V_L-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, будучи полученными из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека, или родственными им, могут не существовать естественным образом в репертуаре антител зародышевой линии человека in vivo.

Биспецифические антитела.

В соответствии с определенными вариантами осуществления полиспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению представляют собой биспецифические антитела; например биспецифические антитела, содержащие антигенсвязывающее плече, которое специфически связывает целевую молекулу (T), и антигенсвязывающее плече, которое специфически связывает интернализирующий эффекторный белок (E). Способы получения биспецифических антител известны в данной области и могут быть использованы для конструирования полиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению. Иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или форматы диател, слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрому, выступы-во-впадины, обычную легкую цепь (например, обычную легкую цепь с выступами-во-впадины и т.п.), CrossMab, CrossFab, (SEED)-тело, лейциновую застежку, DuoBody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и биспецифические форматы Mab^2 (см., например, Klein et al., 2012, mAbs 4:6, 1-11, и источники, упоминаемые в данном документе, для обзора вышеизложенных форматов).

Компоненты мультимеризации.

Полиспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению в определенных вариантах осуществления могут также содержать один или более компонентов мультимеризации. Компоненты мультимеризации могут выполнять функцию поддержания связи между антигенсвязывающими доменами (D1 и D2). Как используется в данном документе, "компонент мультимеризации" представляет собой любую макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, которые обладают способностью связываться со вторым компонентом мультимеризации той же или подобной структуры или состава. Например, компонент мультимеризации может представлять собой полипептид, содержащий C_H3-домен иммуноглобулина. Неограничивающим примером компонента мультимеризации является Fc-часть иммуноглобулина, например Fc-домен IgG, выбранного из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любого аллотипа в каждой группе изотипов. В определенных вариантах осуществления компонент мультимеризации представляет собой Fc-фрагмент или аминокислотную последовательность длиной от 1 до приблизительно 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. В других вариантах осуществления компонент мультимеризации представляет собой остаток цистеина или короткий цистеинсодержащий пептид. Другие домены мультимеризации включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой застежки, мотива "спираль-петля" или суперспирального мотива.

В определенных вариантах осуществления полиспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению содержат два домена мультимеризации, M1 и M2, где D1 присоединен к M1, а D2 присоединен к M2, и где ассоциация M1 с M2 способствует физической связи D1 и D2 друг с другом в одной полиспецифической антигенсвязывающей молекуле. В определенных вариантах осуществления M1 и M2 идентичны друг другу. Например, M1 может быть Fc-доменом с определенной аминокислотной последовательностью, а M2 представляет собой Fc-домен с той же аминокислотной последовательностью, что и M1. В качестве альтернативы, M1 и M2 могут отличаться друг от друга по одному или более аминокислотным положениям. Например, M1 может содержать первый C_H3-домен иммуноглобулина (Ig), и M2 может содержать второй C_H3-домен Ig, где первый и второй C_H3-домены Ig отличаются друг от друга по меньшей мере по одной аминокислоте и где по меньшей мере одно отличие по аминокислоте уменьшает способность связывания целенаправленно воздействующей конструкции с белком A по сравнению с эталонной конструкцией, имеющей идентичные последовательности M1 и M2. В одном варианте осуществления C_H3-домен Ig в M1 связывает белок A, а C_H3-домен Ig в M2 содержит мутацию, которая уменьшает или устраняет связывание белка A, такую как модификация H95R (нумерация экзонов согласно IMGT; нумерация H435R согласно EU). C_H3 M2 может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые можно обнаружить в пределах C_H3 M2, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае Fc-домена IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае Fc-домена IgG2 и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае Fc-домена IgG4.

Интернализирующие эффекторные белки (E).

В контексте настоящего изобретения D2-компонент полиспецифической антигенсвязывающей молекулы специфически связывает интернализирующий эффекторный белок ("E"). Интернализирующий эффекторный белок представляет собой белок, который способен интернализироваться в клетку или который в противном случае участвует в ретроградном мембранном транспорте или способствует ему. В

некоторых случаях интернализирующий эффекторный белок представляет собой белок, который подвергается трансцитозу; т.е. белок интернализируется с одной стороны клетки и транспортируется на другую сторону клетки (например, от апикальной к базальной). Во многих вариантах осуществления интернализирующий эффекторный белок представляет собой белок, экспрессируемый на клеточной поверхности, или растворимый внеклеточный белок. Однако в настоящем изобретении также рассматриваются варианты осуществления, в которых интернализирующий эффекторный белок экспрессируется во внутриклеточном компартменте, таком как эндосома, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосома и т.д. Например, белки, участвующие в ретроградном мембранном транспорте (например, пути от ранних/рециркулирующих эндосом к сети транс-Гольджи), могут служить в качестве интернализирующих эффекторных белков в различных вариантах осуществления настоящего изобретения. В любом случае связывание D2 с интернализирующим эффекторным белком приводит к тому, что вся полиспецифическая антигенсвязывающая молекула и любые связанные с ней молекулы (например, целевая молекула, связанная с D1), также интернализируются в клетку. Как объясняется ниже, интернализирующие эффекторные белки включают белки, которые непосредственно интернализируются в клетку, а также белки, которые опосредованно интернализируются в клетку.

Интернализирующие эффекторные белки, которые прямо интернализируются в клетку, включают в себя связанные 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 обрабатываются по пути внутриклеточной деградации и/или рециркуляции. Конкретные неограничивающие примеры интернализирующих эффекторных белков, которые непосредственно интернализируются в клетку, включают, например, CD63, MHC-I (например, HLA-B27), Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, рецептор трансферрина, LDL-рецептор, родственный LDL-рецептору белок 1, ASGR1, ASGR2, подобный белку-предшественнику амилоида белок-2 (APLP2), рецептор апелина (APLNR), MAL (Myelin And lymphocyte protein (белок миелина и лимфоцитов), также известный как VIP17), IGF2R, H^+ АТФаза вакуолярного типа, рецептор дифтерийного токсина, рецептор фолата, рецепторы глутамата, рецепторы глутатиона, рецепторы лептина, скавенджер-рецепторы (например, SCARA1-5, SCARB1-3, CD36) и т.д.

В определенных вариантах осуществления интернализирующий эффекторный белок представляет собой рецептор пролактина (PRLR). Было обнаружено, что PRLR представляет собой не только мишень для определенных терапевтических применений, но также является эффективным интернализирующим эффекторным белком на основании его высокой скорости интернализации и возобновления. Потенциал PRLR как интернализирующего эффекторного белка, например, проиллюстрирован в WO 2015/026907, где показано, inter alia, что антитела к PRLR эффективно интернализируются PRLR-экспрессирующими клетками in vitro.

В вариантах осуществления, в которых E является непосредственно интернализируемым эффекторным белком, D2-компонент полиспецифической антигенсвязывающей молекулы может представлять собой, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которые специфически связывают E, или лиганд или часть лиганда, которые специфически взаимодействует с эффекторным белком. Например, если E представляет собой Kremen-1 или Kremen-2, D2-компонент может содержать или состоять из лиганда Kremen (например, DKK1) или его Kremen-связывающей части. В качестве другого примера, если E является рецепторной молекулой, такой как ASGR1, D2-компонент может содержать или состоять из лиганда, специфичного в отношении рецептора (например, асиалоорозомукоида [ASOR] или бета-GalNAc), или его рецепторсвязывающей части.

Интернализирующие эффекторные белки, которые опосредованно интернализируются в клетку, включают белки и полипептиды, которые сами по себе не интернализируются, а интернализируются в клетку после связывания или ассоциации иным образом со вторым белком или полипептидом, который непосредственно интернализируется в клетку. Белки, которые опосредованно интернализируются в клетку, включают, например, растворимые лиганды, которые способны связываться с интернализирующей рецепторной молекулой, экспрессируемой на клеточной поверхности. Неограничивающим примером растворимого лиганда, который (опосредованно) интернализируется в клетку благодаря его взаимодействию с интернализирующей рецепторной молекулой, экспрессируемой на клеточной поверхности, является трансферрин. В вариантах осуществления, где E представляет собой трансферрин (или другой опосредованно интернализируемый белок), связывание D2 с E и взаимодействие E с рецептором трансферрина (или другой интернализирующей рецепторной молекулой, экспрессируемой на клеточной поверхности) приводит к тому, что вся полиспецифическая антигенсвязывающая молекула и любые молекулы, связанные с ней (например, целевая молекула, связанная D1), интернализируются в клетку одновременно с интернализацией E и ее партнера по связыванию.

В вариантах осуществления, в которых E является опосредованно интернализируемым эффекторным белком, таким как растворимый лиганд, D2-компонент полиспецифической антигенсвязывающей молекулы может представлять собой, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которые специфически связывают E, или рецептор или часть рецептора, которые специфически взаимодействуют с растворимым эффекторным белком. Например, если E представляет собой цитокин, D2-

компонент может содержать или состоять из соответствующего рецептора цитокина или его лигандсвязывающей части.

Целевые молекулы (T).

В контексте настоящего изобретения D1-компонент полиспецифической антигенсвязывающей молекулы специфически связывает целевую молекулу ("T"). Целевая молекула представляет собой любой белок, полипептид или другую макромолекулу, активность или внеклеточную концентрацию которых требуется снизить, уменьшить или устранить. Во многих случаях целевая молекула, с которой связывается D1, представляет собой белок или полипептид [т.е. "целевой белок"]; однако настоящее изобретение также включает варианты осуществления, где целевая молекула ("T") представляет собой углевод, гликопротеин, липид, липопротеин, липополисахарид или другой небелковый полимер или молекулу, с которыми связывается D1. В соответствии с настоящим изобретением T может представлять собой целевой белок, экспрессируемый на клеточной поверхности, или растворимый целевой белок. Целевое связывание полиспецифической антигенсвязывающей молекулой может иметь место во внеклеточном окружении или на клеточной поверхности. Однако в определенных вариантах осуществления полиспецифическая антигенсвязывающая молекула связывает целевую молекулу внутри клетки, например во внутриклеточном компоненте, таком как эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, эндосома, лизосома и т.д.

Примеры целевых молекул, экспрессируемых на клеточной поверхности, включают рецепторы, экспрессируемые на клеточной поверхности, связанные с мембраной лиганды, ионные каналы и любой другой мономерный или полимерный полипептидный компонент с внеклеточной частью, который присоединен к клеточной мембране или связан с ней. Неограничивающие иллюстративные целевые молекулы, экспрессируемые на клеточной поверхности, на которые может быть нацелена полиспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, включают, например, рецепторы цитокинов (например, рецепторы IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-22, IL-25, IL-33 и т.д.), а также мишени на клеточной поверхности, включая другие трансмембранные рецепторы 1 типа, такие как PRLR, рецепторы, сопряженные с G-белком, такие как GCGR, ионные каналы, такие как Nav1.7, ASIC1 или ASIC2, нерецепторные поверхностные белки, такие как MHC-I (например, HLA-B*27) и т.д.

В вариантах осуществления, в которых T представляет собой целевой белок, экспрессируемый на клеточной поверхности, D1-компонент полиспецифической антигенсвязывающей молекулы может быть, например, антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела, которые специфически связывают T, или лигандом или частью лиганда, которые специфически взаимодействуют с целевым белком, экспрессируемым на клеточной поверхности. Например, если T представляет собой IL-4R, D1-компонент может содержать или состоять из IL-4 или его рецепторсвязывающей части.

Примеры растворимых целевых молекул включают цитокины, факторы роста и другие лиганды и сигнальные белки. Неограничивающий иллюстративный растворимый целевой белок, на который может быть нацелена полиспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, включает, например, IL-1, IL-4, IL-6, IL-13, IL-22, IL-25, IL-33, SOST, DKK1 и т.д. Растворимые целевые молекулы также включают, например, целевые молекулы, не относящиеся к человеческим, такие как аллергены (например, Fel D1, Betv1, CryJ1), патогены (например, Candida albicans, S. Aureus и т. д.) и патогенные молекулы (например, липополисахарид [LPS], липотейхоевая кислота [LTA], белок A, токсины и т.д.). В вариантах осуществления, в которых T представляет собой растворимую целевую молекулу, D1-компонент полиспецифической антигенсвязывающей молекулы может быть, например, антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела, которые специфически связывают T, или рецептором или частью рецептора, которые специфически взаимодействуют с растворимой целевой молекулой. Например, если T представляет собой IL-4, D1-компонент может содержать или состоять из IL-4R или его лигандсвязывающей части.

Целевые молекулы также включают опухольассоциированные антигены, как описано в другом месте в данном документе.

pH-зависимое связывание.

Настоящее изобретение предусматривает полиспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен (D1) и второй антигенсвязывающий домен (D2), где один или оба антигенсвязывающих домена (D1 и/или D2) связывают свой антиген (T или E) в зависимости от pH. Например, антигенсвязывающий домен (D1 и/или D2) может характеризоваться пониженной способностью к связыванию со своим антигеном при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. В качестве альтернативы, антигенсвязывающий домен (D1 и/или D2) может характеризоваться повышенной способностью связывания со своим антигеном при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Антигенсвязывающие домены с pH-зависимыми характеристиками связывания можно получить, например, путем скрининга популяции антител в отношении пониженной (или повышенной) способности связывания с конкретным антигеном при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на уровне аминокислот могут давать антигенсвязывающие домены с pH-зависимыми характеристиками. Например, путем замены одной или более аминокислот антигенсвязывающего домена (например, внутри CDR) на остаток гистидина можно получить антигенсвязывающий

домен с пониженной антигенсвязывающей способностью при кислом pH по сравнению с нейтральным pH.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение включает в себя полиспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие D1- и/или D2-компонент, который связывает свой соответствующий антиген (T или E) при кислом pH с K_D, которая по меньшей мере в приблизительно 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 или более раз больше, чем K_D D1- и/или D2-компонента для связывания с соответствующим антигеном при нейтральном pH. Зависимое от pH связывание также можно выразить как $t^1/_2$. антигенсвязывающего домена для его антигена при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение включает в себя полиспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие D1- и/или D2-компонент, который связывает свой соответствующий антиген (T или E) при кислом pH с $t^1/_2$, которое по меньшей мере в приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 или более раз меньше, чем $t^1/_2$ D1- и/или D2-компонента для связывания с соответствующим антигеном при нейтральном pH.

Полиспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению, которые содержат D1- и/или D2-компонент с пониженной антигенсвязывающей способностью при кислом pH по сравнению с нейтральным pH, при введении субъектам-животным могут в определенных вариантах осуществления характеризоваться более медленным выведением из кровотока по сравнению со сравниваемыми молекулами, которые не проявляют pH-зависимых характеристик связывания. В соответствии с данным аспектом настоящего изобретения предусмотрены полиспецифические антигенсвязывающие молекулы с пониженной способностью связывания антигена с T и/или E при кислом pH по сравнению с нейтральным pH, которые характеризуются по меньшей мере в 2 раза более медленным выведением из кровотока по сравнению со сравниваемыми антигенсвязывающими молекулами, которые не обладают пониженной способностью связывания антигена при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Скорость выведения может быть выражена в виде периода полужизни антитела, где более медленное выведение коррелирует с более длительным периодом полужизни.

Используемое в данном документе выражение "кислый pH" означает pH 6,0 или меньше. Выражение "кислый pH" включает значения pH, составляющие 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 меньше. Используемое в данном документе выражение "нейтральный pH" означает pH от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4. Выражение "нейтральный pH" включает значения pH, составляющие приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

Ослабление активности целевой молекулы.

Как уже упоминалось в другом месте данного документа и как показано в приведенных ниже демонстрационных примерах, авторы настоящего изобретения обнаружили, что одновременное связывание целевой молекулы (T) и интернализирующего эффекторного белка (E) с помощью полиспецифической антигенсвязывающей молекулы ослабляет активность T в большей степени, чем связывание T только с первым компонентом в виде антигенсвязывающего домена (D1) полиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Используемое в данном документе выражение "ослабляет активность T в большей степени, чем связывание T посредством только D1" означает, что в анализе, в котором активность T можно измерить с использованием клеток, которые экспрессируют E, уровень активности T, измеренный в присутствии полиспецифической антигенсвязывающей молекулы, по меньшей мере на 10% ниже уровня активности T, измеренной в присутствии контрольной конструкции, содержащей D1 отдельно (т.е. без физической связи со вторым антигенсвязывающим доменом (D2)). Например, уровень активности T, измеренный в присутствии полиспецифической антигенсвязывающей молекулы, может быть на приблизительно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% ниже уровня активности T, измеренного в присутствии контрольной конструкции, содержащей D1 отдельно.

Неограничивающий иллюстративный формат анализа для определения того факта, что полиспецифическая антигенсвязывающая молекула ослабляет активность целевой молекулы в большей степени, чем связывание целевой молекулы посредством только домена D1, показан в демонстрационных примерах 1 и 2 в данном документе ниже. В примере 1, например, "T" представляет собой рецептор интерлейкина-4 (IL-4R), а "E" представляет собой CD63. Полиспецифическая антигенсвязывающая молекула из примера 1 представляет собой конъюгат 2 антител, содержащий mAb к IL-4R, связанное с mAb к CD63 посредством линкера стрептавидин/биотин. Таким образом, "D1" в этой иллюстративной конструкции представляет собой антигенсвязывающий домен (пару HCVR/LCVR) антитела к IL-4R, а "D2" представляет собой антигенсвязывающий домен (пару HCVR/LCVR) антитела к CD63. Для экспериментов из примеров 1 и 2 использовали формат клеточного анализа, в котором продуцируется репортерный сигнал при стимуляции активности IL-4R добавлением экзогенного лиганда IL-4. Уровень индуцированной IL-4 репортерной активности, выявленной в присутствии полиспецифической антигенсвязывающей молекулы, сравнивали с уровнем индуцированной IL-4 репортерной активности, выявленной в присутствии контрольных конструкций, содержащих антитело к IL-4R, либо связанное с нерелевантным контрольным иммуноглобулином (контроль 1), или в комбинации с антителом к CD63 (контроль 2), но без физической связи с ним. Таким образом, контрольные конструкции создают условие, в котором T связана посредст-

вом только D1 (т.е. где D1 не является частью полиспецифической антигенсвязывающей молекулы per se). Если степень активности целевой молекулы (представленная репортерным сигналом), наблюдаемая в присутствии полиспецифической антигенсвязывающей молекулы, по меньшей мере на 10% меньше, чем уровень активности целевой молекулы, наблюдаемый в присутствии контрольной конструкции, содержащей D1-компонент, не связанный физически с D2-компонентом (например, контроль 1 или контроль 2), то для целей настоящего изобретения делается вывод о том, что "одновременное связывание T и E с помощью полиспецифической антигенсвязывающей молекулы ослабляет активность T в большей степени, чем связывание T посредством только D1".

Связывание T посредством только D1 может в некоторых вариантах осуществления приводить к частичному ослаблению активности T (как в случае примера 1, где обработка репортерных клеток только антителом к IL-4R [т.е. контроли 1 и 2] обеспечивала небольшой уровень ослабления передачи сигнала IL-4 по сравнению с необработанными клетками). В других вариантах осуществления связывание T посредством только D1 будет приводить к невыявляемому ослаблению активности T; то есть на биологическую активность T может не влиять связывание T посредством только D1. В любом случае, однако, одновременное связывание T и E с помощью полиспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению будет ослаблять активность T в большей степени, чем связывание T посредством только D1.

Альтернативные форматы анализа и варианты формата(форматов) анализа, приведенные в данном документе в качестве примера, будут очевидны специалистам в данной области техники с учетом природы конкретной целевой молекулы и эффекторных белков, к которым может быть применима любая данная полиспецифическая антигенсвязывающая молекула. Любой такой формат можно использовать в контексте настоящего изобретения для определения того, ослабляет ли одновременное связывание T и E с помощью полиспецифической антигенсвязывающей молекулы активность T в большей степени, чем связывание T посредством только D1.

Целенаправленное воздействие на опухоль.

В другом аспекте настоящего изобретения полиспецифические антигенсвязывающие молекулы применимы для целенаправленного воздействия на опухолевые клетки. В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения целевая молекула "T", с которой связывается D1, является опухольассоциированным антигеном. В определенных случаях опухольассоциированный антиген является антигеном, который обычно не интернализируется. Интернализирующий эффекторный белок "E", с которым связывается D2, может быть специфичным для опухоли или может экспрессироваться как на опухолевых, так и на неопухолевых клетках человека. Любой из интернализирующих эффекторных белков, упомянутых в другом месте данного документа, может быть направлен на противоопухолевые применения по настоящему изобретению.

Используемый в данном документе термин "опухольассоциированный антиген" включает белки или полипептиды, которые предпочтительно экспрессируются на поверхности опухолевой клетки. Выражение "предпочтительно экспрессируемый", используемое в данном контексте, означает, что антиген экспрессируется на опухолевой клетке на уровне, который по меньшей мере на 10% больше (например, на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 150, 200, 400% или больше), чем уровень экспрессии антигена на неопухолевых клетках. В определенных вариантах осуществления целевая молекула представляет собой антиген, который предпочтительно экспрессируется на поверхности опухолевой клетки, выбранной из группы, состоящей из клетки опухоли почки, клетки опухоли толстой кишки, клетки опухоли молочной железы, клетки опухоли яичника, клетки опухоли кожи, клетки опухоли легкого, клетки опухоли предстательной железы, клетки опухоли поджелудочной железы, клетки глиобластомы, клетки опухоли головы и шеи и клетки меланомы. Неограничивающие примеры специфических опухольассоциированных антигенов включают, например, AFP, ALK, белки BAGE, β-катенин, brc-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразу 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-ESO1, 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.

Полиспецифическая антигенсвязывающая молекула в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения может быть конъюгирована с лекарственным средством, токсином, радиоизотопом или другим веществом, которое негативно влияет на жизнеспособность клетки. В качестве альтернативы, лекарственное средство или токсин может быть веществом, которое непосредственно не уничтожает клетку, а делает клетку более восприимчивой к уничтожению другими посторонними средствами. В еще одних вариантах осуществления, включающих целенаправленное воздействие на опухоль, полиспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению сама по себе не конъюгирована с лекарственным средством, токсином или радиоизотопом, а вместо этого вводится в комбинации со второй анти-

генсвязывающей молекулой, специфичной в отношении мишени (T) (упоминаемой в данном документе как "молекула-сообщник"), где молекула-сообщник конъюгирована с лекарственным средством, токсином или радиоизотопом. В таких вариантах осуществления полиспецифическая антигенсвязывающая молекула предпочтительно будет связываться с эпитопом на целевой молекуле (T), который отличается от эпитопа, распознаваемого молекулой-сообщником, и/или не перекрывается с ним (т.е. с обеспечением одновременного связывания полиспецифической антигенсвязывающей молекулы и молекулы-сообщника с мишенью).

В близком варианте осуществления настоящее изобретение также включает противоопухолевые комбинации и терапевтические способы, включающие (a) конъюгированную с токсином или лекарственным средством антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывает опухоль-ассоциированный антиген; и (b) полиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую (i) первый связывающий домен, который специфически связывает интернализирующий эффекторный белок (например, с низкой аффинностью) и (ii) второй связывающий домен, который специфически связывает конъюгированную с токсином или лекарственным средством антигенсвязывающую молекулу. В данном варианте осуществления полиспецифическая антигенсвязывающая молекула функционирует для связывания конъюгированной с токсином или лекарственным средством антигенсвязывающей молекулы с интернализирующим эффекторным белком, который тем самым функционирует для физического связывания опухольассоциированного антигена с интернализирующим эффекторным белком. Интернализация меченого токсином антитела к опухольассоциированному антигену посредством его соединения с интернализирующим эффекторным белком, следовательно, приводила бы к целенаправленному уничтожению опухолевых клеток.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аспектов настоящего изобретения, касающихся целенаправленного воздействия на опухоль, полиспецифическая антигенсвязывающая молекула (или антитело-сообщник) может быть конъюгирована с одним или более цитотоксическими лекарственными средствами, выбранными из группы, состоящей из калихеамицина, эсперамицина, метотрексата, доксорубицина, мелфалана, хлорамбуцила, ARA-C, виндезина, митомицина C, цисплатина, этопозида, блеомицина, 5-фторурацила, эстрамустина, винкристина, этопозида, доксорубицина, паклитаксела, ларотаксела, тезетаксела, оратаксела, доцетаксела, доластатина 10, ауристатина E, ауристатина PHE и соединений на основе майтанзина (например, DM1, DM4 и т.д.). Полиспецифическая антигенсвязывающая молекула (или антитело-сообщник) может быть также, или в качестве альтернативы, конъюгирована с токсином, таким как дифтерийный токсин, экзотоксин A Pseudomonas aeruginosa, A-цепь рицина, A-цепь абрина, A-цепь модессина, альфа-сарцин, белки Aleurites fordii, диантиновые белки, белки Phytolaca americana и т.д. Полиспецифическая антигенсвязывающая молекула (или антитело-сообщник) может быть также, или в качестве альтернативы, конъюгирована с одним или более радиоизотопами, выбранными из группы, состоящей из ^{225}Ac, ^{211}At, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{186}Rh, ^{188}Rh, ^{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, данный аспект настоящего изобретения включает в себя полиспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые являются конъюгатами антитела и лекарственного средства (ADC) или конъюгатами антитела с радиоизотопом (ARC).

В контексте применений для уничтожения опухолей D2-компонент может при определенных обстоятельствах связываться с низкой аффинностью с интернализирующим эффекторным белком "E". Таким образом, полиспецифическая антигенсвязывающая молекула будет преимущественно целенаправленно воздействовать на опухолевые клетки, которые экспрессируют опухольассоциированный антиген. Как используется в данном документе, связывание "с низкой аффинностью" означает, что аффинность связывания D2-компонента к интернализирующему эффекторному белку (E) по меньшей мере на 10% слабее (например, на 15% слабее, на 25% слабее, на 50% слабее, на 75% слабее, на 90% слабее и т.д.), чем аффинность связывания D1-компонента к целевой молекуле (T). В определенных вариантах осуществления связывание "с низкой аффинностью" означает, что D2-компонент взаимодействует с интернализирующим эффекторным белком (E) с K_D, составляющей от более чем приблизительно 10 нМ до приблизительно 1 мкМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при приблизительно 25°C.

Одновременное связывание полиспецифической антигенсвязывающей молекулы с интернализирующим эффекторным белком и опухольассоциированным антигеном будет приводить к преимущественной интернализации полиспецифической антигенсвязывающей молекулы в опухолевые клетки. Если, например, полиспецифическая антигенсвязывающая молекула конъюгирована с лекарственным средством, токсином или радиоизотопом (или если полиспецифическую антигенсвязывающую молекулу вводят в комбинации с антителом-сообщником, которое конъюгировано с лекарственным средством, токсином или радиоизотопом), целенаправленная интернализация опухольассоциированного антигена в опухолевую клетку за счет ее связи с полиспецифической антигенсвязывающей молекулой будет приводить к крайне специфичному уничтожению опухолевых клеток.

Фармацевтические композиции и способы введения.

Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, содержащие полиспецифическую антигенсвязывающую молекулу. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут

быть составлены с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п.

Настоящее изобретение также включает способы инактивации или ослабления активности целевой молекулы (T). Способы по настоящему изобретению включают приведение целевой молекулы в контакт с полиспецифической антигенсвязывающей молекулой, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления способы согласно данному аспекту настоящего изобретения включают введение фармацевтической композиции, содержащей полиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, пациенту, для которого это является необходимым и/или благоприятным для инактивации, ослабления или иного снижения внеклеточной концентрации целевой молекулы.

Различные системы доставки известны из уровня техники и могут быть использованы для введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению пациенту. Способы введения, которые могут быть использованы в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения внутрикожные, внутримышечные, внутрибрюшинные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и пероральные пути. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить любым удобным способом, например путем инфузии или болюсной инъекции, абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые покровы (например, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и кишечника и т.д.), и их можно вводить совместно с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Например, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в отношении подкожной доставки можно использовать шприц-ручку для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению пациенту.

Примеры

Следующие примеры изложены с тем, чтобы обеспечить специалистов в данной области полным раскрытием и описанием того, как осуществлять и применять способы и получать и применять композиции по настоящему изобретению, и они не предполагают ограничение объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают в качестве своего изобретения. Были приложены усилия для обеспечения точности по отношению к используемым числам (например, количеству, температуре и т.п.), однако, необходимо учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, то части являются частями по массе, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура представлена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1. Применение полиспецифической антигенсвязывающей молекулы для индукции деградации рецептора клеточной поверхности посредством связывания с интернализирующим эффекторным белком.

В начальном эксперименте, подтверждающем концепцию, была создана полиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая способна связывать (a) интернализирующую эффекторную молекулу и (b) целевую молекулу, являющуюся рецептором клеточной поверхности. В данном примере интернализирующий эффекторный белок представляет собой Kremen-2 (Krm2), а целевая молекула, являющаяся рецептором клеточной поверхности, представляет собой Fc-рецептор (FcγR1 [Fc-гамма-R1]).

Молекулы Kremen (Krm1 и Krm2) представляют собой белки клеточной поверхности, которые, как известно, опосредуют передачу сигнала WNT посредством управления интернализацией и деградацией молекул LRP5 и LRP6, участвующих в сигнальном пути WNT. Интернализация LRP5/6 осуществляется посредством взаимодействующего в растворимом состоянии белка DKK1. В частности, DKK1 связывает Kremen с LRP5/6 на клеточной поверхности, и за счет этой связи интернализация Kremen обеспечивает управление интернализацией и деградацией LRP5 и LRP6 (см. Li et al., PLoS One 5(6):e11014).

Авторы настоящего изобретения попытались применить Kremen-связывающие свойства DKK1 и свойства интернализации Kremen для индуцирования интернализации FcγR1. Для содействия Kremen-опосредованной интернализации/деградации FcγR1 была сконструирована полиспецифическая антигенсвязывающая молекула, состоящая из DKK1, слитого с Fc мыши (DKK1-mFc, содержащая аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1). Как объясняется в другом месте данного документа, полиспецифическая антигенсвязывающая молекула определяется как молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен (D1), который специфически связывает целевую молекулу, и второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфически связывает интернализирующий эффекторный белок. В данном примере, подтверждающем концепцию, "первый антигенсвязывающий домен" представляет собой mFc-компонент, который специфически связывает целевую молекулу FcγR1, и "второй антигенсвязывающий домен" представляет собой DKK1-компонент, который специфически связывает интернализирующий эффекторный белок Kremen.

Сначала проводили эксперимент для определения того, может ли DKK1-mFc быть захвачен клетками посредством эндоцитоза Kremen-зависимым образом. Для этого эксперимента использовали две клеточные линии: Cell-1, клеточная линия HEK293, сконструированная для экспрессии FcγR1, но не Kremen-2, и Cell-2, клеточная линия HEK293, сконструированная для экспрессии как FcγR1, так и Kremen-2. Кондиционированную среду с DKK1-mFc в разведении 1:10 добавляли к соответствующим клеточным

линиям и инкубировали при 37°C в течение 90 мин. После 90 мин инкубации клетки окрашивали меченным Alexa-4 88 антителом к IgG мыши для выявления молекулы DKK1-mFc. С использованием флуоресцентной микроскопии было обнаружено, что DKK1-mFc практически не локализовалась в Cell-1 (без Kremen); однако были обнаружены значительные количества DKK1-mFc в Cell-2, которая экспрессирует Kremen-2. Таким образом, эти результаты показывают, что полиспецифическая антигенсвязывающая молекула DKK1-mFc может интернализироваться в клетки Kremen-зависимым образом.

Затем проводили эксперимент по определению зависимости от времени, чтобы определить, может ли DKK1-mFc индуцировать деградацию FcγR1 Kremen-зависимым образом. Краткое описание протокола эксперимента является следующим: Cell-1 (экспрессирующие только FcγR1) и Cell-2 (экспрессирующие Kremen-2 и FcγR1) обрабатывали 2 мг/мл сульфо-NHS-биотином в течение 15 мин на льду для мечения всех экспрессированных на клеточной поверхности белков. Затем клетки промывали и ресуспендировали в 400 мкл среды и делили на четыре аликвоты по 100 мкл, которые обрабатывали DKK1-mFc в течение различных промежутков времени (0, 15, 30 и 60 мин) при 37°C. После инкубирования с DKK1-mFc клетки осаждали и обрабатывали ингибиторами протеаз. Лизаты клеток для разных моментов времени инкубации подвергали иммунопреципитации FcγR1. Для иммунопреципитации FcγR1 антитело мыши к FcγR1 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 SDS-PAGE. Белки переносили на мембрану и зондировали с помощью HRP-меченого стрептавидина с целью выявления относительных количеств оставшегося представленного на поверхности белка FcγR1 в каждом образце. Результаты показаны на фиг. 2.

Как проиллюстрировано на фиг. 2, количество представленного на поверхности белка FcγR1 в образцах Cell-1 (экспрессирующих FcγR1, но не Kremen-2) оставалось относительно постоянным независимо от промежутка времени, в течение которого клетки подвергались воздействию DKK1-mFc. В отличие от этого количество представленного на поверхности белка FcγR1 в образцах Cell-2 (экспрессирующих как Kremen-2, так и FcγR1) значительно уменьшалось с увеличением времени инкубации с DKK1-mFc. Таким образом, данный эксперимент демонстрирует, что DKK1-mFc индуцирует деградацию экспрессируемого на клеточной поверхности FcγR1 Kremen-2-зависимым образом.

В совокупности вышеизложенные результаты показывают, что полиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая одновременно связывает целевую молекулу клеточной поверхности (FcγR1) и интернализирующий эффекторный белок (Kremen-2), может индуцировать деградацию целевой молекулы зависимым от эффекторного белка образом.

Пример 2. Активность IL-4R ослабляется с использованием полиспецифической антигенсвязывающей молекулы со специфичностью в отношении IL-4R и CD63.

В дополнительной серии экспериментов, подтверждающих концепцию, конструировали полиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая способна одновременно связывать целевую молекулу, экспрессируемую на клеточной поверхности (т.е. IL-4R), и экспрессируемый на клеточной поверхности интернализирующий эффекторный белок (т.е. CD63). Целью этих экспериментов было определение того, может ли активность IL-4R на клетке ослабляться в большей степени при физическом связывании IL-4R с эффекторной молекулой, которая интернализируется и направляется на деградацию в лизосому (в данном случае CD63). Другими словами, данный пример был предназначен для проверки того, можно ли использовать нормальную интернализацию и деградацию CD63 для стимуляции интернализации и перенаправления на деградацию IL-4R внутри клетки.

Сначала конструировали полиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая способна связывать как IL-4R, так и CD63. В частности, конъюгированное со стрептавидином антитело к IL-4R и биотинилированное антитело к CD63 объединяли в соотношении 1:1 с получением конъюгата антитело к IL-4R:антитело к CD63 (т.е. полиспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывает IL-4R и CD63). Антитело к IL-4R, используемое в данном примере, представляет собой полное mAb человека, вырабатываемое к внеклеточному домену IL-4R (антитело к IL-4R содержало вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO:3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO:4). Антитело к CD63, используемое в данном примере, представляет собой mAb мыши к CD63 человека, клон MEM-259, полученное от Biolegend (Сан Диего, Калифорния), № по каталогу 312002.

Также были созданы две контрольные конструкции: контроль-1 - антитело к IL-4R, конъюгированное со стрептавидином, объединенное в соотношении 1:1 с биотинилированным контрольным антителом мыши к IgG1-каппа; и контроль-2 - конъюгированное со стрептавидином антитело к IL-4R, объединенное в соотношении 1:1 с небиотинилированным антителом к CD63. Антитело к IL-4R, используемое в экспериментальных и контрольных конструкциях для данного примера, представляет собой антитело, которое, как известно, специфически связывает IL-4R и только частично блокирует IL-4-опосредованную передачу сигнала.

Экспериментальная клеточная линия, используемая в данном примере, представляет собой клеточную линию HEK293, содержащую репортерную конструкцию STAT6-люцифераза и дополнительный

STAT6 ("клетки HEK293/STAT6-luc"). Клетки, используемые в данном эксперименте, экспрессируют как IL-4R, так и CD63 на своей поверхности. При обработке IL-4 в отсутствие каких-либо ингибиторов эта клеточная линия производит дозозависимый детектируемый хемилюминесцентный сигнал, который отражает степень опосредованной IL-4 передачи сигнала.

В исходном эксперименте экспериментальную полиспецифическую молекулу, связывающуюся с IL-4R/CD63, или контрольные конструкции добавляли к клеткам HEK293/STAT6-luc так, что конечная концентрация антитела к IL-4R в среде составляла 12,5 нМ. Репортерный сигнал измеряли при возрастающих концентрациях IL-4 в присутствии и отсутствие экспериментальных и контрольных конструкций (фиг. 3). Как видно на фиг. 3, полиспецифическая молекула, связывающаяся с IL-4R/CD63 ("ab-конъюгат"), ингибировала опосредованную IL-4 передачу сигнала в значительно большей степени, чем любая контрольная конструкция.

Чтобы подтвердить, что эффект, наблюдаемый на фиг. 3, зависит от CD63, проводили тот же эксперимент, описанный выше, за исключением того, что экспрессию CD63 в репортерной клеточной линии значительно снижали с использованием siRNA, направленной против CD63. Со значительно сниженной экспрессией CD63 повышенная ингибирующая активность полиспецифической молекулы, связывающейся с IL-4R/CD63, больше не наблюдалась (фиг. 4). Этот результат свидетельствует о том, что способность полиспецифической молекулы, связывающейся с IL-4R/CD63, ослаблять опосредованную IL-4 передачу сигнала обусловлена одновременным связыванием полиспецифической молекулы с IL-4R и CD63 и последующей интернализацией и деградацией всего комплекса антитело-IL-4R-CD63.

Затем проводили аналогичные эксперименты, в которых полиспецифическую молекулу, связывающуюся с IL-4R/CD63, или контрольные конструкции инкубировали с репортерной клеточной линией HEK293/STAT6-luc в течение различных промежутков времени перед добавлением IL-4. В первой серии таких экспериментов молекулы инкубировали с репортерной клеточной линией в течение 0 ч (т.е. добавляли одновременно с IL-4), 2 ч или в течение ночи до добавления 50 пМ IL-4. Активность люциферазы измеряли через шесть часов после добавления IL-4. Результаты показаны на фиг. 5, верхняя панель ("нетрансфицированные"). В другой серии экспериментов выполняли аналогичный протокол, за исключением того, что экспериментальные или контрольные молекулы инкубировали с репортерной клеточной линией в течение 15 мин, 30 мин, 1 ч или 2 ч до добавления 50 пМ IL-4. Результаты показаны на фиг. 6.

Результаты, представленные на фиг. 5 и 6, показывают, что полиспецифическая молекула, связывающаяся с IL-4R/CD63, способна ингибировать опосредованную IL-4 передачу сигнала, и что этот ингибиторный эффект усиливается с более длительным временем инкубации. Как и в исходной серии экспериментов, с использованием siRNA для CD63 было подтверждено, что ингибиторный эффект полиспецифической молекулы, связывающейся с IL-4R/CD63, зависел от экспрессии CD63 (фиг. 5, нижняя панель ["siRNA для CD63"]).

Таким образом, в данном примере представлено дополнительное подтверждение концепции об ингибировании активности целевой молекулы путем применения полиспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая способна одновременно связывать как целевую молекулу (в данном случае IL-4R), так и интернализирующий эффекторный белок (в данном случае CD63), тем самым вызывая интернализацию и перенаправление на деградацию целевой молекулы внутри клетки. Другими словами, одновременное связывание IL-4R и CD63 с помощью иллюстративной полиспецифической антигенсвязывающей молекулы ослабляло активность IL-4R в значительно большей степени (т.е. >10%), чем связывание IL-4R только контрольными конструкциями.

Пример 3. Биспецифическое антитело к IL-4R×CD63 ослабляет активность IL-4R CD63-зависимым образом.

Эксперименты примера 2 в данном документе показывают, что полиспецифическая молекула, связывающаяся с IL-4R/CD63, ингибирует опосредованную IL-4 передачу сигнала CD63-зависимым образом. В этих экспериментах полиспецифическая антигенсвязывающая молекула состояла из двух отдельных моноклональных антител (к IL-4R и к CD63), которые были соединены посредством биотин-стрептавидиновой связи. С целью подтверждения того, что результаты, наблюдаемые для этой полиспецифической антигенсвязывающей молекулы, используемой для подтверждения концепции, являются обобщаемыми для других форматов полиспецифических антигенсвязывающих молекул, было сконструировано истинное биспецифическое антитело.

Стандартную технологию биспецифических антител применяли для конструирования биспецифического антитела, состоящего из первого плеча, специфического в отношении IL-4R, и второго плеча, специфического в отношении CD63. Специфическое в отношении IL-4R плечо содержало тяжелую цепь, связывающуюся с IL-4R, спаренную с CD63-специфической легкой цепью. CD63-специфическую легкую цепь спаривали с IL-4R -специфической тяжелой цепью исключительно в целях удобства получения конструкции; тем не менее, спаривание тяжелой цепи, связывающейся с IL-4R, с легкой цепью, связывающейся с CD63, сохраняло полную специфичность в отношении IL-4R и не характеризовалось связыванием с CD63. CD63-специфическое плечо содержало тяжелую цепь, связывающуюся с CD63, спаренную с легкой цепью, связывающейся к CD63 (той же легкой цепью, что и в плече, связывающем IL-4R). Тяжелую цепь, связывающуюся с IL-4R (содержащую SEQ ID NO:3), получали из полного антитела к IL-4R,

используемого в примере 2; а тяжелые и легкие цепи, связывающиеся с CD63, получали из антитела к CD63, обозначенного H5C6, полученного из Банка гибридом для исследований развития (Университет Айовы, факультет биологии, Айова-Сити, Айова). Как и в случае с полным антителом к IL-4R, используемым в примере 2, сам по себе связывающий IL-4R компонент биспецифического антитела, используемый в данном примере, проявлял только умеренную IL-4R-блокирующую активность.

Для оценки блокирующей активности биспецифического антитела к IL-4R×CD63 проводили анализ люциферазы для IL-4. Вкратце, серийные разведения биспецифического антитела к IL-4R×CD63 или контрольных молекул добавляли к репортерным клеткам HEK293/STAT6-luc (см. пример 2). В нормальных условиях эти клетки продуцируют детектируемый люциферазный сигнал при обработке IL-4. Для этого эксперимента к клеткам добавляли 10 пМ IL-4 и количественно определяли люциферазную активность для каждого разведения используемого антитела. Контрольные образцы, используемые в данном анализе, были следующими: (a) имитирующее биспецифическое антитело, которое связывает IL-4R с помощью одного плеча и имеет нефункциональное плечо, связывающееся с CD63 (т. е. содержит одну тяжелую цепь, связывающуюся с IL-4R, и одну тяжелую цепь, связывающуюся с CD63, обе спарены с легкой цепью, связывающейся с IL-4R); (b) моноспецифическое антитело к IL-4R и (c) только буфер (PBS) (без антитела). Результаты показаны на фиг. 7. Как показано на фиг. 7, для используемых контрольных образцов активность люциферазы оставалась относительно высокой даже при самых высоких концентрациях антител, тогда как для биспецифического антитела активность люциферазы значительно снижалась по мере увеличения концентрации антител. Эти результаты подтверждают, что одновременное связывание IL-4R и CD63 с помощью биспецифического антитела обеспечивает значительное ингибирование активности IL-4R.

Пример 4. Интернализация SOST с использованием полиспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая одновременно связывает SOST и CD63

В данном примере оценивали способность полиспецифических антигенсвязывающих молекул стимулировать интернализацию растворимой целевой молекулы SOST (склеростин). Для этих экспериментов целевая молекула представляла собой слитый белок, состоящий из белка SOST человека, меченного веществом pHrodo™ (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) и myc-меткой. Вещество pHrodo™ представляет собой pH-чувствительный краситель, который практически не флуоресцирует при нейтральном pH и ярко флуоресцирует в кислом окружении, таком как эндосома. Следовательно, флуоресцентный сигнал можно использовать в качестве индикатора клеточной интернализации слитого белка на основе SOST. Полиспецифическими антигенсвязывающими молекулами для этих экспериментов были биспецифические антитела со специфичностью связывания как в отношении CD63 (интернализирующий эффекторный белок), так и в отношении слитого белка на основе SOST (растворимая целевая молекула), как более подробно описано ниже.

Эксперименты проводили следующим образом: Вкратце, клетки HEK293 высевали в концентрации 10000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизином (Greiner Bio-One, Монро, Северная Каролина). После того как клетки оседали в течение ночи, среду заменяли средой, содержащей антитело (5 мкг/мл, как описано ниже), pHrodo™-myc-меченый SOST (5 мкг/мл), гепарин (10 мкг/мл) и Hoechst 33342. Затем клетки инкубировали в течение 3 ч на льду или 3 ч при 37°C. Все клетки промывали два раза перед визуализацией в PBS и число пятен флуоресценции на клетку, а также соответствующую интенсивность флуоресценции, подсчитывали для установления степени клеточной интернализации pHrodo™-myc-меченого SOST в присутствии различных конструкций антител.

Антитела, используемые в данном примере, были следующими: (1) моноспецифическое антитело к CD63 (клон H5C6, Банк гибридом для исследований развития, Университет Айовы, факультет биологии, Айова-Сити, Айова); (2) антитело к myc (клон 9E10, Schiweck et al., 1997, FEBS Lett. 414 (1) :33-38); (3) антитело к SOST (антитело, имеющее вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела, обозначенного "Ab-B" в патенте США № 7592429); (4) биспецифическое антитело к CD63×myc (т.е. полиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая плечо, связывающееся с CD63, полученное из антитела H5C6, и плечо, связывающееся с myc, полученное из 9E10); (5) биспецифическое антитело № 1 к CD63×SOST (т.е. полиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая плечо, связывающееся с CD63, полученное из антитела H5C6, и плечо, связывающееся с SOST, полученное из "Ab-B"); и (6) биспецифическое антитело № 2 к CD63×SOST (т.е. полиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая плечо, связывающееся с CD63, полученное из антитела H5C6, и плечо, связывающееся с SOST, полученное из антитела, обозначенного "Ab-20" в патенте США № 7592429). Биспецифические антитела, используемые в этих экспериментах, собирали с использованием методологии, называемой "выступы во впадины" (см., например, Ridgway et al., 1996, Protein Eng. 9 (7):617-621).

Результаты экспериментов по интернализации показаны на фиг. 8. На фиг. 8 показано число пятен (меченых везикул) на клетку при различных тестируемых условиях обработки. В совокупности результаты этих экспериментов демонстрируют, что биспецифические конструкции, которые одновременно связывают CD63 и SOST (либо непосредственно, либо через myc-метку) , обеспечили наибольшую степень интернализации SOST, что отражено в интенсивности флуоресценции и числе пятен флуоресценции на

клетку в динамике при 37°C. Таким образом, полиспецифические антигенсвязывающие молекулы, используемые в данном примере, способны эффективно управлять интернализацией растворимой целевой молекулы.

Пример 5. Изменения минеральной плотности костной ткани у мышей, обработанных полиспецифической антигенсвязывающей молекулой, которая связывает CD63 и SOST.

Затем полиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, связывающуюся с CD63×SOST, как описано в примере 4, тестировали в отношении ее способности увеличивать минеральную плотность костной ткани у мышей. В этих экспериментах использовали пять групп мышей (приблизительно 6 мышей на группу). Группы обработки представляли собой следующие: (I) необработанные мыши в качестве отрицательного контроля; (II) мыши, обработанные блокирующим моноспецифическим антителом к SOST, которое, как известно, само по себе увеличивает минеральную плотность костной ткани (положительный контроль); (III) мыши, обработанные биспецифическим антителом, которое специфически связывает CD63 и SOST, но само по себе не ингибирует активность SOST или само по себе лишь незначительно ингибирует активность SOST; (IV) мыши, обработанные исходным антителом к CD63 (т.е. моноспецифическим антителом, содержащим тот же антигенсвязывающий домен, связывающийся с CD63, что и биспецифическое антитело); и (V) мыши, обработанные исходным антителом к SOST (т.е. моноспецифическим антителом, содержащим тот же антигенсвязывающий домен, связывающийся с SOST, что и биспецифическое антитело). Количество антител, вводимых мышам в каждой группе, составляло приблизительно 10-25 мг/кг.

Ожидалось, что мыши в группе III (обработанные биспецифическим антителом к SOST×CD63) будут характеризоваться увеличением минеральной плотности костной ткани, которое по меньшей мере сравнимо с тем, которое наблюдалось у мышей группы II (обработанных известным блокирующим антителом к SOST), даже несмотря на то, что компонент биспецифического антитела к SOST не ингибирует активность SOST сам по себе (как подтверждается мышами в группе V, которые, как ожидалось, не характеризуются увеличением минеральной плотности костной ткани). Увеличение минеральной плотности костной ткани, которое ожидалось у мышей группы III, обусловлено, как считают, CD63-опосредованной интернализацией SOST, как наблюдалось в экспериментах на клетках из примера 4 выше.

Пример 6. Клеточная интернализация липополисахарида (LPS) опосредована полиспецифической антигенсвязывающей молекулой, которая одновременно связывает LPS и CD63.

Этот пример иллюстрирует применение полиспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению для управления интернализацией небелковой целевой молекулы, а именно липополисахарида (LPS). LPS является компонентом внешней мембраны грамотрицательных бактерий и, как известно, способствует септическому шоку. Антитела к LPS были исследованы как возможные средства для лечения сепсиса. Эксперименты в настоящем примере были разработаны для оценки способности полиспецифической антигенсвязывающей молекулы стимулировать интернализацию LPS.

Полиспецифическая антигенсвязывающая молекула, используемая в данном примере, представляла собой биспецифическое антитело с одним плечом, направленным на LPS (мишень), и другим плечом, направленным на CD63 (интернализирующий эффекторный белок). Плечо, связывающееся с LPS, 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; патент США № 5858728). Плечо, связывающееся с CD63, получали из антитела H5C6 (см. пример 4). Биспецифическое антитело к LPS×CD63 (т.е. полиспецифическую антигенсвязывающую молекулу) собирали с использованием методологии, называемой "выступы во впадины" (см., например, Ridgway et al., 1996, Protein Eng. 9(7):617-621).

В этих экспериментах использовали два вида LPS: IPS E. Coli и LPS Salmonella minnesota. Обе версии получали в виде флуоресцентно-меченых молекул (ALEXA-FLUOR®-488-меченый LPS, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния).

Эксперименты проводили следующим образом: Клетки HEK293 высевали в 96-луночные планшеты для визуализации, покрытые PDL. После покоя в течение ночи среду заменяли свежей средой. В стандартную среду добавляли флуоресцентно-меченый LPS (полученный либо из E. coli или из S. minnesota). Затем к образцам добавляли биспецифическое антитело к LPS×CD63 или контрольные полуантитела, спаренные с ложным Fc. После различных периодов инкубации при 37°C (1 и 3 ч) или на льду (3 ч) клетки из обработанных LPS образцов обрабатывали следующим образом: промывали - гасили антителом к ALEXA-FLUOR®-488 - промывали и фиксировали. Антитело к ALEXA-FLUOR®-488 гасит флуоресценцию от неинтернализированного (т. е. связанного на поверхности) флуорофора. Таким образом, любая флуоресценция, наблюдаемая в образцах, обработанных гасящим антителом, обусловлена интернализированным LPS. Измеряли уровень флуоресценции от каждого образца в разные моменты времени.

На фиг. 9 показаны результаты этих экспериментов в отношении числа меченых везикул на клетку. Как показано на фиг. 9, только клетки, обработанные биспецифическим антителом к CD63×LPS, продемонстрировали значительное число меченых везикул, которое со временем увеличивалось. Для клеток,

обработанных меченым LPS и контрольными антителами, не было обнаружено существенное число флуоресцентных везикул, что указывало на то, что LPS не интернализировался при этих условиях обработки.

Таким образом, данный пример демонстрирует, что биспецифическое антитело к LPS×CD63 обеспечивает интернализацию LPS в клетках способом, который требует одновременного связывания LPS и CD63. Соответственно эти результаты являются основанием для применения полиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению для стимуляции клеточной интернализации целевых молекул, таких как LPS, для лечения заболеваний и нарушений, таких как сепсис.

Пример 7. Клеточная интернализация и деградация Her2, опосредованные полиспецифической антигенсвязывающей молекулой, которая одновременно связывает Her2 и PRLR.

Этот пример включает в себя три отдельных эксперимента, которые иллюстрируют применение полиспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению для управления интернализацией и деградацией опухольассоциированного антигена (Her2). Удаление Her2 с поверхности опухолевых клеток было бы желательным подходом для лечения определенных видов рака, характеризующихся высокой экспрессией Her2 (например, рака молочной железы, рака желудка, гастроэзофагеальных форм рака и т.д.).

Полиспецифические антигенсвязывающие молекулы, используемые в экспериментах данного примера, представляют собой биспецифические антитела с одним плечом, направленным на Her2 (мишень), и другим плечом, направленным на PRLR (интернализирующий эффекторный белок).

Эксперимент 1.

В качестве исходного эксперимента оценивали способность биспецифического антитела к Her2×PRLR (называемого в данном документе "bsAb1 к Her2×PRLR") обеспечивать деградацию эндогенного Her2 в клетках рака молочной железы T47D. Клетки рака молочной железы T47D экспрессируют HER2 на низких уровнях, и, как правило, не восприимчивы к терапии, направленной против HER2 (см. Horwitz et al., "Variant T47D human breast cancer cells with high progesterone-receptor levels despite estrogen and antiestrogen resistance," Cell. 1982 Mar;28(3):633-42).

Плечо, связывающееся с Her2, получали из антитела, известного как трастузумаб. Плечо, связывающееся с PRLR, получали из полного антитела к PRLR человека. Биспецифическое антитело к Her2×PRLR (т.е. полиспецифическую антигенсвязывающую молекулу) собирали с использованием методологии, называемой "выступы во впадины" (см., например, Ridgway et al., 1996, Protein Eng. 9(7):617-621). Другими конструкциями, используемыми в данном эксперименте, были трастузумаб (моноспецифическое антитело), Ab к PRLR (моноспецифическое антитело, называемое H1H6958N2, изложенное в публикации заявки на патент США № 2015/0056221, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме) и моноспецифическое контрольное антитело (направленное против нерелевантного антигена, не относящегося к человеческому).

Для этого эксперимента клетки T47D, экспрессирующие эндогенные уровни рецепторов Her2 и PRLR, выращивали в RPMI (Irvine Scientific, 9160), дополненной 10% FBS (ATCC, 30-2020), 10 мМ Hepes, 1 мМ пирувата натрия и 10 мкг/мл инсулина. Циклогексимид (CHX) при 50 мкг/мл использовали для прекращения синтеза белка. Клетки T47D обрабатывали либо циклогексимидом и трастузумабом (CHX/трастузумаб), циклогексимидом и bsAb1 к Her2×PRLR (CHX/bsAb1), циклогексимидом и Ab к PRLR (CHX/PRLR Ab), циклогексимидом и контрольным Ab (CHX/контрольное Ab) либо циклогексимидом, Ab к PRLR и трастузумабом в течение 0, 1, 2 или 4 ч.

Клетки лизировали на льду в буфере RIPA (100 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 2% NP-40, 1% дезоксихолата натрия и 0,2% SDS) (Boston BioProducts BP-116X), дополненном ингибиторами протеаз и фосфатаз (Thermo Fisher, 1861280), а затем обрабатывали ультразвуком (Qsonica Model Q55, три импульса). Обработанные ультразвуком лизаты разбавляли 2X буфером для образцов с SDS 1:1, нагревали при 95°C в течение 10 мин, а затем центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатанты разделяли на 4-20% Tris-глициновых гелях Novex и подвергали блоттингу на PVDF-мембраны.

Антитела к Her2 (Dako, A0485) при 1:300 или антитела к PRLR (Life Technologies, 35-9200) при 1:250 использовали для первичного мечения мембран, затем следовало конъюгированное с HRP вторичное антитело при 1:5000 и детекция хемилюминесценции с помощью ECL (Amersham, RPN2106). Количественное определение для вестерн-блот-анализов проводили путем расчета чистой интенсивности полос с помощью программного обеспечения CareStream (Kodak). Результаты показаны в табл. 1. Значения выражены в относительных единицах по сравнению с фоном.

Как показано в табл. 1, после ингибирования синтеза белка с помощью циклогексимида было показано, что PRLR подвергается быстрой и полной деградации при всех используемых видах обработки; процесс не нарушался никаким из тестируемых антител. В отличие от этого в присутствии циклогексимида Her2 деградировал в клетках, обработанных bsAb1 к Her2×PRLR, но не смесью трастузумаба и Ab к PRLR, отдельных Ab к PRLR, трастузумаба или контрольных антител. Этот результат свидетельствует о том, что bsAb1 к Her2×PRLR служит для соединения Her2 с PRLR на клеточной поверхности, после чего

происходит деградация комплекса Her2-bsAb1-PRLR.

Таблица 1

Обработка	Время (ч.)	Her2	PRLR
Циклогексимид+трастузумаб	0	5,87	6,67
	1	2,51	4,28
	2	5,38	2,89
	4	5,66	0,18
Циклогексимид+bsAb1 к Her2xPRLR	0	3,99	6,48
	1	5,79	3,68
	2	2,36	1,62
	4	0,70	0,04
Циклогексимид+Ab к PRLR	0	5,36	5,75
	1	4,48	1,24
	2	4,24	0,69
	4	6,32	0
Циклогексимид+контрольное антитело	0	3,36	4,66
	1	3,09	3,10
	2	4,98	3,30
	4	4,74	0,23
Циклогексимид+трастузумаб+Ab к PRLR	0	5,37	6,12
	1	4,22	2,16
	2	4,48	0,44
	4	5,22	0

Эксперимент 2.

Во втором эксперименте исследовали дозозависимые эффекты полиспецифических антигенсвязывающих белков, связывающихся с Her2×PRLR, в отношении деградации Her2 in vitro, а также потенциальное влияние на уровни PRLR. В этом эксперименте использовали два разных биспецифических антитела к Her2×PRLR ("bsAb1 к Her2×PRLR" и "bsAb2 к Her2×PRLR"). Оба биспецифических антитела конструировали с использованием методологии "выступы-во-впадины". Плечо, связывающееся с Her2, было идентичным для обоих биспецифических антител и было получено из антитела, известного как трастузумаб. Плечи, связывающиеся с PRLR, для bsAb1 к Her2×PRLR и bsAb2 к Her2×PRLR были получены из двух разных полностью человеческих антител к PRLR.

Для этого эксперимента клетки T47D, экспрессирующие эндогенные уровни рецепторов Her2 и PRLR, выращивали в RPMI (Irvine Scientific, 9160), дополненной 10% FBS (ATCC, 30-2020), 10 мМ Hepes, 1 мМ пирувата натрия и 10 мкг/мл инсулина. Клетки T47D обрабатывали в течение 6 ч либо с bsAb1, либо с bsAb2 при 10, 3, 1, 0,3, 0,03 или 0 мкг/мл.

Клетки лизировали на льду в буфере RIPA (100 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 2% NP-40, 1% дезоксихолата натрия и 0,2% SDS) (Boston BioProducts BP-116X), дополненном ингибиторами протеаз и фосфатаз (Thermo Fisher, 1861280), а затем обрабатывали ультразвуком (Qsonica Model Q55, три импульса). Обработанные ультразвуком лизаты разбавляли 2X буфером для образцов с SDS 1:1, нагревали при 95°C в течение 10 мин, а затем центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатанты разделяли на 4-20% Tris-глициновых гелях Novex и подвергали блоттингу на PVDF-мембраны.

Антитела к Her2 (Dako, A0485) при 1:300, антитела к PRLR (Life Technologies, 35-9200) при 1:250 или антитела к бета-актину (Genetex, GTX100313) при 1:10000 использовали для первичного мечения мембран, затем следовало конъюгированное с HRP вторичное антитело при 1:5000 и детекция хемилюминесценции с помощью ECL (Amersham, RPN2106).

Количественное определение для вестерн-блот-анализов проводили путем расчета чистой интенсивности полос с помощью программного обеспечения CareStream (Kodak). Для контроля нагрузки использовали нормализацию к актину следующим образом: образец с наивысшей чистой интенсивностью для актина использовали в качестве контроля нормализации. Чистую интенсивность для актина каждого образца делили на контрольное значение нормализации с получением относительного значения для образца. Значения чистой интенсивности для каждого целевого белка (Her2 или PRLR) делили на рассчитанное относительное значение актина для образца с получением нормализованного значения Her2 или PRLR (условные единицы). Результаты показаны в табл. 2.

Как показано в табл. 2, как bsAb1 к Her2×PRLR, так и bsAb2 к Her2×PRLR индуцировали деградацию Her2 дозозависимым образом в клетках T47D. В отличие от этого уровни PRLR не были затронуты при обработке биспецифическими антителами. Этот результат согласуется с тем, что PRLR подвергается конститутивному поверхностному возобновлению на поверхности этих клеток.

Таблица 2

Обработка	Концентрация (мкг/мл)	Her2	PRLR
bsAb1 к Her2xPRLR	0	6,47	2,49
	0,03	3,44	0,95
	0,1	1,46	1,10
	0,3	1,47	1,33
	1,0	1,10	1,63
	3,0	1,27	1,64
	10,0	0,98	1,30
bsAb2 к Her2xPRLR	0	6,16	3,48
	0,03	4,37	2,71
	0,1	3,12	3,64
	0,3	2,43	3,42
	1,0	1,43	2,85
	3,0	1,55	2,52
	10,0	1,59	2,70

Эксперимент 3.

Вышеизложенные эксперименты свидетельствуют о том, что для деградации Her2 с помощью биспецифического антитела к Her2×PRLR необходимо, чтобы биспецифическое антитело одновременно связывало PRLR (интернализирующий эффекторный белок) и Her2 (целевой белок). Чтобы подтвердить этот принцип, провели третий эксперимент для оценки эффекта блокирования PRLR- либо Her2-связывающих плеч bsAb1 к Her2×PRLR в отношении активности интернализации Her2.

Для этого эксперимента клетки T47D, экспрессирующие эндогенные уровни рецепторов Her2 и PRLR, выращивали в RPMI (Irvine Scientific, 9160), дополненной 10% FBS (ATCC, 30-2020), 10 мМ Hepes, 1 мМ пирувата натрия и 10 мкг/мл инсулина. bsAb1 к Her2×PRLR (10 мкг/мл) оставляли необработанным (т.е. оба плеча свободны) или инкубировали либо с конструкцией растворимого белка PRLR ("PRLR.mmh" для блокирования связывания PRLR-связывающего плеча), либо с конструкцией растворимого белка Her2 ("Her2.mmh" для блокирования Her2-связывающего плеча) при 37°C в течение 1 ч (молярное соотношение 1:2) до добавления к клеткам T47D в течение 0, 2, 4 или 6 ч.

По окончании периода инкубирования клетки лизировали на льду в буфере RIPA (100 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 2% NP-40, 1% дезоксихолата натрия и 0,2% SDS) (Boston BioProducts BP-116X), дополненном ингибиторами протеаз и фосфатаз (Thermo Fisher, 1861280), а затем обрабатывали ультразвуком (Qsonica Model Q55, три импульса). Обработанные ультразвуком лизаты разбавляли 2X буфером для образцов с SDS 1:1 и нагревали при 95C в течение 10 мин, а затем центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатанты разделяли на 4-20% Tris-глициновых гелях Novex и подвергали блоттингу на PVDF-мембраны.

Антитела к Her2 (Dako, A0485) при 1:300 или антитела к бета-актину (Genetex, GTX100313) при 1:10000 использовали для первичного мечения мембран, затем следовало конъюгированное с HRP вторичное антитело при 1:5000 и детекция хемилюминесценции с помощью ECL (Amersham, RPN2106).

Количественное определение для вестерн-блот-анализов проводили путем расчета чистой интенсивности полос с помощью программного обеспечения CareStream (Kodak). Для контроля нагрузки использовали нормализацию к актину следующим образом: образец с наивысшей чистой интенсивностью для актина использовали в качестве контроля нормализации. Чистую интенсивность для актина каждого образца делили на контрольное значение нормализации с получением относительного значения для образца. Чистую интенсивность для полосы Her2 делили на рассчитанное относительное значение актина для образца с получением нормализованного значения Her2 (условные единицы). Результаты показаны в табл. 3.

Как показано в табл. 3, опосредованная bsAb1 к Her2×PRLR деградация Her2 полностью предотвращалась в клетках T47D блокированием либо Her2-, либо PRLR-плеч bsAb1 к Her2×PRLR, указывая на то, что деградация Her2 происходила путем его физического соединения с PRLR, которое было опосредовано одновременным связыванием Her2 и PRLR полиспецифическим антигенсвязывающим белком bsAb1 Her2×PRLR.

Пример 8. Повышенная активность трастузумаба эмтанзина, опосредованная полиспецифической антигенсвязывающей молекулой, которая одновременно связывает Her2 и PRLR.

Этот пример иллюстрирует применение полиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению для повышения активности конъюгата антитела и лекарственного средства ("ADC"). Более конкретно данный пример демонстрирует применение полиспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей первый связывающий домен, направленный на интернализирующий эффекторный белок, и второй связывающий домен, направленный на опухольассоциированный целевой антиген, в комбинации со второй антигенсвязывающей молекулой, специфической в отношении опухольассоциированного целевого антигена (также называемой в данном документе "молекула-сообщник"), где молекулой-сообщником является ADC. В экспериментах, представленных в данном до-

кументе ниже, интернализирующим эффекторным белком является рецептор пролактина (PRLR), опухольассоциированным целевым антигеном является Her2, а молекула-сообщник представляет собой ADC, специфический в отношении Her2 (т.е. трастузумаб эмтанзин (T-DM1)).

Трастузумаб является рекомбинантным гуманизированным моноклональным антителом, которое связывается с внеклеточным доменом Her2. Трастузумаб и его соответствующий ADC, трастузумаб эмтанзин или T-DM1, успешно применялись у пациентов с сильной сверхэкспрессией Her2, оцененной иммуногистохимически (IHC 3+). Однако в настоящее время нет эффективной терапии для пациентов с опухолями Her2 IHC2+ и Her2 IHC1+.

Таблица 3

Обработка	Время (ч.)	Her2
bsAb1 к Her2xPRLR	0	2,84
	2	2,39
	4	1,31
	6	0,42
bsAb1 к Her2xPRLR+PRLR.mmh	0	3,06
	2	1,94
	4	2,65
	6	2,30
bsAb1 к Her2xPRLR+Her2.mmh	0	2,16
	2	2,30
	4	2,56
	6	1,47

В данном примере оценивали способность четырех различных биспецифических антител к Her2×PRLR (называемых в данном документе "bsAb36 к Her2×PRLR", "bsAb37 к Her2×PRLR", "bsAb42 к Her2×PRLR" и "bsAb45 к Her2×PRLR") обеспечивать повышение цитотоксической активности T-DM1 на Her2-экспрессирующих клетках. Биспецифические антитела, используемые в этом примере, конструировали из четырех разных плеч, связывающихся с Her2, и двух разных плеч, связывающихся с PRLR, как обобщено в табл. 4.

Таблица 4

Биспецифическое антитело	Плечо, связывающееся с Her2	Плечо, связывающееся с PRLR
bsAb36 к Her2xPRLR	Ab-1 к Her2	Ab-1 к PRLR
bsAb37 к Her2xPRLR	Ab-2 к Her2	Ab-1 к PRLR
bsAb42 к Her2xPRLR	Ab-3 к Her2	Ab-2 к PRLR
bsAb45 к Her2xPRLR	Ab-4 к Her2	Ab-2 к PRLR

Для конструирования биспецифических антител к Her2×PRLR (т.е. полиспецифических антигенсвязывающих молекул) использовали стандартные способы. Контрольные эксперименты также проводили с использованием контрольного ADC (т.е. конъюгата антитела и лекарственного средства, содержащего антитело, направленное против нерелевантного белка, не являющегося человеческим, конъюгированное с DM1), или ADC анти-PRLR-DM1 (конъюгат антитело-лекарственное средство, упоминаемый как H1H6958N2 в US 2015/0056221, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

Для оценки способности биспецифических антител к Her2×PRLR усиливать цитотоксический эффект T-DM1 клетки T47D, экспрессирующие эндогенные уровни PRLR и сверхэкспрессирующие Her2 на промежуточных уровнях (T47D/Her2), сначала выращивали в RPMI (Irvine Scientific, 9160), дополненной 10% FBS (ATCC, 30-2020), 10 мМ Hepes, 1 мМ пирувата натрия и 10 мкг/мл инсулина. Затем клетки высевали на 96-луночные планшеты в концентрации 3000 клеток/лунку. На следующий день клетки оставляли необработанными или обрабатывали диапазоном концентраций либо T-DM1, либо контрольным ADC, либо анти-PRLR-DM1, либо комбинацией T-DM1 с 10 мкг/мл bsAb42 к Her2×PRLR, bsAb36 к Her2×PRLR, bsAb37 к Her2×PRLR или bsAb45 к Her2×PRLR в течение 3 дней в трех повторах.

Жизнеспособность клеток оценивали следующим образом: Через 3 дня после обработки клетки фиксировали 0,25% PFA, 0,1% сапонином, 2 мкг/мл Hoechst в течение 20 мин, изображения всей лунки получали на автоматизированном микроскопе ImageXpress^{MICRO} при 10× и анализировали с использованием модуля Cell Proliferation^{HT} MetzxPress™ Module (подсчет ядер). Результаты обобщены в табл. 5.

Таблица 5

Обработка	IC50 (нМ)
T-DM1	30,0
Контрольный ADC	200,0
T-DM1+bsAB42 к Her2xPRLR	2,0
Контрольный ADC+bsAB42 к Her2xPRLR	100,0
ADC к PRLR	0,9
T-DM1+bsAB37 к Her2xPRLR	2,0
T-DM1+bsAB36 к Her2xPRLR	2,5
T-DM1+bsAB45 к Her2xPRLR	1,0

Как показано в табл. 5, активность цитотоксичности T-DM1 значительно усиливалась в присутствии биспецифических антител к Her2×PRLR по настоящему изобретению. Таким образом, этот пример демонстрирует способность полиспецифических антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению усиливать активность и эффективность молекул иммуноконъюгата, направленных на целевые белки, которые обычно не интернализируются клетками быстрым образом.

Известно, что T-DM1 активен против опухолей, экспрессирующих HER2 на высоких уровнях, тогда как те клетки, которые экспрессируют HER2 на низких и промежуточных уровнях, остаются резистентными к терапии T-DM1. В отличие от этого анти-PRLR-ADC способен индуцировать надежное уничтожение клеток опухоли молочной железы, экспрессирующих PRLR на низких уровнях. Разница в эффективности уничтожения между анти-PRLR-ADC и T-DM1, вероятно, объясняется различием в скорости интернализации и перемещения в лизосому их соответствующих мишеней. Сравнивали внутриклеточное перемещение PRLR и HER2.

В этих клетках, экспрессирующих поверхностные PRLR и HER2 на низких уровнях, наблюдалось, что PRLR подвергается быстрому конститутивному лизосомному перемещению и деградации, которая большей частью не зависит от пролактинового лиганда. Однако HER2 не подвергался быстрому конститутивному лизосомному перемещению и деградации. Например, в клетки T47D, которые экспрессируют PRLR и HER2 на низких уровнях, интернализировалось 80% PRLR в течение 60 мин, тогда как HER не интернализировался (фиг. 11). В этих экспериментах клетки T47D инкубировали на льду либо с CF™594-меченным первичным антителом к PRLR, или с CF™594-меченным первичным антителом к HER2. Процесс интернализации инициировали добавлением к клеткам предварительно нагретой (37°C) среды. В указанные отрезки времени клетки фиксировали 4% параформальдегидом для прекращения интернализации и окрашивали вторичным конъюгированным с Alexa Fluor® 488 антителом козы к Fab человека для выявления неинтернализированных антител, оставшихся на клеточной поверхности (желтый). Совместную локализацию количественно определяли попиксельно для всех фрагментов конфокальной серии. Результаты показаны на фиг. 11.

Аналогично, PRLR, но не HER2, как было обнаружено, быстро интернализировался в лизосомный компартмент клеток T47D. CF™594-меченые антитела к PRLR или CF™594-меченые антитела к HER2 добавляли к клеткам T47D, предварительно меченным флуоресцеиндекстранами 3 кДа. Комплексам антитело-рецептор давали интернализироваться при 37°C в течение указанных промежутков времени (ось X на фиг. 12), затем фиксировали 4% параформальдегидом. Определяли совместную локализацию интернализированных антител для меченных декстранами лизосом. Результаты показаны на фиг. 12 и они по сути согласуются с данными по интернализации на фиг. 11.

Мотивы последовательности, определяющие конститутивное возобновление PRLR, картировали по области из 21 аминокислоты в цитоплазматическом домене рецептора; возобновление PRLR обеспечивало эффективный ADC-опосредованный арест клеточного цикла и уничтожение клеток. На фиг. 13 изображены различные конструкции PRLR и HER2, используемые в следующих экспериментах, в том числе (1) полноразмерный PRLR (PRLR FL), (2) полноразмерный HER2 (HER2 FL), (3) внеклеточный (Ecto) домен PRLR, слитый с трансмембранной (TM) и цитоплазматической (Cyto) частями HER2 (PRLRectoHER2cytoTM), (4) внеклеточный (Ecto) домен HER2, слитый с трансмембранной (TM) и цитоплазматической (Cyto) частями PRLR (HER2ectoPRLRcytoTM), (5) PRLR с удаленными аминокислотами 301-622 (что измерено по оставшемуся непроцессированному белку с сигнальным пептидом) (PRLR Cyto42) и (6) PRLR с удаленными аминокислотами 280-622 (что измерено по оставшемуся непроцессированному белку с сигнальным пептидом) (PRLR Cyto21).

Для картирования эффекторных последовательностей интернализации PRLR с одним из его доменов (внеклеточным, трансмембранным, цитоплазматическим) клетки HEK293 выращивали в 24-луночных планшетах с оптическим дном и транзиентно трансфицировали вектором для экспрессии в клетках млекопитающих, кодирующим PRLR, HER2, HER2ectoPRLRcytoTM или PRLRectoHER2cytoTM, в течение 24 ч. Затем трансфицированные клетки инкубировали на льду в присутствии CF™594-меченого первичного антитела, а затем нагревали до 37°C и инкубировали в течение еще одного часа. На фиг. 14 изображены окрашенные клетки при 4°C, в случае когда интернализация конструкций не ожидается), и после 37°C, в случае когда те конструкции, которые могут быстро интернализироваться, будут

интернализироваться. На панели A изображена интернализированная конструкция PRLR FL при 37°C. На панели B изображена конструкция HER2 FL, которая практически не была интернализирована в течение одного часа при 37°C. На панели C изображена конструкция PRLRecto-HER2cyto/TM, которая также практически не была интернализирована в течение одного часа при 37°C. На панели D изображена интернализированная конструкция HER2ectoPRLRcyto/TM при 37°C. Эти результаты свидетельствуют о том, что цитоплазматический домен PRLR обеспечивает эффекторную последовательность интернализации.

Эффекторную последовательность интернализации дополнительно картировали по аминокислотным остаткам PRLR от приблизительно 280 до приблизительно 300 (например, остатки 280-300 из SEQ ID NO:11, остатки DAHLLEKGKSEELLSALGCQD [SEQ ID NO:12]) (также известные как PRLR Cyto21-42). Эксперименты с мечеными антителами "из льда-в-37°C" проводили на клетках HEK293, как описано выше. На фиг. 15 изображено клеточное поглощение тех конструкций, которые содержат полный цитоплазматический домен PRLR (PRLR FL) (панели A и B), проксимальные к мембране 42 аминокислоты (PRLR Cyto42) (панели C и D) и проксимальную к мембране 21 аминокислоту (PRLR Cyto21) (панели D и E). В то время как конструкция PRLR Cyto42 быстро интернализировалась, для конструкции PRLR Cyto21 такая интернализация отсутствовала. Это демонстрирует, что область цитоплазматического домена PRLR между 21 и 42 аминокислотами, проксимальными к плазматической мембране (Cyto21-42), содержит информацию, необходимую для интернализации и деградации PRLR.

Чтобы определить, были ли деградированы интернализированные конструкции PRLR (т.е. нацелены в лизосому), трансфицированные клетки HEK293 обрабатывали циклогексимидом (CHX) в различные моменты времени после нагревания (0, 2, 4, 6 ч) для остановки продукции белка. Как продемонстрировано с помощью вестерн-блоттинга общих клеточных лизатов (фиг. 16), PRLR FL и PRLR Cyto42 быстро деградировали, в то время как деградация PRLR Cyto21 почти не наблюдалась.

Эффективность трансмембранного и цитоплазматического домена PRLR как обеспечивающего интернализацию эффектора для доставки лекарственного средства против клеточной пролиферации в виде конъюгата антитела и лекарственного средства (ADC) тестировали на трансфицированных клетках HEK293. Клетки HEK293 конструировали для экспрессии PRLR, HER2 или PRLRectoHER2cyto/TM в контролируемом тетрациклином режиме (например, с использованием системы Lenti-X™ Tet-On®, Clontech, Маунтин Вью, Калифорния). Трансфицированные клетки индуцировали в течение 24 ч с помощью 0,01, или 0,003, или 0,7 мкг/мл доксициклина для достижения различных уровней экспрессии рецепторов, которые определяли с помощью проточной цитометрии. Либо PRLR, конъюгированный с мертанзином (также известным как DM1, также известным как эмтанзин) (1 нМ) (панель A, фиг. 17), или HER2-DM1 (1 нМ) (панель B, фиг. 17), добавляли к соответствующим трансфицированным клеткам, которые инкубировали еще 24 ч. Анализ клеточного цикла проводили с использованием антитела к фосфогистону H3 (Ser10) для выявления клеток в раннем митозе. Результаты показаны на фиг. 17, на которой продемонстрировано, что трансмембранный/цитоплазматический домен PRLR эффективно опосредует доставку лекарственного средства в клетки.

Мутагенез по аланину цитоплазматического домена, в частности домена Cyto21-24, выполняли с целью картирования остатков, необходимых для интернализации. Сайт-направленный мутагенез двух дилейцинов, содержащихся в последовательности Cyto21-42, ингибировал возобновление PRLR Cyto42 на трансфицированных клетках HEK293. Клетки T-REx™ HEK293 (т.е. клетки, стабильно экспрессирующие Tet-On, ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) конструировали для экспрессии PRLR Cyto42, PRLR Cyto21, PRLR Cyto42 L283A L284A, PRLR Cyto42 L292A L293A или PRLR Cyto42 L283A L284A L292A L293A (также называемого 4LA) в контролируемом тетрациклином режиме (используя, например, платформу Jump-In™ Cell Engineering, ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс), индуцировали доксициклином (0,7 мкг/мл) в течение 24 ч и обрабатывали CHX (50 мкг/мл) в течение 0 или 4 ч. Результаты показаны в вестерн-блоттинге на фиг. 18, которая демонстрирует снижение деградации белка для конструкций, лишенных Cyto21-42 или дилейциновых повторов. Результаты подтверждают вывод о том, что эти остатки важны для лизосомного нацеливания.

Дополнительные эксперименты продемонстрировали, что возобновление PRLR, опосредуемое его цитоплазматическим доменом, является движущей силой, направляющей HER2 для лизосомной деградации, когда оба рецептора соединяются с помощью биспецифических антител к HER2(T)×PRLR. (HER2(T) представляет собой плечо трастузумаба.)/. Сначала оценивали кинетические параметры связывания биспецифического антитела и его исходных моноспецифических антител. Для биспецифического антитела была показана сходная кинетика связывания с внеклеточными доменами как HER2, так и PRLR, как и для его исходных антител (табл. 6).

Чтобы продемонстрировать, что цитоплазматический домен PRLR необходим для HER2(T)×PRLR bsAb-опосредованной деградации эндогенного HER2, клетки T-REx™ HEK2 93 сконструировали для экспрессии либо полноразмерного PRLR, либо усеченного PRLR, лишенного всего цитоплазматического домена (нижняя панель). Белки были экспрессированы в контролируемом тетрациклином режиме с применением платформы Cell-Platform Jump-In™ (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Клетки индуцировали в течение 24 ч с помощью 0,7 мкг/мл доксициклина с последующей инкубацией с CHX в

комбинации с указанными антителами (табл. 6) в течение разных промежутков времени, лизировали и обрабатывали для вестерн-блоттинга.

Таблица 6

Антитело	Белок	Кинетические параметры связывания			
		k_a ($M^{-1}c^{-1}$)	k_d (c-1)	K_D (M)	$T_{1/2}$ (ч.)
Антитело к HER2(T)	hHER2.mmh	$2,54\times10^{5}$	$1,01\times10^{-3}$	$3,98\times10^{-9}$	11
Антитело к PRLR	hPRLR.mmh	$1,20\times10^{6}$	$4,15\times10^{-3}$	$3,45\times10^{-9}$	3
Биспецифическое к HER2(T) x PRLR	hHER2.mmh	$1,70\times10^{6}$	$2,86\times10^{-4}$	$1,69\times10^{-9}$	40
	hPRLR.mmh	$5,51\times10^{6}$	$3,36\times10^{-4}$	$6,10\times10^{-10}$	34

На фиг. 19 показаны результаты вестерн-блоттинга лизатов из клеток, экспрессирующих полноразмерную конструкцию PRLR. Примечательно, что биспецифическое антитело к HER2(T)×PRLR эффективно нацеливает HER2 в лизосому, тогда как антитело к HER2(T) не делает этого, что демонстрирует эффективность PRLR как обеспечивающего интернализацию эффектора для HER2, экспрессируемого на низком уровне. На фиг. 20 показаны результаты вестерн-блоттинга лизатов из клеток, экспрессирующих конструкцию PRLR с цитоплазматическим усечением. При этом никакой деградации PRLR или HER2 не отмечали при любой обработке, что демонстрирует необходимость цитоплазматического домена PRLR для нацеливания этого рецептора и его молекулярного груза в лизосому.

Биспецифическое антитело к HER2×PRLR индуцировало перемещение в лизосому HER2, усиление HER2-ADC-индуцированного ареста клеточного цикла и способствовало уничтожению клеток T47D. Для определения нацеливания в лизосому клетки T47D обрабатывали либо несвязывающими контрольными антителами, либо биспецифическим антителом к HER2×PRLR и подвергали анализу эндоцитоза "из льда-в-37°C" Лизосомы и HER2 окрашивали и определяли процентную долю пикселей лизосомных маркеров, занимаемых пикселями HER2. Результаты показаны на фиг. 21, где продемонстрировано, что более чем 50-60% HER2 было нацелено на лизосому биспецифическим антителом к HER2×PRLR в течение 60 мин после нагревания по сравнению с менее чем 25% для контролей.

Чтобы определить, что биспецифическое антитело к HER2×PRLR усиливает опосредованный HER2-DM1 арест клеточного цикла, клетки T47D, экспрессирующие HER2, обрабатывали 1 нМ, 10 или 30 нМ PRLR-ADC (A), HER2-ADC плюс биспецифическое антитело к HER2×PRLR (B), только HER2-ADC (C), несвязывающим контрольным ADC (D) или без обработки (E). Процентную долю клеток в раннем митозе определяли по окрашиванию антителом к фосфогистону (Ser10), показателю ареста клеточного цикла. Результаты показаны на фиг. 22, где продемонстрировано, что HER2-ADC плюс биспецифическое антитело к HER2×PRLR (B) более эффективно осуществляет арест клеток, чем HER2-ADC отдельно (C).

Чтобы определить, что биспецифическое антитело к HER2× PRLR усиливает опосредованное HER2-DM1 уничтожение клеток, клетки T47D, экспрессирующие HER2, обрабатывали лекарственным средством, как показано на фиг. 23: PRLR-ADC (A), HER2-ADC плюс биспецифическое антитело к HER2×PRLR (B), только HER2-ADC (C), несвязывающий контроль ADC (D) или несвязывающий контроль ADC плюс биспецифическое антитело к HER2×PRLR (E). На фиг. 23 показаны результаты и продемонстрировано, что биспецифическое антитело к HER2×PRLR значительно снижает IC_{50} для HER2-ADC.

Пример 9. Высокая скорость возобновления и деградации мишени с использованием hMHC-1 как интернализирующей молекулы.

Для деградации растворимых и трансмембранных мишеней использовали белки с высокой скоростью возобновления. Полиспецифические антигенсвязывающие белки (например, биспецифические антитела) конструировали для связывания целевой молекулы с "разрушающими" белками (i), для которых известно быстрое возобновление, (ii) характеризующимися высоким уровнем опосредованного мишенью выведения бивалентных антител и (iii) для которых известно, что они перемещаются в лизосому или из нее. Для облегчения разработки и изготовления создали биспецифические антитела, содержащие обычную легкую цепь, тяжелую цепь, направленную на "разрушающий" белок, и тяжелую цепь, направленную на мишень. Одна из тяжелых цепей содержала модификацию H95R.

В этом примере выбранной разрушающей молекулой является главный комплекс гистосовместимости I, MHC-1, более конкретно класс I, изоформа B (также известный как HLA-B). Устойчиво связывающие моноклональные антитела к HLA быстро выводятся, что является отличительной чертой "разрушающей" молекулы. В качестве примера растворимой целевой молекулы выбрали аллерген FelD1 в качестве целевой молекулы. FelD1 представляет собой тетрамерный гликопротеин, содержащий два связанных дисульфидными связями гетеродимера. Сконструировали и протестировали две формы растворимого FelD1, слитый белок FelD1-myc-myc-his (FelD1-mmh) и слитый белок FelD1-Fc.

В одной серии экспериментов FelD1-mmh метили Alexa 488 для облегчения отслеживания интернализации мишени. В качестве полиспецифического антигенсвязывающего белка использовали биспецифическое антитело, содержащее HLA-B-специфическое плечо (связывающее разрушающую молекулу) и

FelD1-специфическое плечо (связывающее мишень) (α-HLAB27·α-FelD1). B-лимфобластоидные клетки C1Rneo, экспрессирующие HLA-B, инкубировали с 10 мкг/мл FelD1-mmh-Alexa 488 и 10 мкг/мл α-HLAB27·α-FelD1. Клетки инкубировали в течение ночи с обеспечением времени для интернализации целевого белка FelD1. Затем клетки окрашивали антителом к Alexa488 (Alexa-Fluor-488-Antibody-Polyclonal/A-11094, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс)), которое гасит флуоресценцию Alexa488. Антитело к Alexa488 не будет гасить меченую мишень, которая была интернализирована, поэтому интернализированную мишень можно отличить от мишени, которая связана на поверхности клетки. В данном случае флуоресценцию количественно определяли с помощью FACS.

На фиг. 10 показана средняя флуоресценция (условные единицы, определяемые в FACS) связанной с поверхностью мишени и интернализированной мишени как для MHC1-отрицательных клеток, которые служат в качестве контроля, так и для MHC1-положительных клеток. Используемым биспецифическим антителом было α-HLAB27·α-FelD1. В качестве контролей использовали исходное бивалентное антитело α-HLAB27·α-HLAB27 и неспецифический изотип IgG. Для клеток, экспрессирующих MHC1 (разрушающую молекулу), клетки, контактирующие с α-HLAB27·α-FelD1, показали приблизительно четырехкратное увеличение интернализированной целевой молекулы относительно ассоциированной с поверхностью целевой молекулы. Для контролей не было обнаружено практически никакого эффекта. Результаты показаны на фиг. 10 и в табл. 7 ниже.

Оценивали α-HLAB27-α-FelD1-опосредованное выведение FelD1-Fc из сыворотки крови мышей, у которых экспрессируется аллель HLA-B человека. Биспецифическое антитело α-HLAB27·α-FelD1 и контроли (PBS, бивалентное моноспецифическое антитело к FelD1 и бивалентное моноспецифическое антитело к HLAB27) вводили мышам, у которых экспрессируется аллель HLA-B человека, с помощью подкожной инъекции (10 мг/кг). На следующий день 1,6 мг/кг FelD1-Fc вводили путем инъекции в хвостовую вену (использовали соотношение антитело:мишень 3:1). Образцы сыворотки крови получали из крови из хвостовой вены, взятой через 15 мин, 6 ч, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 6 дней и 8 дней. Уровни FelD1 выявляли и количественно определяли путем вестерн-блоттинга с использованием антител к FelD1. Обработка биспецифическим α-HLAB27·α-FelD1 продемонстрировала быстрое выведение FelD1 с $t^1/_2$<30 ч, аналогичное скорости выведения антитела к HLAB27 в отсутствие FelD1 (т.е. $t^1/_2$ 33 ч) и более чем в два раза превышающее скорость выведения α-HLAB27·α-FelD1 в отсутствие FelD1 (т.е. $t^1/_2$ 65 ч). Введение антитела к FelD1 не влияло на опосредованное MHC1 выведение, но наблюдалось некоторое умеренное выведение, которое приписывается Fc-рецепторам. Результаты показаны на фиг. 11 и 12.

Таблица 7

Средние единицы флуоресценции (FelD1-mmh-Alexa288)

Антитело	B-лимфобластоидные клетки C1R *neo*			
	Клетки MHC *минус*		Клетки MHC *плюс*	
	На поверхности	Интернализированное	На поверхности	Интернализированное
α-HLAB27•α-FelD1	< 500	< 500	~ 825	~ 3350
α-HLAB27•α-FelD1	< 500	< 500	< 500	< 500
Изотипический контроль	< 500	< 500	< 500	< 500

Пример 10. Деградация мишени с использованием системы APLP2/PCSK9.

Чтобы оценить, можно ли пропротеин-конвертазу субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9) и ее партнеров по клеточной поверхности (такие как LDLR и APLP2, см. DeVay et al., "Characterization of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) trafficking reveals a novel lysosomal targeting mechanism via amyloid precursor-like protein 2 (APLP2)," 288(15) J. Biol. Chem. 10805-18 (Apr 12, 2013)) использовать в качестве эффекторов для опосредованного антителом разрушения мишени, получали слитые белки антимишень-PCSK9. Слитый белок можно рассматривать как модель для биспецифического антитела, которое включает в себя плечо, связывающее PSCK9 или APLP2 вместо слияния PCSK9.

Для этих экспериментов гемоувелин (HJV) использовали в качестве модельной мишени частично в связи с тем, что считывание эффективности in vivo, т.е. измерение увеличения сывороточного железа через неделю после начала обработки, является простым и надежным. HJV является корецептором для костного морфогенетического белка 6 (BMP6). Блокирование HJV ингибирует передачу сигнала BMP6 и снижает уровни гепсидина, что, в свою очередь, ингибирует транспортер железа ферропортин. В конечном счете, блокирование HJV увеличивает содержание железа в сыворотке крови (см. Core et al., "Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis," 5 Front. Pharmacol. 104 (1-9), May 13, 2014).

Создавали шесть слитых молекул антитело::PCSK9, каждая из которых содержит либо неблокирующее антитело к HJV (α-HJV-n), либо антитело к Myc (α-Myc) в остове hIgG1, слитом с одним из трех различных вариантов PCSK9 (например, SEQ ID NO:5) с помощью 3× GGGS-линкера (SEQ ID NO:6). Первый вариант представляет собой полноразмерный PCSK9 без сигнальной последовательности, но

включающий про-домен (полноразмерный ["PCSK9FL"]; SEQ ID NO:7). Второй вариант представляет собой только С-терминальный домен, включая определенную внутреннюю линкерную последовательность между каталитическим и С-концевым доменами PCSK9 (длинный С-концевой ["PCSK9LC"], SEQ ID NO:8). Третий вариант представляет собой короткий вариант С-концевого домена, который не включает данную внутреннюю линкерную последовательность (короткий С-концевой ["PCSK9SC"], SEQ ID NO:9). Ожидается, что С-концевые варианты будут связываться только с APLP2, а не с рецептором LDL.

Гибриды антитело::PCSK9 экспрессировались и секретировались клетками CHO. Плазмиды, содержащие как тяжелую цепь гибрида PCSK9, так и родственную легкую цепь соответствующего антитела, совместно трансфицировали в клетки CHO-K1 в чашках на 10 или 15 см. Затем клетки инкубировали в течение 4-5 дней, чтобы обеспечить выработку и секрецию гибрида антитело:PCSK9, после чего супернатант собирали и стерилизовали фильтрованием через 0,2-микронные фильтры. Супернатанты клеток CHO, содержащие слитые белки, впоследствии тестировали на их способность интернализировать растворимый белок HJV in vitro.

Растворимый HJV, меченный флуорофором pHrodo, получали следующим образом. Эктодомен HJV (SEQ ID NO:10), слитый с меткой myc-myc-6×his (mmh) с помощью GPG-линкера, экспрессировали в супернатантах CHO и очищали. Затем очищенный белок метили pHrodo® (Thermo Fisher Scientific, Уолтем) с использованием химического вещества N-гидроксисульфосукцинимида (NHS).

Клетки HepG2 инкубировали с раствором, содержащим 50% антитело::PCSK9-содержащий супернатант CHO, 50% среды HepG2 с 5% сывороткой, бедной липопротеинами, и 1 мкг/мл pHrodo®-меченого hHJV-mmh. Клетки HepG2 являются удобной моделью, поскольку они экспрессируют как LDLR, так и APLP2, ключевые белки, которые, как известно, интернализируют PCSK9. Однако для оценки PCSK9-слитых полиспецифических антигенсвязывающих белков специалист в данной области поймет, что любую клеточную линию (естественную, индуцированную, эктопически трансформированную и т.п.), в которой интернализируется PCSK9, в том числе через партнеров по связыванию, отличных от LDLR и APLP2, можно использовать в этом анализе. Клетки высевали при 1,5×105 клеток на мл за день до анализа и инкубировали при 37°C. Интернализацию контролировали в течение 24 ч с помощью визуализации на Imager ImageXpress® для одновременного многопараметрического анализа (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния) с 24-часовым моментом времени, показывающим наибольшую разницу между конструкциями и контролями, вероятно, ввиду накопления pHrodo®-HJV-mmh в клетках на протяжении всего анализа. Флуоресценцию, отображающую интернализацию, количественно определяли с помощью программного обеспечения MetaXpress® (Molecular Devices).

Инкубация с α-HJV-N::PCSK9FL и α-Myc::PCSK9FL увеличивала степень интернализации pHrodo®-меченого белка HJV-mmh по сравнению с контролем без антител. Поскольку pHrodo-меченый HJV-mmh содержит две myc-метки, ожидается, что α-Myc::PCSK9FL будет действовать аналогично α-HJV-N::PCSK9FL в этом анализе. Интересно, что слитые белки, содержащие С-концевые домены PCSK9 (т.е. α-HJV-N::PCSK9LC и α-HJV-N::PCSK9SC), не смогли интернализировать меченый белок HJV, возможно, из-за ослабленного связывания LDLR. Результаты показаны на фиг. 26.

Пример 11. Деградация мишени in vivo с использованием системы APLP2/PCSK9.

Исходное бивалентное моноспецифическое антитело α-HJV-N (которое не блокирует связывание BMP с HJV), бивалентное моноспецифическое антитело α-HJV-B (которое блокирует связывание BMP с HJV), слитый белок α-HJV-N::PCSK9FL и слитый белок α-Myc::PCSK9FL тестировали на их способность блокировать передачу сигнала HJV in vivo. Молекулы вводили мышам с помощью гидродинамической доставки (HDD). Образцы сыворотки крови брали через неделю. Поскольку эндогенный HJV не имеет myc-myc-his-метки, слитый белок α-Myc::PCSK9FL функционирует как отрицательный контроль in vivo. Как и ожидалось, HDD бивалентного полиспецифического антитела α-HJV-N (положительный контроль) привела к значительному увеличению содержания железа в сыворотке крови относительно отрицательных контролей. HDD α-HJV-N::PCSK9FL (тестируемая молекула) также привела к значительному увеличению содержания железа в сыворотке крови, аналогичному по величине, как у блокирующего антитела, свидетельствуя о том, что эта молекула эффективна при интернализации и либо изолировании, либо разрушении HJV in vivo (фиг. 27).

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения, кроме описанных в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеизложенного описания и сопровождающих фигур. Такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ингибирования роста клетки рака молочной железы или стимулирования уничтожения клетки рака молочной железы, при этом способ включает приведение клетки рака молочной железы в контакт с биспецифическим антителом, где

(a) биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает опухольассоциированную мишень (T), и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает интернализирующий эффекторный белок (E), где T означает HER2, и E означает рецептор пролактина (PRLR);

(b) указанная клетка рака молочной железы экспрессирует HER2;

(c) указанный HER2 подвергается лизосомному нацеливанию и деградации в присутствии указанного биспецифического антитела; и

(d) указанное биспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело к HER2×PRLR.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий приведение указанной клетки рака молочной железы в контакт с цитотоксическим средством, где цитотоксическое средство конъюгировано с биспецифическим антителом или контактирует с клеткой и затем транспортируется в лизосому в указанной клетке.

3. Способ по п.2, где цитотоксическое средство представляет собой конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC), содержащий лекарственное средство, токсин или радиоизотоп, конъюгированные с антигенсвязывающим белком, который специфически связывает указанную T.

4. Способ по п.3, где антигенсвязывающая часть ADC связывает эпитоп на T, который не перекрывается с эпитопом на T, распознаваемым первым антигенсвязывающим доменом биспецифического антитела.

5. Способ по п.3 или 4, где указанный антигенсвязывающий белок указанного ADC представляет собой антитело.

6. Способ по п.2, где цитотоксическое средство представляет собой радиоизотоп, токсин или лекарственное средство.

7. Способ по любому из пп.3-6, где указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из лекарственного средства на основе калихеамицина, ауристатина или майтансина.

8. Способ по любому из пп.1-7, где аффинность связывания биспецифического антитела к E меньше, чем аффинность связывания биспецифического антитела к T.

9. Способ по любому из пп.1-8, где E содержит цитоплазматический домен, содержащий один или более дилейциновых мотивов.

10. Способ по п.9, где E содержит цитоплазматический домен, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12.

11. Способ по п.9 или 10, где T представляет собой рецепторную тирозиновую протеинкиназу.

12. Способ по любому из пп.3-5, где указанный ADC содержит лекарственное средство на основе майтансина, конъюгированное с бивалентным моноспецифическим антителом к HER2 или с бивалентным моноспецифическим антителом к PRLR.

13. Способ по любому из пп.1-12, где указанная клетка рака молочной железы представляет собой клетку T47D.

14. Фармацевтическая композиция для ингибирования роста или стимулирования уничтожения клетки рака молочной железы, содержащая:

(a) биспецифическое антитело, которое содержит домен, который специфически связывается с (i) рецептором клеточной поверхности, который представляет собой рецептор пролактина (PRLR), и домен, который специфически связывается с (ii) рецептором клеточной поверхности, который представляет собой HER2, где указанный PRLR и указанный HER2 экспрессируются на клетке рака молочной железы и где указанное биспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело к HER2×PRLR; и

(b) цитотоксическое средство.

15. Фармацевтическая композиция по п.14, где указанный PRLR содержит цитоплазматический домен, содержащий один или более дилейциновых мотивов.

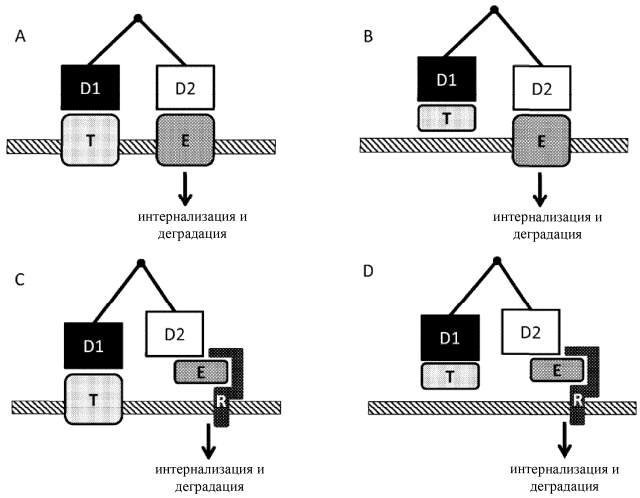
16. Фармацевтическая композиция по п.15, где указанный PRLR содержит цитоплазматический домен, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:12.

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп.14-16, где указанный HER2 представляет собой рецепторную тирозиновую протеинкиназу.

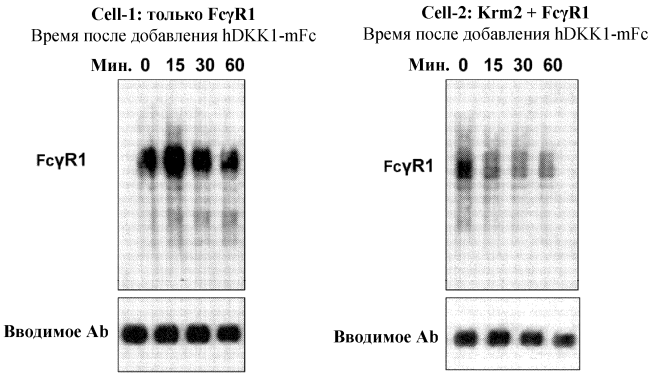
18. Фармацевтическая композиция по любому из пп.14-17, где указанное цитотоксическое средство содержит лекарственное средство на основе майтансиноида, конъюгированное с биспецифическим антителом.

19. Способ по любому из пп.1-13, где клетка рака молочной железы характеризуется как клетка рака IHC2+ молочной железы.

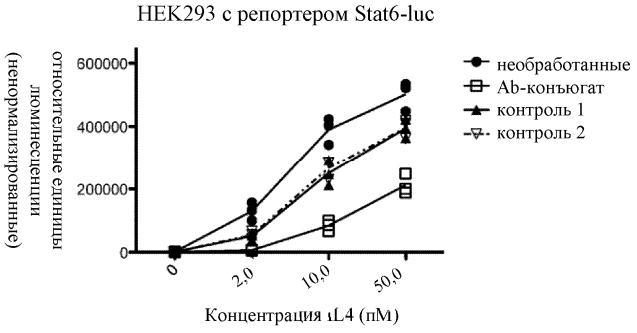
20. Способ по любому из пп.1-13 и 19, где биспецифическое антитело не изменяет уровни экспрессии или скорости поверхностного возобновления PRLR клеткой рака молочной железы.



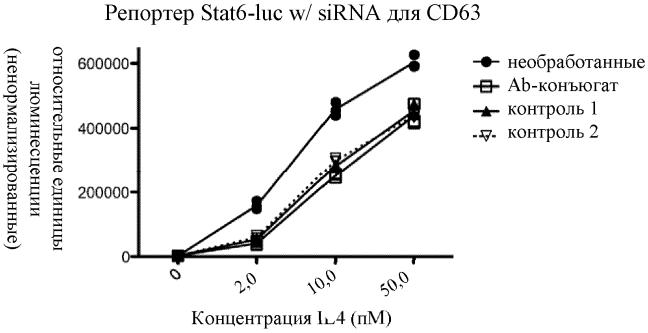
Фиг. 1



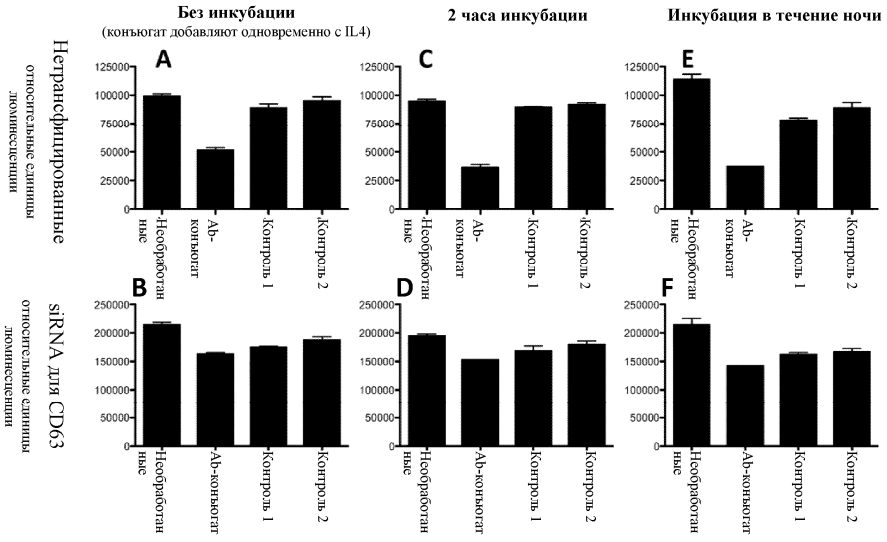
Фиг. 2



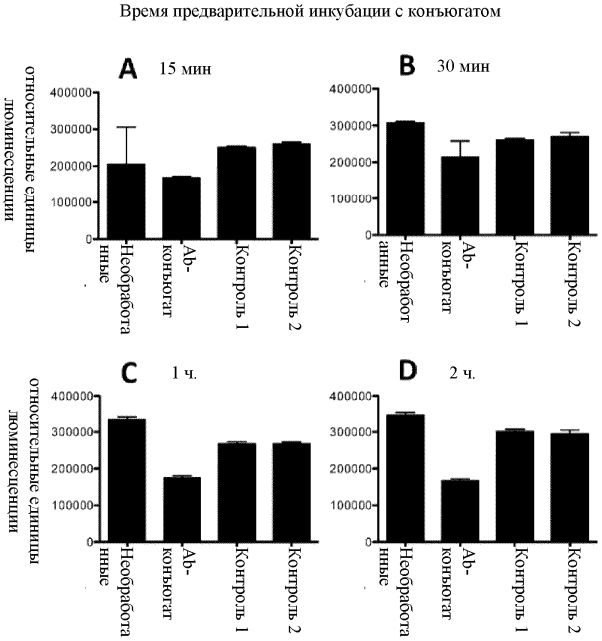
Фиг. 3



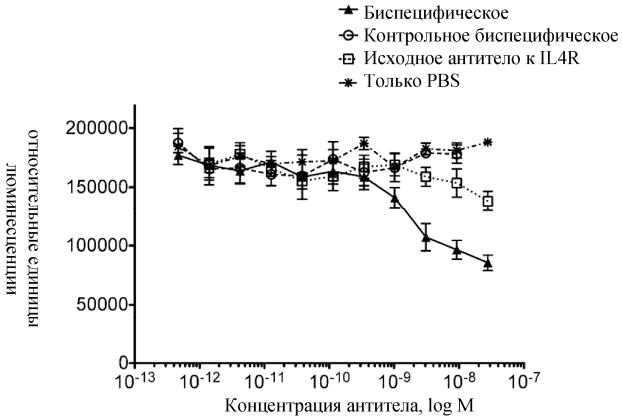
Фиг. 4



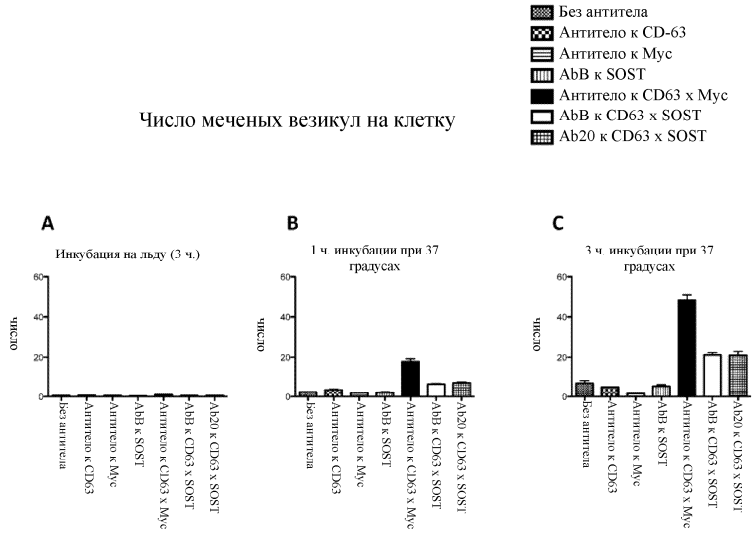
Фиг. 5



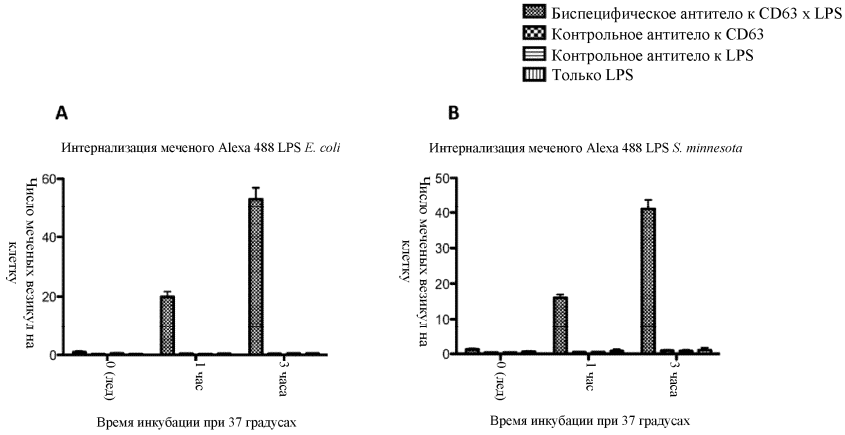
Фиг. 6



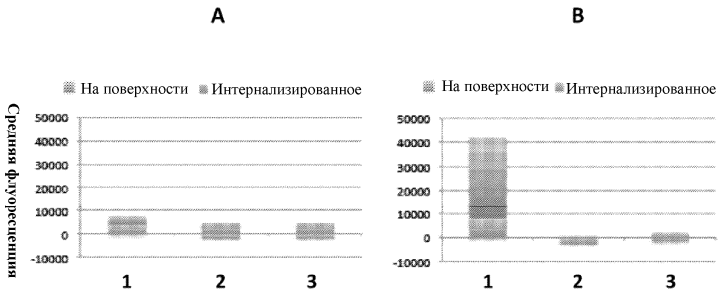
Фиг. 7



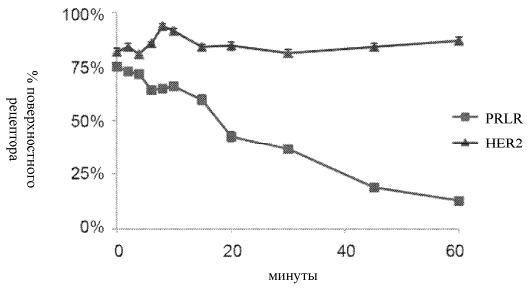
Фиг. 8



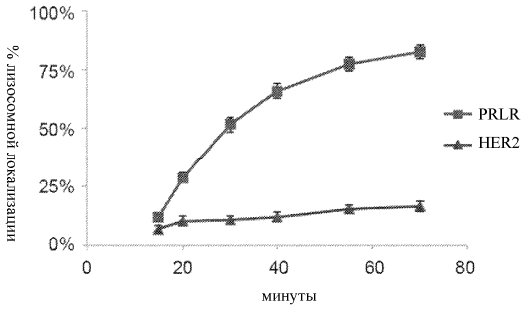
Фиг. 9



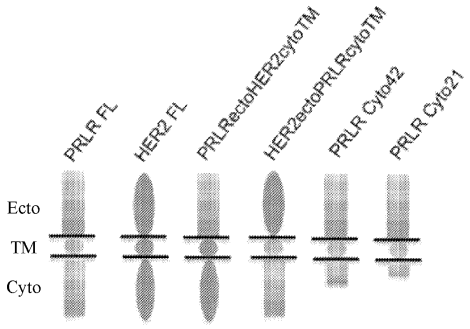
Фиг. 10



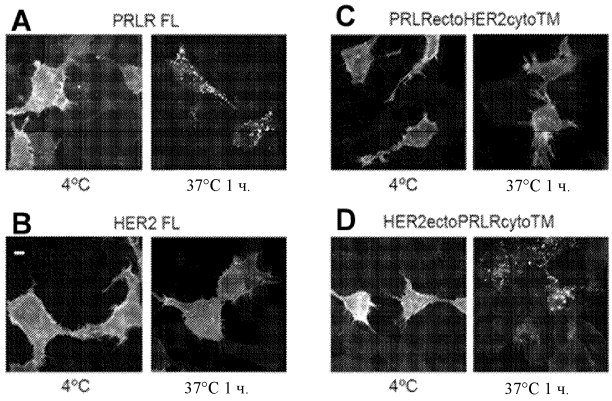
Фиг. 11



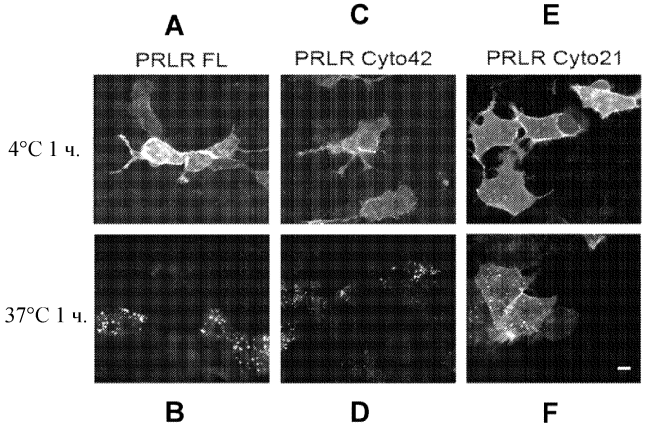
Фиг. 12



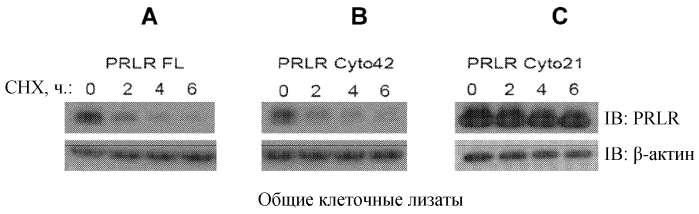
Фиг. 13



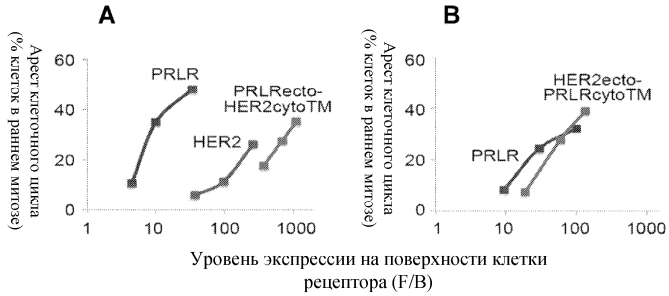
Фиг. 14



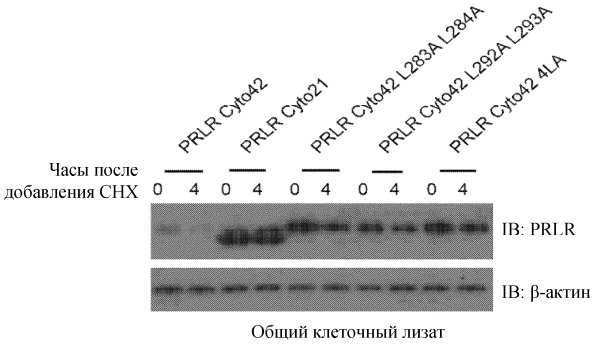
Фиг. 15



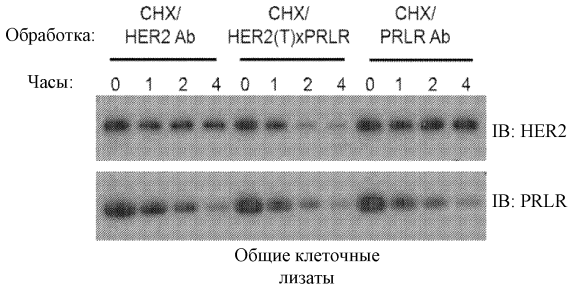
Фиг. 16



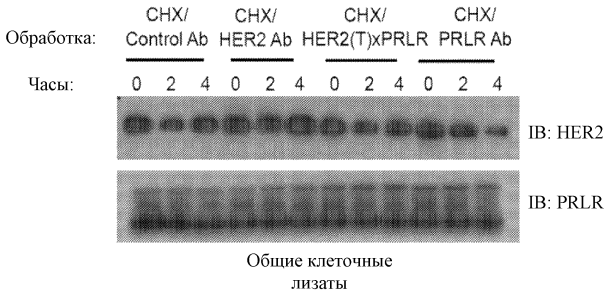
Фиг. 17



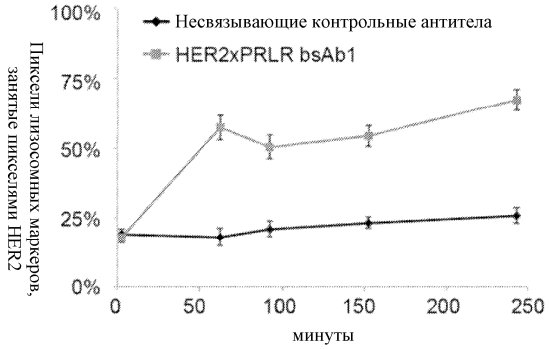
Фиг. 18



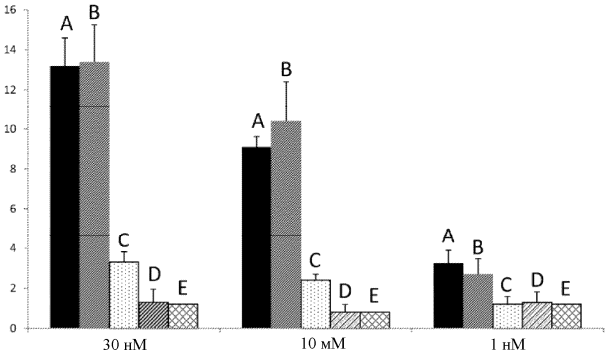
Фиг. 19



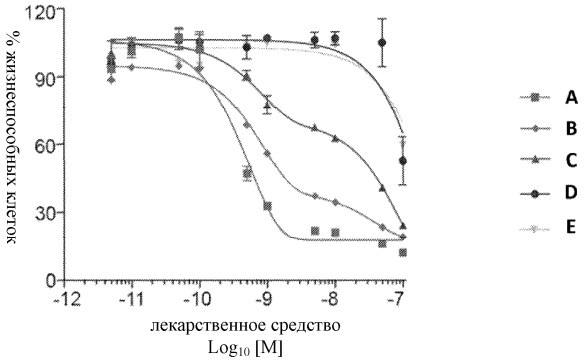
Фиг. 20



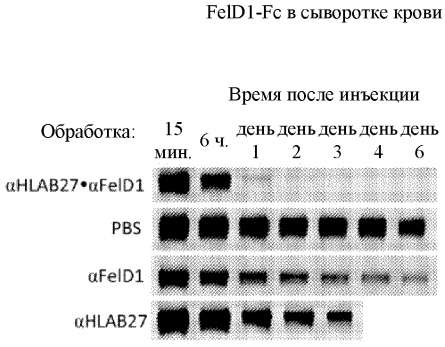
Фиг. 21



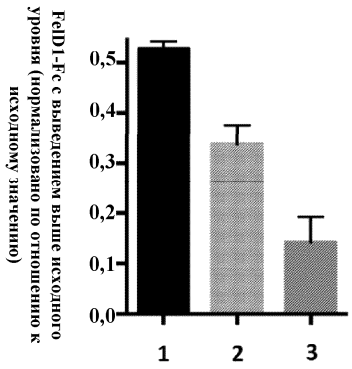
Фиг. 22



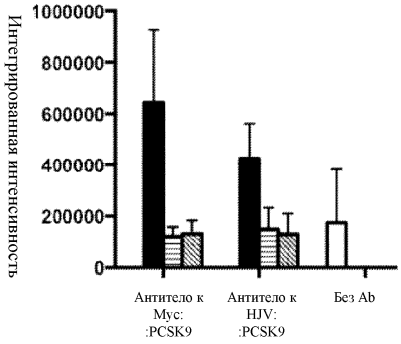
Фиг. 23



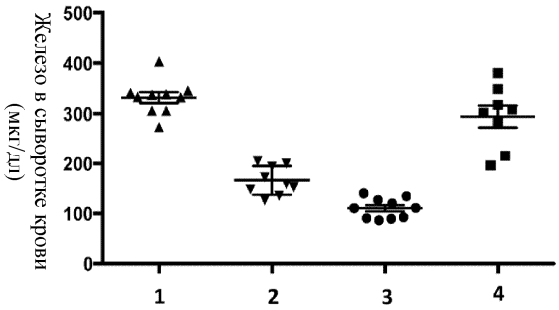
Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26



Фиг. 27