

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201891301** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.08.18

(22) Дата подачи заявки
2016.12.01

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ DR5 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) PA 2015 00771; PA 2015 00787; PA 2015
00788; PA 2016 00701; PA 2016 00702

(32) 2015.12.01; 2015.12.07; 2015.12.07;
2016.11.10; 2016.11.10

(33) DK

(86) PCT/EP2016/079518

(87) WO 2017/093448 2017.06.08

(71) Заявитель:
ГЕНМАБ Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Овердейк Марейе, Стрюмане
Кристин, Радемакер Рик, Брей Эстер,
Схююрман Янине, Паррен Пауль (NL)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение касается молекул моноспецифичных или биспецифических антител, специфически связывающих антиген DR5 человека. В частности, изобретение касается DR5-специфичных молекул антител изотипа IgG1, содержащих мутацию в Fc-области, которая усиливает кластеризацию молекул IgG после связывания с поверхностным антигеном, что ведет к запуску сигнализации DR5, апоптозу и клеточной смерти. Изобретение также касается комбинации молекул антител, связывающих различные эпитопы на DR5. Изобретение также касается фармацевтических композиций, содержащих такие молекулы, и лечения рака с помощью этих композиций.

A1

201891301

201891301

A1

АНТИТЕЛА ПРОТИВ DR5 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается молекул моноспецифичных или биспецифических антител, специфически связывающих антиген DR5 человека. В частности, изобретение касается DR5-специфичных молекул антител изотипа IgG1, содержащих мутацию в Fc-области, которая усиливает кластеризацию молекул IgG после связывания с поверхностным антигеном. Изобретение также касается комбинации молекул антител, связывающих различные эпитопы у DR5 человека. Изобретение также касается фармацевтических композиций, содержащих такие молекулы, и лечения рака и других заболеваний с помощью этих композиций.

Уровень техники

DR5, также известный как рецептор смерти 5, представитель 10B надсемейства рецепторов фактора некроза опухолей, TNFRSF10B, рецептор-2 родственного TNF индуцирующего апоптоз лиганда, рецептор-2 TRAIL, TRAIL-R2 и CD262, является рецептором клеточной поверхности из надсемейства рецепторов TNF, который связывает родственный фактору некроза опухолей индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL) и опосредует апоптоз. DR5 представляет собой однопролетный мембранный белок I типа с тремя внеклеточными доменами, богатыми цистеином (CRD), трансмембранным доменом (TM) и цитоплазматическим доменом, содержащим домен смерти (DD). В отсутствие лиганда DR5 существует в клеточной мембране либо в виде мономера, либо в виде комплекса из двух или трех рецепторов, собранных посредством взаимодействия первых богатых цистеином доменов, также известных как пред-лигандные домены сборки (PLAD) (Wassenaar et al., *Proteins* 2008 Feb 1, 70(2):333-43; Valley et al., *J Biol Chem.* 2012 Jun 15, 287(25): 21265-78; Sessler et al., *Pharmacol Ther.* 2013 Nov, 140(2):186-99). Кристаллическая структура TRAIL в комплексе с эктодоменом DR5 показала, что TRAIL связывается со внеклеточными доменами CRD2 и CRD3 DR5 в виде комплекса, содержащего тримерный рецептор и тримерный лиганд (Hymowitz et al., *Mol Cell.* 1999 Oct, 4(4):563-71). Тримеры DR5 также могут образовывать агрегаты рецепторов более высокого порядка в липидных макродоменах, так называемых липидных рафтах (Sessler et al., *Pharmacol Ther.* 2013 Nov, 140(2):186-99). В связанной с лигандом конформации с внутриклеточной поверхностью DD олигомеризованных молекул DR5 ассоциируется содержащий домен смерти цитоплазматический адапторный белок FADD, который сцепляется с инициаторными каспазами – каспазой-8 и каспазой-10 с образованием индуцирующего смерть сигнального комплекса (DISC).

Исходя из чувствительности раковых клеток к опосредованному TRAIL апоптозу, разрабатывались различные средства для активации этого пути с тем, чтобы избирательно индуцировать апоптоз в раковых клетках. Рекомбинантный TRAIL человека (hrTRAIL) разрабатывается как дуланермин, и были разработаны и испытаны в клинике целый ряд обычных (моноспецифичных, бивалентных) антител против DR5 (см. обзоры в Ashkenazi et al., *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Dec, 7(12):1001-12; Trivedi et al., *Front Oncol.* 2015 Apr 2, 5:69). Антитела против DR5 включают лексатумумаб (HGS-ETR2), HGS-TR2J, конатумумаб (AMG655), тигатузумаб (CS-1008), дрозитумаб (Aromab) и LBY-135. Клинические исследования с этими соединениями показали, что антитела против DR5 обычно хорошо переносятся, но не проявляют убедительного и значимого клинического действия. Усилия по повышению эффективности направленных на DR5 антител в основном сосредоточены на (i) повышении чувствительности раковых клеток к агонистам DR5 посредством комбинированной терапии, (ii) разработке биомаркеров для лучшей стратификации пациентов и (iii) разработке направленных на DR5 средств, более эффективно активирующих DR5-сигнализацию и индукцию апоптоза (см. обзоры в Lim et al., *Expert Opin Ther Targets* 2015 May, 25:1-15; Twomey et al., *Drug Resist Updat.* 2015 Mar, 19:13-21; Reddy et al., *PLoS One.* 2015 Sep 17, 10(9)). Были описаны различные терапевтические форматы для усиления активации DR5, которые включают олигомеризацию синтетических DR5-связывающих пептидов, линейные слияния DR5-специфичных каркасов, системы доставки rhTRAIL или конатумумаба на основе наночастиц и многовалентные форматы на основе антител к DR5 (см. обзор в Holland et al., *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014 Apr, 25(2):185-93). APG880 и производные существуют в виде двух одноцепочечных, связывающих рецепторы TRAIL (scTRAIL-RBD) молекул (TRAIL-миметиков), слитых с Fc-областью IgG человека. Каждый scTRAIL-RBD содержит три сайта связывания рецептора, что дает режим гексавалентного связывания у слитого белка (WO 2010/003766 A2). Показано, что прототипный scTRAIL-RBD (APG350) вызывает FcyR-независимый противоопухолевый эффект *in vivo* (Gieffers et al., *Mol Cancer Ther.* 2013, 12(12):2735-47). Было показано, что тетравалентная конструкция из фрагмента антител против DR5, собранная путем слияния scFv-фрагмента против DR5, остатков сывороточного альбумина человека и домена тетрамеризации p53 человека, индуцирует апоптоз сильнее, чем моновалентная конструкция (Liu et al., *Biomed Pharmacother.* 2015 Mar, 70:41-5). Молекулы нанотел – это однодоменные фрагменты антител (V_{HH}), происходящие из верблюжьих антител с одними лишь тяжелыми цепями, которые, подобно scFv, могут соединяться с образованием мультивалентных молекул. Доклинические исследования *in vitro* показали, что TAS266, тетравалентная молекула Nanobody[®] против DR5, оказалась более сильной, чем TRAIL или

считое антитело LBY-135 к DR5, что объяснялось более быстрой кинетикой активации каспазы (Huet et al., MAbs 2014, 6(6):1560-70). TAS266 также оказалось более сильным и *in vivo*, чем исходное мышинное mAb LBY-135. Молекулы мультител (MultiYbody™, технология MultiYmab) основаны на слиянии гомомультимеризующегося пептида с Fc одной тяжелой цепи в виде гетеродимера IgG (кнопка в отверстие), что делает молекулы мультител по своей природе мультивалентными в растворе. Было показано, что мультитело против DR5 вызывает сильную гибель *in vitro*. Молекулы DART (двойного сродства с повторным наведением) представляют собой ковалентно связанные диатела на основе Fv. Направленные на DR5 тетравалентные Fc-DARTs, проявляющие тетравалентность по одному (моноэпитопные DARTs) или по двум эпитопам DR5 (биэпитопные DARTs), оказались более эффективными, чем TRAIL и вариант конатумумаб, индуцируя цитотоксичность *in vitro* и *in vivo* (Li et al., AACR Annual Meeting Apr 20, 2015, Poster abstract #2464). С другой стороны, биспецифическое антитело DR5xFAP (RG7386) может вызывать FcγR-независимую, приводимую авидностью гиперкластеризацию DR5 посредством одновременного связывания с DR5 на раковой клетке и с активационным белком фибробластов (FAP), который экспрессируется на фибробластах в микроокружении опухолей (Friess et al., AACR Annual Meeting Apr 19, 2015, Presentation abstract #952; Wartha et al., Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2014, Apr 5-9, San Diego, CA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2014, 74(19 Suppl): Abstract no. 4573. doi:10.1158/1538-7445.AM2014-4573). Наконец, определенные комбинации двух антител против DR5, распознающих различные эпитопы, проявляют повышенное агонистическое действие *in vitro* и *in vivo* по сравнению с комбинациями из двух антител против DR5, распознающих перекрывающиеся или сходные эпитопы (WO 2014/009358).

Вышеописанные подходы проявляют повышенную эффективность в сравнении с традиционными антителами против DR5 в доклинических исследованиях, однако клинические данные свидетельствуют о том, что все еще существует потребность в улучшении агонистов DR5. Кроме того, желательно, чтобы форматы на основе антител сохраняли фармакокинетические (ПК), а также и другие опосредованные Fc эффекторные функции стандартных IgG, что обычно не свойственно конструкциям на основе фрагментов антител. Все еще существует потребность в получении других агонистов DR5 с улучшенными свойствами.

Следовательно, существует потребность в получении улучшенных антител против DR5 для лечения рака, инфекционных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, сердечно-сосудистых и других заболеваний.

Сущность изобретения

Вне ожидания, авторы настоящего изобретения обнаружили, что введение определенной точечной мутации в Fc-области антитела против DR5, которая способствует кластеризации антител, обусловленной связыванием антигена на клеточной поверхности, независимо от вторичной сшивки, приводит к активации DR5 и значительно повышает эффективность антитела в индуцировании апоптоза и гибели клеток.

Целью настоящего изобретения является получение улучшенных антител против DR5 для применения при лечении рака и других заболеваний. Такие улучшенные антитела содержат мутацию в Fc-области. Другая цель настоящего изобретения заключается в получении улучшенных композиций для лечения рака и других заболеваний, включающих одно или несколько антител против DR5 по изобретению, напр., при этом данные антитела связываются с разными эпитопами на DR5. Такая улучшенная композиция, как описано здесь, содержит по меньшей мере одно антитело против DR5 по изобретению, а более предпочтительно композиция содержит два антитела против DR5, связывающиеся с разными участками на DR5 типа различных неконкурентных эпитопов на DR5.

Настоящим изобретением предусмотрены антитела против DR5, содержащие Fc-область иммуноглобулина IgG человека и антигенсвязывающий участок, связывающийся с DR5, причем Fc-область содержит мутацию в положении аминокислоты, соответствующей положению E430, E345 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci USA 1969 May, 63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242).

Итак, авторы настоящего изобретения в первом аспекте изобретения обнаружили, что антитела против DR5 по изобретению, содержащие мутацию в Fc-области, усиливают апоптоз DR5-положительных клеток типа опухолевых клеток по сравнению с антителами против DR5 без мутации в положении аминокислоты, соответствующей положению E430, E345 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU. Поэтому антитела против DR5 по настоящему изобретению подходят для лечения DR5-положительных или DR5-экспрессирующих опухолей.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 содержит мутацию в положении аминокислоты, соответствующей E430 в IgG1 человека по нумерации EU, причем мутация выбрана из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F и E430T.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 содержит Fc-область иммуноглобулина IgG человека и антигенсвязывающий участок, связывающийся с DR5, причем Fc-область содержит мутацию E430G (глутаминовой кислоты в положении

430 на глицин) или E345K (глутаминовой кислоты в положении 345 на лизин) в IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 содержит Fc-область IgG1 человека и антигенсвязывающий участок, связывающийся с DR5, причем Fc-область содержит мутацию E430G.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 содержит мутацию в положении аминокислоты, соответствующей E345 в IgG1 человека по нумерации EU, причем мутация выбрана из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R и E345Y.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 содержит Fc-область IgG1 человека и антигенсвязывающий участок, связывающийся с DR5, причем Fc-область содержит мутацию E345K.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 содержит мутацию в положении аминокислоты, соответствующей S440 в IgG1 человека по нумерации EU, причем мутация выбрана из группы, состоящей из S440W и S440Y.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 содержит Fc-область IgG1 человека и антигенсвязывающий участок, связывающийся с DR5, причем Fc-область содержит мутацию S440Y.

В одном аспекте изобретения предусмотрены композиции, содержащие одно или несколько антител, связывающихся с DR5. В одном воплощении композиция содержит одно или несколько антител, связывающихся с различными эпитопами на DR5. При этом предусмотрены воплощения, где антитела связывают различные эпитопы или требуют разных аминокислот в последовательности DR5 (SEQ ID NO 46) для связывания с DR5. В одном воплощении композиция содержит антитела против DR5, которые не конкурируют за связывание с DR5, причем в одном воплощении антитела против DR5 связываются с неперекрывающимися эпитопами.

В другом аспекте изобретения предусмотрены биспецифические антитела, содержащие один или несколько антигенсвязывающих участков, связывающихся с DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения биспецифическое антитело содержит Fc-область, включающую первую и вторую тяжелую цепь, причем данные первая и вторая тяжелая цепь содержат мутацию в положении аминокислоты, соответствующей E430, E345 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении настоящего изобретения биспецифическое антитело содержит Fc-область, включающую первую и вторую тяжелую цепь, причем первая тяжелая цепь содержит мутации в положениях, соответствующих F405 и E430, а вторая

тяжелая цепь содержит мутации в положениях, соответствующих K409 и E430, при этом положения аминокислот соответствуют IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении настоящего изобретения биспецифическое антитело содержит Fc-область, включающую первую тяжелую цепь с мутацией F405L и вторую тяжелую цепь с мутацией K409R в IgG1 человека по нумерации EU. В другом воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит Fc-область, включающую первую тяжелую цепь с мутацией K409R и вторую тяжелую цепь с мутацией F405L в IgG1 человека по нумерации EU.

В следующем аспекте изобретения предусмотрен способ лечения заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом лицу эффективного количества антитела или композиции, как описано здесь. В одном воплощении изобретения заболеванием является рак.

В другом аспекте изобретения антитело против DR5, биспецифическое антитело или композиция по настоящему изобретению предназначается для применения в качестве лекарственного средства. В одном воплощении антитело против DR5, биспецифическое антитело или композиция предназначается для применения при лечении заболевания. В одном воплощении заболеванием является рак или опухоль.

В другом аспекте изобретения предусмотрен набор из частей, содержащий антитело или композицию по любому из предыдущих пунктов, причем данное антитело или композиция находится в одном или нескольких контейнерах типа флакона.

В другом аспекте изобретения предусмотрено применение антитела или композиции, как описано здесь, для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания. В одном воплощении изобретения предусмотрено применение антитела или композиции, как описано здесь, для изготовления лекарственного средства для лечения рака.

Антитела против DR5 и композиции, содержащие антитела против DR5, описанные здесь, направлены против или специфичны к DR5 человека. Антитела против DR5 и композиции, описанные здесь, перекрестно реагируют с DR5 макаки резус и макаки-крабеда. В частности, в одном воплощении изобретения антитела против DR5 и композиции специфически связываются с внеклеточным доменом DR5 человека. В одном конкретном воплощении изобретения антитела и композиции, содержащие антитела против DR5, связываются с DR5 человека на неперекрывающихся эпитопах. Так, в одном воплощении композиция содержит по меньшей мере одно антитело против DR5 по изобретению. В одном воплощении композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5 по изобретению, и первое антитело против DR5, описанное

здесь, не блокирует связывание второго антитела против DR5, описанного здесь. В одном конкретном воплощении композиция, описанная здесь, содержит первое и второе антитело против DR5, связывающиеся с DR5 человека, а первое антитело против DR5 не блокирует связывание второго антитела против DR5 с DR5 человека.

Антитела против DR5 и композиции, содержащие антитела против DR5 по настоящему изобретению, то есть антитела против DR5, содержащие мутации аминокислот в Fc-области, в общем можно использовать для модуляции активности DR5. В одном воплощении антитело против DR5 или композиция может запускать, активировать и/или повышать или усиливать сигнализацию, опосредованную DR5. То, что антитела против DR5, содержащие мутации аминокислот в Fc-области по изобретению, могут повышать или усиливать сигнализацию, опосредованную DR5, следует понимать так, что при этом сигнализация сравнивается с таким же антителом против DR5 без указанной мутации в Fc-области. В одном воплощении антитело против DR5 или композиция будет оказывать агонистическое действие на DR5, в частности, запускать или усиливать нисходящие эффекты DR5. То, что антитела против DR5, содержащие мутации аминокислот в Fc-области по изобретению, могут оказывать агонистическое действие на DR5, следует понимать так, что при этом агонистическое действие сравнивается с лигандом DR5 TRAIL или с таким же антителом против DR5, то есть имеющим одинаковые последовательности CDR, но без указанной мутации в Fc-области по изобретению. При этом антитела против DR5 или композиции по настоящему изобретению способны индуцировать апоптоз или клеточную смерть в клетках, опухолевых массах или тканях, экспрессирующих DR5, как-то в раковых клетках или опухолях.

В одном воплощении изобретения антитела против DR5 или композиции, описанные здесь, индуцируют, запускают, повышают или усиливают апоптоз, клеточную смерть или остановку роста в клетках или тканях, экспрессирующих DR5, как-то в раковых клетках, опухолевых клетках или опухолях, по сравнению с таким же антителом против DR5 или композицией без указанной мутации в Fc-области. В одном воплощении антитела против DR5 или композиции, описанные здесь, способны связываться с DR5 на поверхности клетки, в частности, связываться с DR5 таким образом, что индуцируется, запускается, повышается или усиливается сигнализация, опосредованная DR5, по сравнению с таким же антителом против DR5 или композицией без указанной мутации в Fc-области. В одном воплощении антитела или композиции, описанные здесь, могут быть такими, что они способны связываться с DR5 таким образом, что в раковых или опухолевых клетках, опухолях или тканях, экспрессирующих DR5, индуцируется апоптоз или клеточная смерть.

В одном воплощении антитела или композиции настоящего изобретения индуцируют, запускают, повышают или усиливают апоптоз или клеточную смерть у раковых клеток или раковых тканей, экспрессирующих DR5. Повышение или усиление апоптоза или клеточной смерти можно измерить по усилению или повышению уровня фосфатидилсерина в клетках, подвергнутых воздействию или обработанных одним или несколькими антителами против DR5 по изобретению. С другой стороны, повышение или усиление апоптоза или клеточной смерти можно измерить путем измерения активации каспазы-3 или каспазы-7 в клетках, подвергавшихся воздействию или обработанных одним или несколькими антителами против DR5 по изобретению. С другой стороны, повышение или усиление апоптоза или клеточной смерти можно измерить по потере жизнеспособности в культурах клеток, подвергнутых воздействию или обработанных одним или несколькими антителами против DR5 по изобретению по сравнению с необработанными культурами клеток. Индукцию опосредованного каспазой апоптоза можно оценить по торможению потери жизнеспособности после воздействия антител против DR5 ингибитором каспаз, к примеру, ZVAD.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлено совмещение аминокислот у четырех различных аллотипов Fc IgG1 человека. Последовательности Fc у IgG1m(f), IgG1m(z), IgG1m(a), IgG1m(x) приведены в SEQ ID: 29, 30, 31 и 32, соответственно.

На фиг. 2 представлено связывание гуманизованных (hDR5) и химерных (DR5) антител против DR5 с DR5-положительными раковыми клетками HCT 116 толстой кишки при измерении методом проточной цитометрии по FACS. В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG1-b12 против gp120. Связывание выражали в виде MFI (средняя интенсивность флуоресценции). Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

На фиг. 3 представлено связывание антител против DR5 с усиливающими гексамеризацию мутациями E430G или E345K или без них с DR5-положительными клетками COLO 205. Тестировали варианты химерных антител человека-мыши IgG1-DR5-01-K409R (A), IgG1-DR5-05-F405L (B) и биспецифическое антитело IgG1-DR5-01-K409R×IgG1-DR5-05-F405L (BsAb IgG1-DR5-01-K409R×DR5-05-F405L) (C) методом проточной цитометрии по FACS на связывание с клетками COLO 205. Связывание выражали в виде среднего геометрического интенсивности флуоресценции. В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG1-b12 против gp120. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

На фиг. 4 представлено связывание антител против DR5 с DR5 человека и макаки

резус. Тестировали химерные антитела человека-мыши IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G методом проточной цитометрии по FACS на связывание с (А) ложно-трансфицированными клетками CHO, (В) трансфицированными DR5 человека клетками CHO и (С) трансфицированными DR5 макаки резус клетками CHO. Связывание выражали в виде среднего геометрического интенсивности флуоресценции. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

На фиг. 5 представлено (А) совмещение последовательностей части внеклеточных доменов DR5 мыши и DR5 человека с помощью EMBOSS Matcher (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/): (.) подобная аминокислота; (:) идентичная аминокислота. (В) Графическое представление внеклеточного домена DR5 с заменой домена (белые: последовательности DR5 человека, черные: последовательности DR5 мыши). Номера аминокислот относятся к последовательности человека, а замены домена проводили на основе совмещения, представленного на панели А. (С) Связывание IgG1-hDR5-01-F405L и изотипного контрольного антитела IgG1-b12 с комплектом химерных молекул DR5 человека-мыши при оценке методом проточной цитометрии. В каждой молекуле DR5 с заменой домена определенные аминокислоты человека были заменены на последовательности мыши, как указано на оси x. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение у двойных образцов. (D) Связывание IgG1-hDR5-05-F405L с комплектом химерных молекул DR5 человека-мыши при оценке методом проточной цитометрии. В каждой молекуле DR5 с заменой домена определенные аминокислоты человека были заменены на последовательности мыши, как указано на оси x. В качестве изотипного контрольного антитела включали IgG1-b12. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение у двойных образцов.

На фиг. 6 представлено перекрестное блокирование по ELISA с антителами DR5-01 и DR5-05. На графиках представлено ингибирование связывания фиксированного IgG1-hDR5-01-E430G (А) или IgG1-hDR5-05-E430G (В) с растворимым DR5ECD-FcHisCtag в присутствии конкурирующего антитела IgG1-hDR5-01-E430G или IgG1-hDR5-05-E430G при измерении методом ELISA. В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG1-b12 (b12) против gp120. DR5-01 означает IgG1-hDR5-01-E430G; DR5-05 – IgG1-hDR5-05-E430G.

На фиг. 7 представлен анализ жизнеспособности с вариантами антител DR5-01 и DR5-05. Введение усиливающей гексамеризацию мутации E430G приводит к усилению индуцирования гибели DR5-положительных раковых клеток COLO 205 (А) и HCT 116 (В) толстой кишки отдельными химерными антителами человек-мышь IgG1-DR5-01-K409R и IgG1-DR5-05-F405L по отдельности и в комбинации. Планки погрешностей представляют

стандартное отклонение.

На фиг. 8 представлено (А) перекрестное блокирование по ELISA между IgG1-chTRA8-F405L и IgG1-DR5-01-K409R или IgG1-DR5-05-F405L, соответственно. Комбинирование двух неперекрестных антител против DR5 IgG1-chTRA8-F405L-E430G и IgG1-DR5-01-K409R-E430G (В) приводит к усилению гибели раковых клеток НСТ 116 толстой кишки (снижение EC_{50}), тогда как комбинирование двух перекрестных антител IgG1-chTRA8-F405L-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G (С) не приводит, как установлено при 3-дневном анализе жизнеспособности. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

На фиг. 9 показано, что введение усиливающей гексамеризацию мутации приводит к усилению индукции гибели раковых клеток НСТ 116 толстой кишки при сочетании неперекрестных антител IgG1-DR5-05-F405L-E345K + IgG1-CONA-K409R-E430G и BsAb IgG1-DR5-05-F405L-E345K×CONA-K409R-E430G. (А) перекрестное блокирование IgG1-CONA-K409R и IgG1-DR5-05-F405L по ELISA. (В) 3-дневный анализ жизнеспособности. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение. RLU: относительные единицы люминесценции.

На фиг. 10 показано, что комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G снижает жизнеспособность большого числа различных линий раковых клеток человека, как установлено при 3-дневном анализе жизнеспособности. На графиках представлены средние значения ± стандартное отклонение от двойных образцов. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (односторонний метод ANOVA с критерием множественных сравнений Tukey).

На фиг. 11 представлена эффективность комбинации гуманизованных антител IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G и комбинации химерных антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G при измерении методом жизнеспособности на линиях раковых клеток ВхРС-3 и PANC-1 поджелудочной железы. На графиках представлены средние значения от двойных (ВхРС-3) или тройных (PANC-1) образцов ± стандартное отклонение.

На фиг. 12 представлен (А) анализ методом проточной цитометрии по FACS для изучения влияния имитации дезамидирования у гуманизованных антител IgG1-hDR5-01-K409R и IgG1-hDR5-05-F405L на связывание с раковыми клетками толстой кишки НСТ 116. Введение имитирующей дезамидирование Asp мутации N55D привело к уменьшению связывания IgG1-hDR5-01-K409R, но оказало минимальное влияние на связывание IgG1-hDR5-05-F405L. (В) Анализ методом проточной цитометрии для изучения влияния предотвращения дезамидирования у гуманизованного антитела DR5-01 на связывание с рако-

выми клетками толстой кишки НСТ 116. Введение аминокислотной замены G56T в IgG1-hDR5-01-E430G не влияло на связывание антитела с клетками НСТ 116. Связывание выражали в виде среднего геометрического интенсивности флуоресценции. (С) Эффективность комбинации гуманизованных антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G при измерении методом жизнеспособности на раковых клетках ВхРС-3 поджелудочной железы. На графиках представлены средние значения от двойных образцов \pm стандартное отклонение.

На фиг. 13 представлен анализ жизнеспособности с репульсионными (вызывающими отталкивание) и комплементирующими (восполняющими) вариантами IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G. Введение одной и той же репульсионной мутации (K439E или S440K) в оба антитела приводит к уменьшению индукции гибели раковых клеток ВхРС-3 поджелудочной железы (А) и НСТ-15 толстой кишки (В). При сочетании этих двух мутаций (K439E и S440K) в обоих антителах отталкивание нейтрализуется и восстанавливается уничтожение клеток. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

Фиг. 14. Участие Fc-взаимодействий в способности комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G с усиливающей гексамеризацию мутацией индуцировать кластеризацию рецепторов на клеточной поверхности и вызывать апоптоз. Индуцирование апоптоза ингибируется Fc-связывающим пептидом DCAWHLGELVWCT, как это видно при 3-дневном анализе жизнеспособности на раковых клетках ВхРС-3 человека.

На фиг. 15 представлена эффективность при различных соотношениях комбинации IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G (DR5-01:DR5-05) на адгезированных раковых клетках ВхРС-3 человека при определении по 3-дневной жизнеспособности.

На фиг. 16 представлена эффективность различных соотношений IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G (DR5-01:DR5-05) на адгезированных раковых клетках человека ВхРС-3 (А) и НСТ-15 (В) при определении по 3-дневной жизнеспособности.

На фиг. 17 представлена зависимость от каспаз запрограммированная гибель клеток под действием комбинации гуманизованных антител IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G при измерении по жизнеспособности на раковых клетках PANC-1 (А и В) и ВхРС-3 (С) поджелудочной железы. 01-E430G означает IgG1-hDR5-01-E430G; 05-E430G – IgG1-hDR5-05-E430G; ZVAD – пан-каспазный ингибитор Z-Val-Ala-DL-Asp-фторметилкетон (Z-VAD-FMK).

На фиг. 18 представлено индуцирование клеточной смерти при связывании ан-

титела против DR5 или комбинации антител против DR5 на раковых клетках COLO 205 толстой кишки. Клетки COLO 205 инкубировали с образцами антител в течение 5 ч (А-С) и 24 ч (D-E). Различные стадии индуцирования клеточной смерти анализировали по двойному окрашиванию на аннексин V/PI и по окрашиванию на активную каспазу-3. На панелях С и D представлено двойное окрашивание на аннексин V/PI через 5 и 24 ч, соответственно. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение у 2 повторяющихся образцов. 01 означает IgG1-DR5-01-K409R, 05 – IgG1-DR5-05-F405L, 01-E430G – IgG1-DR5-01-K409R-E430G, 05-E430G – IgG1-DR5-05-F405L-E430G.

На фиг. 19 представлена кинетика активации каспазы-3/7 при связывании антител к DR5 с раковыми клетками COLO 205 толстой кишки. Клетки COLO 205 инкубировали с антителами в течение 1, 2, 5 и 24 часов. Активацию каспазы-3/7 анализировали методом гомогенного анализа люминесценции. AU, произвольные единицы. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение у двойных образцов.

На фиг. 20 представлена эффективность комбинации IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G в присутствии или в отсутствие перекрестной сшивки Fc под действием F(ab')₂-фрагментов антитела против IgG человека и сравнение с антителами против DR5 IgG1-DR5-CONA и IgG1-DR5-chTRA8-F405L при 3-дневном анализе жизнеспособности на адгезированных раковых клетках COLO 205 толстой кишки и раковых клетках VxPC-3 и PANC-1 поджелудочной железы. В качестве отрицательного контроля включали не связывающееся с мишенью антитело IgG1-b12. На графиках представлены средние значения ± стандартное отклонение от двойных образцов. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 (односторонний метод ANOVA с пост-критерием Bonferroni для множественных сравнений).

На фиг. 21 представлена действенность комбинации гуманизованных антител IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G и комбинации гуманизованных антител IgG1-DR5-01-E430G + IgG1-DR5-05-E430G при измерении по жизнеспособности на раковых клетках VxPC-3 поджелудочной железы. На графиках представлены средние значения от двойных образцов ± стандартное отклонение.

На фиг. 22 представлена действенность химерного антитела BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G на различных линиях раковых клеток человека при определении по 3-дневной жизнеспособности на адгезированных клетках линии раковых клеток COLO 205 толстой кишки, VxPC-3 поджелудочной железы, SNU-5 желудка, SK-MES-1 легких и A375 кожи. На графиках представлены средние значения ± стандартное отклонение от двойных образцов. * p < 0,05, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 (односторонний метод ANOVA с пост-критерием Bonferroni для множественных сравнений). (01x05)-

E430G означает BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G.

На фиг. 23 представлена эффективность химерного BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G в присутствии или в отсутствие перекрестной сшивки Fc под действием F(ab')₂-фрагментов антитела против IgG человека в сравнении с антителами против DR5 IgG1-DR5-CONA и IgG1-DR5-chTRA8-F405L при 3-дневном анализе жизнеспособности на адгезированных раковых клетках ВхРС-3 поджелудочной железы и COLO 205 толстой кишки. В качестве отрицательного контроля включали не связывающееся с мишенью антитело IgG1-b12. На графиках представлены средние значения ± стандартное отклонение от двойных образцов. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 (односторонний метод ANOVA с пост-критерием Bonferroni для множественных сравнений). (01x05)-E430G означает BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × IgG1-DR5-05-F405L-E430G.

На фиг. 24 представлена индукция клеточной смерти при связывании биспецифических антител к DR5 на раковых клетках COLO 205 толстой кишки. Клетки COLO 205 инкубировали с 1 мкг/мл антитела в течение 5 ч (A-C) и 24 ч (D-E). Различные стадии индуцирования клеточной смерти анализировали по двойному окрашиванию на аннексин V/PI и по окрашиванию на активную каспазу-3. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение у 2 повторяющихся образцов. 01 означает IgG1-DR5-01-K409R, 05 – IgG1-DR5-05-F405L, 01-E430G – IgG1-DR5-01-K409R-E430G, 05-E430G – IgG1-DR5-05-F405L-E430G, 01x05 – BsAb IgG1-DR5-01-K409R × DR5-05-F405L, 01-E430G x 05-E430G – BsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G.

На фиг. 25 представлена оценка эффективности *in vivo* комбинации химерных антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G на модели подкожных ксенотрансплантатов с раковыми клетками COLO 205 толстой кишки. Представлены размеры опухолей (среднее и SEM) у мышей, обработанных указанными антителами (5 мг/кг), по времени (A) и через 23 дня (B). На (C) представлен процент мышей с размерами опухолей менее 750 мм³ в виде графика Каплана-Мейера.

На фиг. 26 представлена оценка эффективности *in vivo* различных доз комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и сравнение с IgG1-CONA на подкожных ксенотрансплантатах раковых клеток COLO 205 толстой кишки. Представлены размеры опухолей (среднее и SEM) у мышей, получавших указанную дозу антител, по времени (A) и через 16 дней (B). На (C) представлен процент мышей с размерами опухолей менее 500 мм³ в виде графика Каплана-Мейера. * p < 0,05, *** p < 0,001.

На фиг. 27 представлена оценка эффективности *in vivo* различных доз комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и сравнение с IgG1-CONA-F405L на модели подкожных ксенотрансплантатов с раковыми клетками ВхРС-3

поджелудочной железы человека. Представлены размеры опухолей у мышей, обработанных указанными антителами, по времени (А, средний размер опухолей) и через 48 дней после инокуляции опухоли (В, средний размер опухолей и SEM). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (непарный t-критерий). На (С) представлен процент мышей с размерами опухолей менее 500 мм^3 в виде графика Каплана-Мейера.

На фиг. 28 представлена оценка эффективности *in vivo* различных доз комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и сравнение с IgG1-CONA-F405L на модели подкожных ксенотрансплантатов с раковыми клетками A375 кожи человека. Представлены размеры опухолей у мышей, обработанных указанными антителами, по времени (А, средний размер опухолей) и через 29 дней после инокуляции опухоли (В, средний размер опухолей и SEM). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (тест Манна-Уитни).

На фиг. 29 представлена оценка эффективности *in vivo* различных доз комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и сравнение с IgG1-CONA на модели подкожных ксенотрансплантатов с раковыми клетками HCT-15 толстой кишки человека. Представлены размеры опухолей (среднее и SEM) у мышей, обработанных указанными антителами, по времени (А) и через 17 дней после начала обработки (В). **** $p < 0,001$ (непарный t-критерий). На (С) представлен процент мышей с размерами опухолей менее 500 мм^3 в виде графика Каплана-Мейера.

На фиг. 30 представлена оценка эффективности *in vivo* различных доз комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и сравнение с IgG1-CONA на модели подкожных ксенотрансплантатов с раковыми клетками SW480 толстой кишки человека. Представлены размеры опухолей (среднее и SEM) у мышей, обработанных указанными антителами, по времени (А) и через 28 дней после начала обработки (В). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (непарный t-критерий). На (С) представлен процент мышей с размерами опухолей менее 500 мм^3 в виде графика Каплана-Мейера.

На фиг. 31 представлена оценка эффективности *in vivo* различных доз комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и сравнение с IgG1-CONA на модели подкожных ксенотрансплантатов с раковыми клетками SNU-5 желудка человека. Представлены размеры опухолей (среднее и SEM) у мышей, обработанных указанными антителами, по времени (А) и через 23 дня после начала обработки (В). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (тест Манна-Уитни). На (С) представлен процент мышей с размерами опухолей менее 500 мм^3 в виде графика Каплана-Мейера.

На фиг. 32 представлена оценка эффективности *in vivo* различных доз комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и сравнение с IgG1-

CONA на модели подкожных ксенотрансплантатов с раковыми клетками SK-MES-1 легкого человека. Представлены размеры опухолей (среднее и SEM) у мышей, обработанных указанными антителами, по времени (А) и через 14 дней после начала обработки (В). На (С) представлен процент мышей с размерами опухолей менее 1000 мм³ в виде графика Каплана-Мейера.

На фиг. 33 представлено связывание антител против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-05 с мутацией E430G и без нее с DR5-положительными раковыми клетками НСТ 116 толстой кишки человека при измерении методом проточной цитометрии. В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG1-b12 против gp120. Связывание выражали в виде среднего геометрического интенсивности флуоресценции (FI). Планки погрешностей представляют стандартное отклонение. Приведен репрезентативный пример из 7 экспериментов.

На фиг. 34 представлено связывание антител против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G с DR5-положительными раковыми клетками НСТ 116 толстой кишки человека при измерении методом проточной цитометрии с непосредственно мечеными антителами. Связывание выражали в виде среднего геометрического интенсивности флуоресценции Alexa 647 (FI). Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

На фиг. 35 представлено связывание антител против DR5 с DR5 человека и макаки-крабоведа. Тестировали антитела IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G методом проточной цитометрии на связывание с (А) трансфецированными DR5 человека клетками СНО и (В) трансфецированными DR5 макаки-крабоведа клетками СНО. Связывание выражали в виде среднего геометрического интенсивности флуоресценции (FI). Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

На фиг. 36 представлен 3-дневный анализ жизнеспособности, показывающий эффект введения мутации E430G в неперекрестные антитела IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-05 на раковых клетках COLO 205 толстой кишки. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение. Приведен репрезентативный пример из 4 экспериментов.

На фиг. 37 представлен анализ жизнеспособности с антителами к DR5 на раковых клетках COLO 205 толстой кишки человека. Введение усиливающей гексамеризацию мутации S440Y приводит к индукции гибели клеток под действием отдельных антител IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-05 (А) и к повышению эффективности комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 (В). Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

На фиг. 38 представлена эффективность неперекрестных антител IgG1-DR5-CONA-

E430G + IgG1-DR5-chTRA8-E430G в индуцировании гибели раковых клеток ВхРС-3 поджелудочной железы человека. (А) перекрестное блокирование по ELISA между IgG1-DR5-CONA-K409R (CONA) и IgG1-DR5-chTRA8-F405L (chTRA8). (В) Введение усиливающей гексамеризацию мутации E430G приводит к усиленной индукции гибели клеток ВхРС-3 комбинацией IgG1-DR5-CONA-C49W-E430G+IgG1-DR5-chTRA8-E430G при определении по 3-дневной жизнеспособности. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

На фиг. 39 представлен 3-дневный анализ жизнеспособности при 133 нМ рекомбинантного TRAIL человека или 133 нМ комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G (E430G) и IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 (WT) на различных линиях раковых клеток человека. На графиках представлено среднее \pm стандартное отклонение от двойных образцов. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (односторонний метод ANOVA с критерием множественных сравнений Tukey).

На фиг. 40 представлена степень ингибирования (А) антителом (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и (В) обработкой TRAIL при определении методом 3-дневной жизнеспособности при скрининге комплекта клеточных линий на фирме Horizon, UK. Каждая точка данных представляет отдельную линию клеток указанного ракового заболевания человека. Пунктиром обозначено пороговое значение максимального ответа в 70%, по которому клеточные линии подразделялись на восприимчивые (ингибирование $\geq 70\%$) и невосприимчивые (ингибирование $< 70\%$).

На фиг. 41 представлена эффективность различных соотношений антител в комбинации IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G (обозначена как 01-E430G:05-E430G) на адгезированных раковых клетках ВхРС-3 поджелудочной железы (А) и (В) НСТ-15 толстой кишки человека при определении по 3-дневной жизнеспособности. Для НСТ-15 и ВхРС-3 приведены репрезентативные примеры из двух и трех экспериментов, соответственно.

На фиг. 42 представлена зависимость от каспаз запрограммированная гибель клеток под действием комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G, исходной комбинации WT без мутации E430G и TRAIL при измерении по жизнеспособности на раковых клетках ВхРС-3 поджелудочной железы. ZVAD – пан-каспазный ингибитор Z-Val-Ala-DL-Asp-фторметилкетон (Z-VAD-FMK).

На фиг. 43 представлена кинетика активации каспазы-3/7 при связывании комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G с раковыми клетками ВхРС-3 поджелудочной железы в сравнении с исходной комбинацией WT без мутации E430G и TRAIL. Клетки ВхРС-3 инкубировали с антителами в течение 1, 2, 4 и 6 часов.

Активацию каспазы-3/7 анализировали методом гомогенного анализа люминесценции. RLU, относительные единицы люминесценции. Приведен репрезентативный пример из четырех экспериментов.

На фиг. 44 представлена эффективность комбинации IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G в присутствии или в отсутствие перекрестной сшивки Fc под действием F(ab')₂-фрагментов антитела против IgG человека и сравнение с антителом против DR5 IgG1-DR5-CONA и комбинацией антител WT IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 при 3-дневном анализе жизнеспособности на адгезированных раковых клетках HCT-15 толстой кишки и ВхРС-3 поджелудочной железы человека. В качестве отрицательного контроля включали не связывающееся с мишенью антитело IgG1-b12. На графиках представлены средние значения ± стандартное отклонение от двойных образцов. Для обеих клеточных линий приведен репрезентативный пример из двух экспериментов.

На фиг. 45 представлен анализ IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G, индуцирующих активацию комплемента при связывании с клетками мишени на клетках СНО, трансфицированных DR5 человека (A, C) или макаки-крабоеда (B, D). (A-B) Анализ CDC *in vitro* при целом ряде концентраций антител в присутствии 20% сыворотки нормальной сыворотки человека. Эффективность CDC представлена в виде степени лизиса, определяемой по содержанию положительных на иодид пропидия (PI) клеток в процентах. (C-D) Отложение продуктов активации комплемента при связывании антител в присутствии обедненной C5 сыворотки выражали в виде среднего геометрического интенсивности флуоресценции. В качестве несвязывающегося изотипного контрольного антитела использовали mAb IgG1-b12 против gp120 HIV.

На фиг. 46 представлен эффект сочетания комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G с различными терапевтическими средствами при определении по жизнеспособности на пяти различных линиях раковых клеток толстой кишки. Представлено пять примеров из скрининга на синергичность 100 соединений из разных терапевтических классов.

На фиг. 47 представлена оценка эффективности *in vivo* антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G по отдельности либо в виде комбинации в сравнении с исходными антителами без мутации E430G на модели подкожных ксенотрансплантатов с раковыми клетками COLO 205 толстой кишки человека. (A) Представлен размер опухолей (среднее и SEM) у мышей, обработанных указанными антителами (0,5 мг/кг), по времени. (B) Развитие опухолей на графике Каплана-Майера с порогом отсека при объеме опухоли > 500 мм³.

На фиг. 48 представлена оценка эффективности *in vivo* комбинации антител против

DR5 IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 с усиливающей гексамеризацию мутацией E430G и без нее на модели подкожных ксенотрансплантатов с раковыми клетками HCT15 толстой кишки человека. Представлен размер опухолей (среднее и SEM) у мышей, обработанных антителами при 0,5 мг/кг, по времени (А) и через 21 день после начала обработки (В). ** $p < 0,0011$ (тест Манна-Уитни). На (С) представлен процент мышей с размерами опухолей менее 750 мм^3 в виде графика Каплана-Мейера.

На фиг. 49 представлена оценка эффективности *in vivo* комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-430G в сочетании с 15 мг/кг паклитакселя на модели подкожных ксенотрансплантатов с раковыми клетками SK-MES-1 легких человека. (А) Представлен размер опухолей (среднее и SEM) у мышей, обработанных указанными соединениями, по времени. (В) Объем опухолей по опытным группам через 16 дней. (С) Представлен процент мышей с размерами опухолей менее 500 мм^3 на графике Каплана-Мейера.

На фиг. 50 представлена скорость клиренса у мышей SCID при введении 1 мг/кг *i.v.* IgG1-hDR5-01-G56T-E430G, IgG1-hDR5-05-E430G или комбинации двух антител в сравнении с исходными антителами WT без мутации E430G. (А) Определяли общий IgG человека в образцах сыворотки методом ELISA и наносили на график зависимости концентрации от времени. Каждая точка данных представляет среднее \pm стандартное отклонение от серийных разведений четырех образцов. (В) Определяли клиренс до 21-го дня после введения антител по формуле $D \times 1000 / \text{AUC}$, где D – вводимая доза, а AUC – площадь под кривой концентрации от времени.

На фиг. 51 представлен анализ жизнеспособности с антителами против DR5 IgG1-DR5-CONA и IgG1-DR5-CONA-E430G на прикрепленных раковых клетках COLO 205 толстой кишки. Введение усиливающей гексамеризацию мутации E430G приводило к индукции гибели клеток. Данные представлены в виде % жизнеспособных клеток, рассчитанного по люминесценции относительно образцов, инкубированных без антител (без гибели клеток), и образцов, инкубированных со стауроспорином (максимальная гибель клеток). Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

Раскрытие сущности изобретения

При описании воплощений изобретения для ясности будет применяться определенная терминология. Однако изобретение не должно ограничиваться конкретными терминами, выбранными при этом, поэтому предусматривается, что каждый конкретный термин включает все технические эквиваленты, которые действуют аналогичным образом для выполнения аналогичной задачи.

Как описано здесь, неожиданно оказалось, что антитела, связывающиеся с DR5 и

содержащие усиливающую гексамеризацию мутацию в Fc-области, соответствующую положению E430 или E345 IgG1 человека по нумерации EU, лучше индуцируют апоптоз в опухолевых клетках, экспрессирующих DR5, по сравнению с антителами, связывающими DR5, но без мутации в одном из вышеуказанных положений. Кроме того, композиции, содержащие два антитела против DR5 по изобретению, которые связывают разные эпитопы на DR5, в исследованиях *in vitro* и *in vivo* превосходили композиции, содержащие такие же антитела против DR5 без мутаций. Так, композиции с двумя антителами по настоящему изобретению лучше индуцируют апоптоз и/или ингибируют рост опухолевых клеток, экспрессирующих DR5, чем композиции, содержащие два антитела к DR5 без мутации в Fc-области. При введении определенных мутаций в Fc-область может усиливаться гексамеризация при связывании с мишенью на поверхности клетки, тогда как молекулы антител останутся мономерными в растворе, см. WO 0201/004842, WO 2014/108198.

Определения

Термин “иммуноглобулин” в настоящем изобретении относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей: одной пары низкомолекулярных легких (L) цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, причем все четыре потенциально соединяются между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо изучена. К примеру, см. *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи антител IgG обычно состоит из трех доменов: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Тяжелые цепи соединяются между собой дисульфидными связями в так называемой “шарнирной области”. Каждая легкая цепь обычно состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена C_L . Области V_H и V_L можно еще подразделить на участки гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или образовывать структурно определенные петли), которые также называют определяющими комплементарность участками (CDR), чередующиеся с более консервативными участками, которые называют каркасными участками (FR). Каждый V_H и V_L обычно состоит из трех CDR и четырех FR, располагающихся от N-конца до C-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (также см. Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987)). Если не указано иначе или не противоречит контексту, положения аминокислот в настоящем изобретении приводятся согласно нумерации EU (Edelman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, 1969 May, 63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242).

Термин “шарнирная область” в настоящем изобретении служит для обозначения шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, шарнирная область антител типа IgG1 человека соответствует аминокислотам 216-230 по нумерации EU.

Термин “область C_{H2}” или “домен C_{H2}” в настоящем изобретении служит для обозначения области C_{H2} тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область C_{H2} антител типа IgG1 человека соответствует аминокислотам 231-340 по нумерации EU. Однако область C_{H2} также может относиться к любому из других изоформ или аллоформов, как описано здесь.

Термин “область C_{H3}” или “домен C_{H3}” в настоящем изобретении служит для обозначения области C_{H3} тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область C_{H3} антител типа IgG1 человека соответствует аминокислотам 341-447 по нумерации EU. Однако область C_{H3} также может относиться к любому из других изоформ или аллоформов, как описано здесь.

Термин “область кристаллизуемого фрагмента”, “Fc-область”, “Fc-фрагмент” или “Fc-домен”, который может применяться здесь взаимозаменяемо, относится к области антитела, содержащей в порядке от N-конца до C-конца по меньшей мере шарнирный участок, домен C_{H2} и домен C_{H3}. Например, Fc-область антител типа IgG1 может образоваться при расщеплении антител типа IgG1 папаином. Fc-область антител может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (как-то эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента типа C1q, первого компонента в классическом пути активации комплемента.

Термин “Fab-фрагмент” в контексте настоящего изобретения относится к такому фрагменту молекулы иммуноглобулина, который содержит переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, а также константную область легкой цепи и область C_{H1} тяжелой цепи иммуноглобулина. “Область C_{H1}” означает, к примеру, область антитела типа IgG1 человека, соответствующую аминокислотам 118-215 по нумерации EU. Таким образом, Fab-фрагмент содержит связывающую область иммуноглобулина.

Термин “антитело” (Ab) в настоящем изобретении обозначает молекулы иммуноглобулина, фрагменты молекул иммуноглобулина либо их производные. Антитело по настоящему изобретению содержит Fc-область иммуноглобулина и антигенсвязывающая область. Область Fc обычно содержит две области C_{H2}-C_{H3} и соединительный участок, напр., шарнирный участок. Переменные области тяжелых и легких цепей молекулы иммуноглобулина содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном.

Термин “антитело” в настоящем изобретении также обозначает, если не указано иначе или не противоречит контексту, поликлональные антитела, олигоклональные антитела, моноклональные антитела (как-то человеческие моноклональные антитела), смеси антител, рекомбинантные поликлональные антитела, химерные антитела, гуманизованные антитела и человеческие антитела. Образовавшееся антитело может потенциально относиться к любому классу или изотипу.

Термин “человеческое антитело” в настоящем изобретении относится к антителам, содержащим переменные и константные области, происходящие из гаметных последовательностей иммуноглобулина человека. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые гаметными последовательностями иммуноглобулина человека (напр., мутации, вставки или делеции, введенные при случайном или сайт-специфическом мутагенезе *in vitro* или соматические мутации *in vivo*). Однако термин “человеческое антитело” в настоящем изобретении не должен включать антитела, у которых на каркасные последовательности человека были привиты последовательности CDR, полученные из гаметной линии другого вида типа мыши.

Термин “химерное антитело” в настоящем изобретении относится к таким антителам, у которых оба типа цепей, т.е. тяжелые цепи и легкие цепи, являются химерными в результате конструирования антител. Химерная цепь представляет собой цепь, которая содержит чужеродный переменный домен (происходящий из другого вида, чем человек, либо синтетический или сконструированный из любого вида, включая человека), соединенный с константной областью человеческого происхождения.

Термин “гуманизованное антитело” в настоящем изобретении относится к таким антителам, у которых оба типа цепей являются гуманизованными в результате конструирования антител. Гуманизованная цепь обычно представляет собой цепь, у которой определяющие комплементарность участки (CDR) переменных доменов являются чужеродными (происходящими из другого вида, чем человек, или синтетическими), тогда как остальная часть цепи имеет человеческое происхождение. Оценка гуманизованности исходит из полученной аминокислотной последовательности, а не самой методологии, которая позволяет использовать и другие методики, помимо пересадки.

Термин “изотип” в настоящем изобретении относится к классу иммуноглобулина (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE или IgM), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Для получения канонических антител каждый изотип тяжелой цепи следует комбинировать с легкой цепью каппа (κ) или лямбда (λ).

Термин “аллотип” в настоящем изобретении относится к изменчивости аминокислот в пределах одного класса изотипа у одного и того же вида. Преобладающий аллотип

изотипа антител зависит от этнической принадлежности. Известные варианты аллотипов в пределах изотипа IgG1 тяжелой цепи являются результатом 4 аминокислотных замен в каркасе антитела, как показано на фиг. 1. В одном воплощении антитело по изобретению относится к аллотипу IgG1m(f), который приведен в SEQ ID NO 29. В одном воплощении изобретения антитело относится к аллотипу IgG1m(z), приведенному в SEQ ID NO 30, аллотипу IgG1m(a), приведенному в SEQ ID NO 31, аллотипу IgG1m(x), приведенному в SEQ ID NO 32, или к любой комбинации аллотипов, как-то IgG1m(z,a), IgG1m(z,a,x), IgG1m(f,a) (de Lange, Exp Clin Immunogenet, 1989, 6(1):7-17).

Термины “моноклональное антитело”, “моноклональное Ab”, “композиция моноклональных антител”, “mAb” и т.п. в настоящем изобретении относятся к препаратам молекул Ab одинакового молекулярного состава. Композиция моноклональных антител проявляет единственную специфичность связывания и сродства к определенному эпитопу. Соответственно, термин “человеческое моноклональное антитело” относится к Abs, проявляющим единственную специфичность связывания, которые содержат переменные и константные области, происходящие из гаметных последовательностей иммуноглобулина человека. Человеческие mAbs могут вырабатываться гибридомой, включающей В-клетки, полученные из трансгенного или трансхромосомного животного, отличного от человека, типа трансгенной мыши, в геноме которых содержится трансгенный репертуар тяжелой цепи человека и трансгенный репертуар легкой цепи человека, перестроенные так, чтобы они вырабатывали функциональное антитело человека, и слитые с иммортализованными клетками. С другой стороны, человеческие mAbs могут быть получены рекомбинантным способом.

Термин “миметики антител” в настоящем изобретении относится к соединениям, которые, подобно антителам, могут специфически связывать антигены, но по структуре не родственны антителам. Обычно они представляют собой искусственные пептиды, белки, нуклеиновые кислоты или небольшие молекулы.

Термин “биспецифическое антитело” относится к антителам, обладающим специфичностью по меньшей мере к двум разным, как правило, не перекрывающимся эпитопам. Такие эпитопы могут находиться на одной и той же мишени или на разных мишенях. Примеры различных классов биспецифических антител, содержащих Fc-область, включают, без ограничения: асимметричные биспецифические молекулы, напр., молекулы типа IgG с комплементарными доменами C_H3, и симметричные биспецифические молекулы, напр., рекомбинантные молекулы типа IgG с двойным наведением, причем каждая антиген-связывающая область молекулы связывается по меньшей мере с двумя разными эпитопами.

Примеры биспецифичных молекул включают, без ограничения, Triomab[®] (Trion Pharma/Fresenius Biotech, WO 2002/020039), Knobs-into-Holes (Genentech, WO 9850431), CrossMAbs (Roche, WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253), электростатически подогнанные Fc-гетеродимерные молекулы (Amgen, EP1870459 и WO 2009/089004; Chugai, US 2010/00155133; Oncomed, WO 2010/129304), LUZ-Y (Genentech), DIG-тела, PIG-тела и TIG-тела (Pharmabcine), полученные путем обмена нитей доменные антитела (SEEDbody) (EMD Serono, WO 2007/110205), биспецифичные IgG1 и IgG2 (Pfizer/Rinat, WO 11143545), Azymetric scaffold (Zymeworks/Merck, WO 2012/058768), mAb-Fv (Xencor, WO 2011/028952), XmAb (Xencor), бивалентные биспецифические антитела (Roche, WO 2009/080254), биспецифичные IgG (Eli Lilly), молекулы DuoBody[®] (Genmab A/S, WO 2011/131746), DuetMab (MedImmune, US 2014/0348839), Biclonics (Merus, WO 2013/157953), NovImmune (κλBodies, WO 2012/023053), FcΔAdp (Regeneron, WO 2010/151792), (DT)-Ig (GSK/Domantis), антитела два-в-одном или Fabs двойного действия (Genentech, Adimab), mAb2 (F-Star, WO 2008/003116), Zybodies[™] (Zyngenia), CovX-тела (CovX/Pfizer), FynomAbs (Covagen/Janssen Cilag), DutaMab (Dutalys/Roche), iMab (MedImmune), Dual Variable Domain (DVD)-Ig[™] (Abbott, US 7,612,18), двухдоменные антитела с двойной головкой (Unilever; Sanofi Aventis, WO 2010/0226923), Ts2Ab (MedImmune/AZ), BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, US 007951918), слитые scFv (Genentech/Roche, Novartis, Immunomedics, Changzhou Adam Biotech Inc., CN 102250246), TvAb (Roche, WO 2012/025525, WO 2012/025530), слияния ScFv/Fc, SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Interceptor (Emergent), технология двойного сродства с повторным наведением (Fc-DART[™]) (MacroGenics, WO 2008/157379, WO 2010/080538), BEAT (Glenmark), Di-Diabody (Imclone/Eli Lilly), химически сшитые mAb (Karmanos Cancer Center) и ковалентно слитые mAb (AIMM Therapeutics).

Термин “полноразмерное антитело” в настоящем изобретении относится к таким антителам (напр., исходным или вариантам антител), которые содержат все константные и переменные области тяжелых и легких цепей, соответствующие тем, которые обычно встречаются в антителах дикого типа этого класса или изотипа.

Термин “олигомер” в настоящем изобретении относится к таким молекулам, которые состоят из более чем одного, но ограниченного числа мономерных звеньев (напр., антител), в отличие от полимеров, которые, по крайней мере в принципе, состоят из неограниченного числа мономеров. Типичными олигомерами являются димеры, тримеры, тетрамеры, пентамеры и гексамеры. Греческие префиксы часто используются для обозначения количества мономерных звеньев в олигомере, например, тетрамер состоит из четырех звеньев, а гексамер – из шести. Аналогичным образом термин “олигомеризация”

в настоящем изобретении служит для обозначения процесса, при котором молекулы преобразуются до конечной степени полимеризации. При этом отмечается, что антитела и/или другие димерные белки, содержащие области связывания мишени по изобретению, могут образовывать олигомеры типа гексамеров посредством нековалентной ассоциации Fc-областей после связывания с мишенью, напр., на поверхности клетки.

Термин “антигенсвязывающая область”, “область связывания”, “антиген-связывающая область” или антигенсвязывающий домен в настоящем изобретении относится к такой области антитела, которая способна связываться с антигеном. Эта область связывания обычно определяется доменами V_H и V_L антитела, которые можно еще подразделить на участки гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или образовывать структурно определенные петли), которые также называют определяющими комплементарность участками (CDR), чередующиеся с более консервативными участками, которые называют каркасными участками (FR). Антигеном может быть любая молекула, как-то полипептид, напр., находящийся на клетке, бактерии или вирусе либо в растворе. В контексте настоящего изобретения термины “антиген” и “мишень”, если это не противоречит контексту, могут применяться взаимозаменяемым образом.

Термин “мишень” в настоящем изобретении относится к молекуле, с которой связывается антигенсвязывающая область антитела. Мишень включает любые антигены, на которых направлено вырабатываемое антитело. Термины “антиген” и “мишень” в отношении антител могут применяться взаимозаменяемым образом и иметь один и тот же смысл и назначение в отношении любого аспекта или воплощения настоящего изобретения.

Термин “эпитоп” обозначает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из поверхностных группировок строительных кирпичиков типа аминокислот, боковых цепей сахаров либо их комбинаций и обычно имеют определенные трехмерные структурные характеристики, а также определенные характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы отличаются тем, что связывание с первыми, но не последними, теряется в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в связывании, как-то аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются пептидами, специфически связывающимися антиген (иными словами, эти аминокислотные остатки составляют “отпечаток” пептида, специфически связывающего антиген).

Термин “связывание” в настоящем изобретении относится к связыванию антитела с predetermined антигеном или мишенью, как правило, со сродством связывания, которое соответствует значению K_D в 10^{-6} М или меньше, напр., 10^{-7} М или меньше, как-то 10^{-8} М или меньше, как-то 10^{-9} М или меньше, примерно 10^{-10} М или меньше либо 10^{-11} М или даже меньше при определении, к примеру, методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIAcore 3000, используя антиген в качестве лиганда и антитело в качестве анализируемого вещества или наоборот, и связывается с predetermined антигеном со сродством, соответствующим значению K_D , которое по меньшей мере в 10 раз меньше, как-то по меньшей мере в 100 раз меньше, к примеру, по меньшей мере в 1000 раз меньше, как-то по меньшей мере в 10000 раз меньше, к примеру, по меньшей мере в 100000 раз меньше, чем его сродство связывания с неспецифическим антигеном (напр., BSA, казеин), отличным от predetermined антигена или близкородственного антигена. Степень, в которой сродство будет меньше, зависит от значения K_D антитела так, что когда K_D у антитела очень низкое (то есть антитело является высокоспецифичным), то степень, в которой сродство к антигену меньше, чем сродство к неспецифическому антигену, может составлять по меньшей мере 10000 раз. Термин “ K_D ” (М) в настоящем изобретении относится к равновесной константе диссоциации определенного взаимодействия антиген-антитело, которая получается делением k_d на k_a .

Термин “ k_d ” (сек^{-1}) в настоящем изобретении относится к константе скорости диссоциации определенного взаимодействия антиген-антитело. Указанное значение также приводится как значение k_{off} или константа скорости отрыва.

Термин “ k_a ” ($\text{М}^{-1} \times \text{сек}^{-1}$) в настоящем изобретении относится к константе скорости ассоциации определенного взаимодействия антиген-антитело. Указанное значение также приводится как значение k_{on} или константа скорости посадки.

Термин “ K_A ” (М^{-1}) в настоящем изобретении относится к равновесной константе ассоциации определенного взаимодействия антиген-антитело, которая получается делением k_a на k_d .

В настоящем изобретении термин “сродство” означает прочность связывания одной молекулы, напр., антитела, с другой, напр., с мишенью или антигеном, на одном сайте, как-то при моновалентном связывании отдельного антигенсвязывающего сайта антитела с антигеном.

В настоящем изобретении термин “авидность” относится к совместной прочности множественных сайтов связывания между двумя структурами, как-то между множественными сайтами связывания антигена у антител, взаимодействующих одновременно с мишенью. Когда имеется более чем одно связывающее взаимодействие, две структуры

будут диссоциировать только тогда, когда диссоциируют все сайты связывания, поэтому скорость диссоциации будет меньше, чем для индивидуальных сайтов связывания, тем самым обеспечивая большую эффективную общую прочность связывания (авидность) по сравнению с прочностью связывания индивидуальных сайтов связывания (сродством).

Термин “усиливающая гексамеризацию мутация” в настоящем изобретении относится к мутации аминокислоты в положении, соответствующем E430, E345 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU. Мутация, усиливающая гексамеризацию, усиливает взаимодействие Fc-Fc между соседствующими IgG-антителами, связанными с мишенью на поверхности клетки, что приводит к усилению образования гексамеров связанных с мишенью антител, тогда как молекулы антител остаются мономерными в растворе, как описано в WO 2013/004842; WO 2014/108198.

Термин “репульсионная мутация” или “вызывающая отталкивание мутация” или “ингибирующая гексамеризацию мутация” в настоящем изобретении относится к такой мутации аминокислоты в каком-то положении IgG1 человека, которая может привести к отталкиванию зарядов между аминокислотами на границе Fc-Fc, что ведет к ослаблению взаимодействия Fc-Fc между двумя соседними полипептидами, содержащими области Fc, и тем самым ингибирует гексамеризацию. Примерами такой репульсионной мутации в IgG1 человека являются K439E и S440K. Отталкивание при взаимодействии Fc-Fc между двумя соседними полипептидами, содержащими области Fc, в положении репульсионной мутации можно нейтрализовать путем введения второй мутации (комплементирующей мутации) в положении такой аминокислоты, которая взаимодействует с положением, несущим первую мутацию. Эта вторая мутация может находиться в том же самом антителе либо во втором антителе. Сочетание первой и второй мутаций приводит к нейтрализации отталкивания и восстановлению взаимодействий Fc-Fc и тем самым к гексамеризации. Примерами таких первой и второй мутаций являются K439E (репульсионная мутация) и S440K (нейтрализует вызванное K439E отталкивание) и наоборот: S440K (репульсионная мутация) и K439E (нейтрализует вызванное S440K отталкивание).

Термин “комплементирующая мутация” в настоящем изобретении относится к такой мутации аминокислоты в каком-то положении содержащего Fc-область полипептида, которая соотносится с первой мутацией в соседнем содержащем Fc-область полипептиде, который предпочтительно взаимодействует с содержащим Fc-область полипептидом, содержащим комплементирующую мутацию, при сочетании двух мутаций в двух соседних содержащих Fc-область полипептидах. Комплементирующая мутация и связанная с ней первая мутация могут находиться в одном и том же антителе (внутримолекулярные) либо во втором антителе (межмолекулярные). Примером внутримолекулярных

комплементирующих мутаций является комбинация K409 и F405L, которая опосредует предпочтительную гетеродимеризацию у биспецифического антитела по WO 2011/131746. Комбинация мутаций K439E и S440K, которая приводит к нейтрализации отталкивания и восстановлению взаимодействий Fc-Fc между двумя соседними содержащими Fc-область полипептидами и тем самым к гексамеризации, является примером комплементирующих мутаций, которые могут применяться как межмолекулярно, так и внутримолекулярно.

Термин “апоптоз” в настоящем изобретении относится к процессу запрограммированной клеточной смерти (PCD), которая может иметь место в клетках. Биохимические события приводят к характерным изменениям (морфологии) клеток и смерти. Эти изменения включают блеббинг, сморщивание клеток, выделение фосфатидилсерина, потерю функции митохондрий, фрагментацию ядер, конденсацию хроматина, активацию каспаз и фрагментацию хромосомной ДНК. В одном конкретном воплощении апоптоз под действием одного или нескольких агонистических антител против DR5 можно определять, к примеру, такими методами, как анализ активации каспазы-3/7, описанный в примерах 19, 20, 25 и 45, или по выделению фосфатидилсерина, описанному в примерах 19 и 25. К адгезированным клеткам можно добавить антитело против DR5 при фиксированной концентрации, напр., 1 мкг/мл, и инкубировать от 1 до 24 часов. Активацию каспазы-3/7 можно определить с помощью специальных наборов для этой цели типа PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit фирмы BD Pharmingen (кат. № 550914) (примеры 19 и 25) или Caspase-Glo 3/7 Assay фирмы Promega (кат. № G8091) (примеры 20 и 45). Выделение фосфатидилсерина и клеточную смерть можно определить с помощью специальных наборов для этой цели типа FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I фирмы BD Pharmingen (кат. № 556547) (примеры 19 и 25).

Термин “запрограммированная клеточная смерть” или “PCD” в настоящем изобретении относится к гибели клеток в любой форме, опосредованной внутриклеточной сигнализацией, напр., при апоптозе, аутофагии или некроптозе.

Термин “аннексин V” в настоящем изобретении относится к белку из группы аннексинов, который связывает фосфатидилсерин (PS) на поверхности клетки.

Термин “активация каспаз” в настоящем изобретении относится к расщеплению неактивных про-форм эффекторных каспаз инициаторными каспазами, что ведет к превращению их в эффекторные каспазы, которые, в свою очередь, расщепляют белковые субстраты внутри клетки, запуская апоптоз.

Термин “зависимая от каспаз запрограммированная клеточная смерть” в настоящем изобретении относится к любым формам запрограммированной клеточной смерти, опосредованной каспазами. В одном конкретном воплощении зависимая от каспаз запрог-

раммированную клеточную смерть под действием одного или нескольких агонистических антител против DR5 можно определять путем сравнения жизнеспособности клеточной культуры в присутствии и в отсутствие пан-каспазного ингибитора Z-Val-Ala-DL-Asp-фторметилкетона (Z-VAD-FMK), как описано в примерах 18 и 44. К адгезированным клеткам в 96-луночных планшетах с плоским дном можно добавить пан-каспазный ингибитор Z-VAD-FMK (конечная концентрация 5 мкМ) и инкубировать 1 час при 37°C. Затем можно добавить ряд разведений концентрации антител (напр., начиная, к примеру, с 20000 нг/мл до конечной концентрации 0,05 нг/мл в 5-кратных разведениях) и инкубировать 3 дня при 37°C. Жизнеспособность клеток можно определить с помощью специальных наборов для этой цели типа люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo фирмы Promega (кат. № G7571).

Термин “жизнеспособность клеток” в настоящем изобретении относится к наличию метаболически активных клеток. В одном конкретном воплощении жизнеспособность клеток после инкубации с одним или несколькими агонистическими антителами против DR5 можно определить путем количественного определения АТФ в клетках, как описано в примерах 8-18, 21-24, 38-44, 46 и 48. К клеткам в 96-луночных планшетах с плоским дном можно добавить ряд разведений концентрации антител (напр., начиная, к примеру, с 20000 нг/мл до конечной концентрации 0,05 нг/мл в 5-кратных разведениях), в качестве отрицательного контроля можно использовать среду, а в качестве положительного контроля для индукции клеточной смерти можно использовать 5 мкМ ставроспорина. После 3-дневной инкубации можно определить жизнеспособность клеток с помощью специальных наборов для этой цели типа люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo фирмы Promega (кат. № G7571). Процент жизнеспособных клеток можно рассчитать по следующей формуле: % жизнеспособных клеток = [(люминесценция образца с антителом – люминесценция образца со стауроспорином)/(люминесценция образца без антитела – люминесценция образца со стауроспорином)] × 100.

Термин “DR5” в настоящем изобретении относится к рецептору смерти 5, также известному как CD262 и TRAILR2, который представляет собой однопролетный мембранный белок I типа с тремя внеклеточными доменами, богатыми цистеином (CRD), трансмембранным доменом (TM) и цитоплазматическим доменом, содержащим домен смерти (DD). У людей белок DR5 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO 46 (белок DR5 человека: UniprotKB/Swissprot 014763).

Термины “антитело, связывающее DR5”, “антитело против DR5”, “DR5-связывающее антитело”, “DR5-специфичное антитело”, “антитело к DR5”, которые могут приме-

няться здесь взаимозаменяемо, относятся к любым антителам, связывающим какой-либо эпитоп на внеклеточной части DR5.

Термин “агонист” в настоящем изобретении относится к молекулам типа антител против DR5, которые способны запускать ответ у клеток при связывании с DR5, причем ответом может быть запрограммированная клеточная смерть. То, что антитело против DR5 является агонистическим, следует понимать так, что оно стимулирует, активирует или вызывает кластеризацию DR5 при связывании анти-DR5 с DR5. Так, агонистическое антитело против DR5, содержащее мутацию аминокислоты в области Fc по настоящему изобретению, при связывании с DR5 вызывает стимуляцию, кластеризацию DR5 или активацию тех же внутриклеточных сигнальных путей, что и TRAIL при связывании с DR5. В одном конкретном воплощении агонистическую активность одного или нескольких антител можно определить путем инкубации клеток мишени в течение 3 дней с рядом разведений концентрации антител (напр., от 20000 нг/мл до конечной концентрации 0,05 нг/мл в 5-кратных разведениях). Антитела можно добавлять прямо при посеве клеток (как описано в примерах 8, 9, 10, 39) или же клеткам сначала дают прилипнуть к 96-луночным планшетам с плоским дном, а затем добавляют образцы антител (как описано в примерах 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 48). Агонистическую активность, то есть агонистическое действие можно определить по измерению количества жизнеспособных клеток с помощью специальных наборов для этой цели типа люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo фирмы Promega (кат. № G7571).

Термины “DR5-положительные” и “DR5-экспрессирующие” в настоящем изобретении относятся к тканям или линиям клеток, проявляющим связывание специфичных к DR5 антител, которое можно измерить, к примеру, методом проточной цитометрии или иммуногистохимии.

“Вариант” или “вариант антитела” по настоящему изобретению представляет собой молекулу антитела, которая содержит одну или несколько мутаций по сравнению с “исходным” антителом. Типичные форматы исходных антител включают, без ограничения, антитела дикого типа, полноразмерные антитела или Fc-содержащие фрагменты антител, биспецифические антитела, человеческие антитела, гуманизованные антитела, химерные антитела или любые их комбинации.

Примеры мутаций включают делеции, вставки и замены аминокислот в исходной аминокислотной последовательности. При замене аминокислот может происходить обмен природной аминокислоты, присутствующей в белке дикого типа, на другую природную аминокислоту или не встречающуюся в природе аминокислоту или на не встречающееся в природе производное аминокислоты. Замена аминокислот может быть консервативной

или не консервативной. В контексте настоящего изобретения консервативные замены можно определить как замены в пределах классов аминокислот, приведенных в одной или нескольких из следующих трех таблиц.

Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Кислые остатки	Asp (D) и Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R) и His (H)
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (S), Thr (T), Asn (N) и Gln (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M) и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W)

Альтернативные классы консервативных замен аминокислотных остатков

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Содержащие спиртовую группу остатки	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Связанные с циклоалкенилами остатки	F, H, W и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Небольшие остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V
Очень маленькие остатки	A, G и S
Участвующие в образовании изгибов	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	T, K, S, G, D, E и R

В контексте настоящего изобретения замена у варианта обозначается как:

исходная аминокислота – положение – заменяющая аминокислота.

Для обозначения аминокислот применяется трехбуквенный код либо однобуквенный код, включая коды Хаа и Х. Соответственно, обозначение “E345R” или “Glu345Arg” означает, что этот вариант включает замену глутаминовой кислоты на аргинин в положении аминокислоты у варианта, соответствующей аминокислоте в положении 345 у исходного антитела.

Когда какое-то положение у антитела отсутствует как таковое, но вариант включает вставку аминокислоты, то применяется обозначение типа положение – заменяющая аминокислота, к примеру, “448E”. Такие обозначения имеют особое значение в связи с модификациями в серии гомологичных полипептидов или антител. Точно так же, когда идентичность заменяющего аминокислотного остатка несущественна: исходная аминокислота – положение, к примеру, “E345”. Для модификаций, при которых исходная аминокислота и/или заменяющая аминокислота может включать более одной, но не все аминокислоты, в контексте изобретения замена глутаминовой кислоты на аргинин, лизин или триптофан в положении 345 может обозначаться взаимозаменяемо как “Glu345Arg, Lys, Trp” или “E345R,K,W” или “E345R/K/W” или “E345 на R, K или W”. Кроме того, термин “замена” охватывает замены на любые из 19 других природных аминокислот или на другие аминокислоты типа не природных аминокислот. Например, замена аминокислоты E в положении 345 включает каждые из следующих замен: 345A, 345C, 345D, 345G, 345H, 345F, 345I, 345K, 345L, 345M, 345N, 345Q, 345R, 345S, 345T, 345V, 345W и 345Y. Впрочем, это эквивалентно обозначению 345X, где X означает любую аминокислоту. Такие замены также могут обозначаться как E345A, E345C, etc. или E345A,C,etc или E345A/C/etc. То же самое по аналогии применимо к всевозможным положениям, приведенным здесь, специально, чтобы включить сюда любые из таких замен.

Для целей настоящего изобретения идентичность последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями определяется с помощью алгоритма Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48: 443-453), который реализован в программе Needle из пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), предпочтительно версии 5.0.0 или более поздней. Используются параметры: штраф за разрыв 10, штраф за расширение разрыва 0,5 и матрица замен EBLOSUM62 (EMBOSS версии BLOSUM62). В качестве степени идентичности используется результат на выходе по Needle, отмеченный как “самая длинная идентичность” (полученный с использованием опции -nobrief), который рассчитывается следующим образом:

$$\frac{(\text{идентичные остатки} \times 100)}{(\text{длина совмещения} - \text{общее количество пробелов при совмещении})}$$

Для целей настоящего изобретения идентичность последовательностей между двумя дезоксирибонуклеотидными последовательностями определяется с помощью алгоритма Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, supra), который реализован в программе Needle из пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open

Software Suite, Rice et al., 2000, supra), предпочтительно версии 5.0.0 или более поздней. Используются параметры: штраф за разрыв 10, штраф за расширение разрыва 0,5 и матрица замен EDNAFULL (EMBOSS версии NCBI NUC4.4). В качестве степени идентичности используется результат на выходе по Needle, отмеченный как “самая длинная идентичность” (полученный с использованием опции -nobrief), который рассчитывается следующим образом:

$$\frac{(\text{идентичные дезоксирибонуклеотиды} \times 100)}{(\text{длина совмещения} - \text{общее количество пробелов при совмещении})}$$

Последовательности вариантов CDR могут отличаться от последовательностей участков CDR у исходных антител преимущественно консервативными, физическими или функциональными заменами аминокислот, в общей сложности не более 5 мутаций или замен из числа консервативных, физических или функциональных аминокислот по всем 6 последовательностям CDR в связывающей области антитела, как-то не более 4 мутаций или замен из числа консервативных, физических или функциональных аминокислот, как-то не более 3 мутаций или замен из числа консервативных, физических или функциональных аминокислот, как-то не более 2 мутаций или замен из числа консервативных, физических или функциональных аминокислот, как-то не более 1 мутации или замены из числа консервативных, физических или функциональных аминокислот в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR в связывающей области антитела. Консервативные, физические или функциональные аминокислоты выбирают из числа 20 природных аминокислот, т.е. Arg (R), His (H), Lys (K), Asp (D), Glu (E), Ser (S), Thr (T), Asn (N), Gln (Q), Cys (C), Gly (G), Pro (P), Ala (A), Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Trp (W), Tyr (Y) и Val (V).

Аминокислота или сегмент в одной последовательности, которая “соответствует” аминокислоте или сегменту в другой последовательности, – это аминокислота или сегмент, который совмещается с другой аминокислотой или сегментом при использовании стандартной программы совмещения последовательностей типа ALIGN, ClustalW или аналогичной, как правило, при настройках по умолчанию. Следовательно, стандартная программа совмещения последовательностей может использоваться для идентификации аминокислоты, напр., в последовательности иммуноглобулина, которая соответствует определенной аминокислоте, напр., в IgG1 человека. Кроме того, стандартная программа совмещения последовательностей может использоваться для установления идентичности последовательностей, напр., последовательностей, идентичных SEQ ID NO: 29 по меньшей мере на 80% или 85%, 90% или по меньшей мере на 95%. Например, совмещение последовательностей, приведенное на фиг. 1, может использоваться для идентификации

любой аминокислоты в Fc-области одного аллотипа IgG1, которая соответствует определенной аминокислоте в последовательности Fc другого аллотипа IgG1.

Термин “вектор” в настоящем изобретении относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной индуцировать транскрипцию сегмента нуклеиновой кислоты, лигированного в вектор. Один тип вектора представляет собой “плазмиду”, которая представляет собой кольцевую петлю двухцепочечной ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором сегмент нуклеиновой кислоты может быть лигирован в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетках хозяина, в которые они вводятся (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальное начало репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (как-то не эписомные векторы млекопитающих) могут встраиваться в геном клетки хозяина при введении в клетки хозяина, поэтому они реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они оперативно связаны. Такие векторы приводятся здесь как “рекомбинантные экспрессирующие векторы” (или просто “экспрессирующие векторы”). В общем, экспрессирующие векторы, применимые в методах рекомбинантной ДНК, часто находятся в виде плазмид. В настоящем описании термины “плазида” и “вектор” можно использовать взаимозаменяемым образом, так как плазида является наиболее распространенной формой вектора. Однако настоящее изобретение охватывает и другие формы экспрессирующих векторов, как-то вирусные векторы (типа дефектных по репликации ретровирусов, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов), которые выполняют эквивалентные функции.

Термин “рекомбинантная клетка хозяина” (или просто “клетка хозяина”) в настоящем изобретении служит для обозначения такой клетки, в которую был введен экспрессионный вектор. Следует иметь в виду, что такие термины служат для обозначения не только данных конкретных клеток, но и потомства таких клеток. Поскольку в последующих поколениях могут происходить определенные модификации вследствие мутаций или воздействий окружающей среды, то такое потомство на самом деле может и не быть идентичным родительской клетке, но все-таки включается в рамки термина “клетка хозяина” в настоящем изобретении. Рекомбинантные клетки хозяина включают, к примеру, такие трансфектомы, как клетки CHO-S, клетки HEK-293F, клетки Expi293F, клетки PER.C6, NS0, лимфоцитарные клетки и другие эукариотические клетки, как-то клетки растений и грибов, а также прокариотические клетки типа *E. coli*.

Конкретные воплощения изобретения

Настоящее изобретение основывается, по крайней мере частично, на открытии того, что способность антител против DR5 индуцировать клеточную смерть в клетках

мишени, экспрессирующих DR5, может сильно усиливаться при введении определенных мутаций в Fc-области, соответствующих положениям аминокислот E430, E345 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU. Изобретение также основывается на неожиданном открытии того, что комбинация двух антител, связывающихся с первым и вторым эпитопом на DR5, которые оба содержат мутации в Fc-области, может образовывать гетерогексамеры и проявлять превосходную индукцию клеточной смерти в клетках мишени по сравнению с комбинацией двух антител без мутаций в области Fc.

В одном аспекте настоящее изобретение касается антител против DR5, содержащих Fc-область иммуноглобулина IgG человека и антиген-связывающий участок, связывающийся с DR5, причем Fc-область содержит мутацию в положении аминокислоты, соответствующей положению E430, E345 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU.

Положения, соответствующие E430, E345 и S440 в IgG1 человека по нумерации EU, располагаются в домене C_H3 области Fc.

Антитела против DR5 по настоящему изобретению содержат Fc-область, содержащую первую и вторую тяжелую цепь, причем мутация в положении по настоящему изобретению, соответствующем E430, E345 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU, присутствует и в первой, и во второй тяжелой цепи, либо, что менее предпочтительно, присутствует только в одной из тяжелых цепей. В контексте настоящего изобретения мутация, усиливающая гексамеризацию, представлена мутацией аминокислоты в положении, соответствующем E430, E345 или S440 в IgG1 по нумерации EU. Мутация, усиливающая гексамеризацию, усиливает взаимодействие Fc-Fc между антителами, содержащими мутацию, при связывании с соответствующей мишенью на поверхности клетки.

При введении определенных мутаций в области Fc, соответствующих по меньшей мере одному из следующих положений E430, E345 и S440 в IgG1 человека, усиливается гексамеризация при связывании с мишенью на поверхности клетки, тогда как молекулы антитела остаются мономерными в растворе (WO 2013/004842; WO 2014/108198).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения область Fc антитела против DR5 содержит мутацию, соответствующую E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y или S440W в человеческом IgG1 согласно нумерации EC. Таким образом, антитело против DR5 содержит мутацию, выбранную из группы: E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W в человеческом IgG1 согласно нумерации EC. Таким образом, представлены варианты осуществления, которые позволяют усилить гексамеризацию антител при связывании антигена на клеточной поверхности. Антитело против DR5 содержит Fc-область, содержащую первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, причем одна из вышеупомянутых мутаций, усиливающих

гексамеризацию, может присутствовать в первой и/или второй тяжелой цепи.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит мутацию, соответствующую E430G или E345K в IgG1 человека по нумерации EU. Таким образом, область Fc содержит мутацию, выбранную из E430G и E345K.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 содержит мутацию в положении аминокислоты, соответствующей E430 в IgG1 человека по нумерации EU, причем мутация выбрана из группы, состоящей из E430G, E430S, E430F и E430T.

В одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит мутацию, соответствующую E430G. Так, в одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит мутацию E430G.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 содержит мутацию в положении аминокислоты, соответствующей E345 в IgG1 человека по нумерации EU, причем мутация выбрана из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R и E345Y.

В одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит мутацию, соответствующую E345K. Так, в одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит мутацию E345K.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 содержит мутацию в положении аминокислоты, соответствующей S440 в IgG1 человека по нумерации EU, причем мутация выбрана из группы, состоящей из S440W и S440Y.

В одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит мутацию, соответствующую S440Y. Так, в одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит мутацию S440Y.

В одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит дополнительную мутацию, ингибирующую гексамеризацию, типа K439E или S440K в IgG1 человека по нумерации EU. Ингибирующая гексамеризацию мутация типа K439E или S440K препятствует взаимодействию Fc-Fc с антителами, содержащими такую же мутацию, ингибирующую гексамеризацию, но при объединении антител с мутацией K439E и антител с мутацией S440K ингибирующий эффект нейтрализуется и восстанавливаются взаимодействия Fc-Fc. В одном воплощении настоящего изобретения антитело содержит дополнительную мутацию в положении аминокислоты, соответствующей одному из следующих положений S440 или K439 в IgG1 человека по нумерации EU. В одном воплощении изобретения Fc-область содержит дополнительную мутацию в положении, соответствующем S440 или K439, при условии, что дополнительная мутация находится не в положении S440, если в S440 находится мутация, усиливающая гексамеризацию. Антитела, содержащие мутацию в положении, соответствующем E430, E345 или S440 по настоящему

изобретению, и дополнительную мутацию в положении, соответствующем аминокислоте K439 типа мутации K439E, не образуют олигомеров с антителами, содержащими дополнительную мутацию в положении, соответствующем аминокислоте K439, типа мутации K439E. Однако антитела, содержащие мутацию, усиливающую гексамеризацию, в E430, E345 или S440, и дополнительную мутацию в K439 типа K439E, образуют олигомеры с антителами, содержащими усиливающую гексамеризацию мутацию в E430 или E345 и дополнительную мутацию в S440 типа S440K. Антитела, содержащие мутацию в положении, соответствующем E430 или E345 по настоящему изобретению, и дополнительную мутацию в положении, соответствующем аминокислоте S440 типа мутации S440K, не образуют олигомеров с антителами, содержащими дополнительную мутацию в положении, соответствующем аминокислоте S440, типа мутации S440K. Однако антитела, содержащие усиливающую гексамеризацию мутацию в E430 или E345 и дополнительную мутацию в S440 типа S440K, образуют олигомеры с антителами, содержащими усиливающую гексамеризацию мутацию в E430 или E345 и дополнительную мутацию в K439 типа K439E. В одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит усиливающую гексамеризацию мутацию типа E430G и ингибирующую гексамеризацию мутацию типа K439E. В одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит усиливающую гексамеризацию мутацию типа E345K и ингибирующую гексамеризацию мутацию типа K439E. В другом воплощении настоящего изобретения область Fc содержит усиливающую гексамеризацию мутацию типа E430G и ингибирующую гексамеризацию мутацию типа S440K. В одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит усиливающую гексамеризацию мутацию типа E345K и ингибирующую гексамеризацию мутацию типа S440K. В одном воплощении настоящего изобретения Fc-область содержит усиливающую гексамеризацию мутацию типа S440Y и ингибирующую гексамеризацию мутацию типа K439E. Таким образом, предусмотрены воплощения, допускающие исключительную гексамеризацию между комбинациями антител, содержащих мутацию K439E, и антител, содержащих мутацию S440K.

Молекула DR5 человека (Uniprot 014763) состоит из 440 аминокислот, включая сигнальный пептид в первых положениях 1-55, за которым следует внеклеточный домен в положениях 56-210, трансмембранный домен в положениях 211-231 и цитоплазматический домен в положениях 232-440. Внеклеточный домен состоит из последовательности 155 аминокислот. Короткая изоформа DR5 (Uniprot 014763-2) не содержит а.к. 185-213 во внеклеточном домене.

В одном воплощении изобретения антитело против DR5 содержит антигенсвязывающий участок, связывающийся с эпитопом во внеклеточном домене DR5.

В одном воплощении изобретения антитело содержит антигенсвязывающий участок, связывающийся с тем же сайтом связывания, что и TRAIL, или же сайт связывания, перекрывающий сайт связывания TRAIL. Связывающий мотив TRAIL локализован в CRD2 и CRD3, исходя из кристаллической структуры TRAIL в комплексе с эктодоменом DR5 (Hymowitz et al., Mol Cell. 1999 Oct, 4(4):563-71). Так, в одном воплощении изобретения антитело содержит антигенсвязывающий участок, связывающийся с тем же участком связывания на DR5, что и TRAIL. Так, в одном воплощении антитело к DR5 связывается с CRD2 и/или CRD3 на DR5. В одном воплощении изобретения антитело содержит антигенсвязывающий участок, который блокирует связывание TRAIL с DR5. В одном воплощении изобретения антитело содержит антигенсвязывающий участок, который конкурирует с TRAIL за связывание с DR5. В одном воплощении изобретения антитело блокирует опосредованную TRAIL гибель клеток типа индуцированного TRAIL апоптоза.

В другом воплощении изобретения антитело содержит антигенсвязывающий участок, связывающийся с эпитопом на DR5, который отличается от сайта связывания TRAIL. В одном воплощении изобретения антитело содержит антигенсвязывающий участок, связывающийся с другим сайтом связывания на DR5, отличным от TRAIL. В одном воплощении изобретения антитело не блокирует опосредованную TRAIL гибель клеток типа индуцированного TRAIL апоптоза.

В одном воплощении изобретения антитело содержит антигенсвязывающий участок, связывающийся с эпитопом на DR5, который содержит или нуждается в одном или нескольких аминокислотных остатках, расположенных в пределах аминокислотных остатков 116-138, и одним или несколькими аминокислотными остатками, расположенными в пределах аминокислотных остатков 139-166 по SEQ ID NO 46. То есть антигенсвязывающий участок связывается с или требует для связывания с DR5 одну или несколько аминокислот, расположенных в пределах положений 116-138 на DR5, и одну или несколько аминокислот, расположенных в пределах положений 139-166. То, что антигенсвязывающий участок связывается с одной или несколькими аминокислотами, содержащимися в последовательности, следует понимать так, что антигенсвязывающий участок находится в контакте или непосредственно взаимодействует с одной или несколькими аминокислотами в пределах этой последовательности. То, что антигенсвязывающему участку требуется одна или несколько аминокислот в пределах последовательности означает то, что никакой контакт или прямое взаимодействие между антигенсвязывающим участком и одной или несколькими аминокислотами в последовательности не требуется, а одна или несколько аминокислот необходимы для сохранения трехмерной структуры эпитопа.

В другом предпочтительном воплощении настоящего изобретения антитело содержит антигенсвязывающий участок, связывающийся с эпитопом на DR5, который содержит или нуждается в одном или нескольких аминокислотных остатках, расположенных в пределах аминокислотных остатков 79-138 по SEQ ID NO 46.

В одном воплощении изобретения антитело против DR5 содержит антигенсвязывающая область, включающую вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую домены CDR1, CDR2 и CDR3, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую домены CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности:

- a) (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6;
- b) (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6;
- c) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14;
- d) (V_H) SEQ ID NOs 16, 17, 18 и (V_L) SEQ ID NOs 21, GAS, 22 или
- e) (V_H) CDR1, CDR2, CDR3 и (V_L) CDR1, CDR2 и CDR3, как определено выше в любом из пунктов a)–d), содержащие от одной до пяти мутаций, напр., замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR.

Так, в одном воплощении допускается до шести мутаций типа замен в общей сложности по всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций, напр., замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на участках CDR в области V_L . В других воплощениях не бывает мутаций, напр., замен на участках CDR в области V_H , но на участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять.

В одном воплощении изобретения антитело против DR5, как определено в любом из приведенных здесь воплощений, включает антигенсвязывающая область, содержащую вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую домены CDR1, CDR2 и CDR3, и вариабельную область легкой цепи (V_L), включающую домены CDR1, CDR2 и CDR3, причем данная область V_H и данная область V_L идентичны по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере на 95%, на 97% или на 99% аминокислотной последовательности, приведенной в шести последовательностях CDR, выбранных из группы, состоящей из:

- a) (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6;
- b) (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6;
- c) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14;
- d) (V_H) SEQ ID NOs 16, 17, 18 и (V_L) SEQ ID NOs 21, GAS, 22.

В одном воплощении изобретения антитело против DR5 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), включающую домены CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи (V_L), включающую домены CDR1, CDR2 и CDR3, причем последовательности CDR выбраны из одной из групп, состоящих из:

a) (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6 или

b) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14 или

c) CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и CDR1, CDR2 и CDR3 V_L , как определено в любом из (a) или (b) выше, содержащем от одной до пяти мутаций, в общей сложности, в шести упомянутых CDR-последовательностях. Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций типа замен в общей сложности по всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций, напр., замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на участках CDR в области V_L . В других воплощениях не бывает мутаций, напр., замен на участках CDR в области V_H , но на участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять.

В одном воплощении изобретения антитело против DR5 содержит переменную область тяжелой цепи (V_H), включающую домены CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи (V_L), включающую домены CDR1, CDR2 и CDR3, причем последовательности CDR выбраны из одной из групп, состоящих из:

a) (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6 или

b) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14 или

c) CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и CDR1, CDR2 и CDR3 V_L , как определено выше в пункте a) или b), содержащие от одной до пяти мутаций в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR.

Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций типа замен в общей сложности по всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций, напр., замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на 3 участках CDR в области V_L . В других воплощениях не бывает мутаций, напр., замен на 3 участках CDR в области V_H , но на 6 участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций, напр., замен, причем мутации, напр., замены являются консервативными или затрагивают аминокислоты с аналогичными физическими или функциональными свойствами и предпочтительно не изменяют средства связывания с DR5.

В одном воплощении изобретения антитело против DR5, как определено в любом

из приведенных здесь воплощений, содержит антигенсвязывающая область, включающую переменную область тяжелой цепи (V_H) и переменную область легкой цепи (V_L), причем данная область V_H и данная область V_L идентичны по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере на 95%, на 97% или на 99% аминокислотной последовательности, приведенной в последовательностях V_H и V_L , выбранных из группы, состоящей из:

- a) (V_H) SEQ ID NO:4 и (V_L) SEQ ID NO:7;
- b) (V_H) SEQ ID NO:9 и (V_L) SEQ ID NO:7;
- c) (V_H) SEQ ID NO:12 и (V_L) SEQ ID NO:15;
- d) (V_H) SEQ ID NO:19 и (V_L) SEQ ID NO:23; и
- e) (V_H) SEQ ID NO:20 и (V_L) SEQ ID NO:23.

В одном воплощении изобретения антитело содержит антигенсвязывающая область, включающую переменную область тяжелой цепи (V_H) и переменную область легкой цепи (V_L), имеющие аминокислотные последовательности:

- a) (V_H) SEQ ID NO:4 и (V_L) SEQ ID NO:7;
- b) (V_H) SEQ ID NO:9 и (V_L) SEQ ID NO:7;
- c) (V_H) SEQ ID NO:12 и (V_L) SEQ ID NO:15;
- d) (V_H) SEQ ID NO:19 и (V_L) SEQ ID NO:23;
- e) (V_H) SEQ ID NO:20 и (V_L) SEQ ID NO:23 или

f) CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и CDR1, CDR2 и CDR3 V_L , как определено выше в любом из пунктов a)–e), содержащие от одной до 10 мутаций или замен в общей сложности по данным последовательностям (V_H) и (V_L). Так, в одном воплощении допускается до 10 мутаций типа замен в общей сложности по областям V_H и V_L , определяемых последовательностями V_H и V_L . В некоторых воплощениях изобретения бывает до 10 мутаций, напр., замен, как-то 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мутаций, напр., замен по этим последовательностям V_H и V_L . В одном воплощении изобретения бывает до 10 мутаций или замен в последовательности V_H , но без мутаций в последовательности V_L . В одном воплощении изобретения не бывает мутаций в последовательности V_H , а в последовательности V_L бывает до 10 мутаций, напр., замен. При этом предусмотрены воплощения, которые допускают до 10 мутаций типа замен в последовательностях V_H и V_L , причем мутации типа замен являются консервативными или затрагивают аминокислоты с аналогичными физическими или функциональными свойствами, тем самым допускаются мутации, например, замены в последовательностях V_H и V_L , не изменяющие средства связывания или функции антитела против DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело представляет собой моно-

клональное антитело. В одном воплощении настоящего изобретения антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgD или IgM.

В предпочтительном воплощении изобретения антитело представляет собой антитело IgG1.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело относится к аллотипу IgG1m(f), IgG1m(z), IgG1m(a) или IgG1m(x) или к любой комбинации аллотипов типа IgG1m(z,a), IgG1m(z,a,x), IgG1m(f,a).

В одном воплощении настоящего изобретения антитело содержит Fc-область, включающую аминокислотную последовательность из группы, состоящей из:

- a) SEQ ID NO:29;
- b) SEQ ID NO:30;
- c) SEQ ID NO:31;
- d) SEQ ID NO:32 или

e) аминокислотную последовательность, определенную в любом из пунктов a)–d), содержащую в общей сложности от одной до пяти мутаций, напр., замен, в данной последовательности. Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций, напр., замен в общей сложности по Fc-области. В некоторых воплощениях изобретения в Fc-области допускается до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций, напр., замен.

В одном воплощении изобретения антитело против DR5, как определено в любом из приведенных здесь воплощений, содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем LC включает последовательность SEQ ID NO: 39, а HC по аминокислотной последовательности идентична по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере на 95%, на 97% или на 99% аминокислотной последовательности, выбранной из группы последовательностей HC, состоящей из:

- a) (HC) SEQ ID NO:33;
- b) (HC) SEQ ID NO:34;
- c) (HC) SEQ ID NO:35;
- d) (HC) SEQ ID NO:36;
- e) (HC) SEQ ID NO:37; и
- f) (HC) SEQ ID NO:38.

В одном воплощении изобретения антитело против DR5, как определено в любом из приведенных здесь воплощений, содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем LC по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, по меньшей мере на 97% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 39, а

НС имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей НС, состоящей из:

- a) (НС) SEQ ID NO:33;
- b) (НС) SEQ ID NO:34;
- c) (НС) SEQ ID NO:35;
- d) (НС) SEQ ID NO:36;
- e) (НС) SEQ ID NO:37; и
- f) (НС) SEQ ID NO:38.

В одном воплощении антитело по изобретению содержит тяжелую цепь (НС) и легкую цепь (LC), причем LC включает последовательность SEQ ID NO:39, а НС включает одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из:

- a) (НС) SEQ ID NO:33;
- b) (НС) SEQ ID NO:34;
- c) (НС) SEQ ID NO:35;
- d) (НС) SEQ ID NO:36;
- e) (НС) SEQ ID NO:37;
- f) (НС) SEQ ID NO:38; или

g) (НС), как определено выше в любом из пунктов а)–f), содержащая от одной до 10 мутаций в общей сложности по данной последовательности (НС). Так, в одном воплощении допускается до 10 мутаций типа замен в общей сложности по тяжелой цепи, определяемых последовательностью тяжелой цепи. В некоторых воплощениях изобретения бывает до 10 мутаций, напр., замен, как-то 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мутаций, напр., замен по последовательности тяжелой цепи. При этом предусмотрены воплощения, которые допускают до 10 мутаций типа замен в последовательности тяжелой цепи, причем мутации типа замен являются консервативными или затрагивают аминокислоты с аналогичными физическими или функциональными свойствами, тем самым допускаются мутации или замены в последовательности тяжелой цепи, не изменяющие средства связывания или функции антитела против DR5.

В одном воплощении изобретения антитело против DR5, как определено в любом из приведенных здесь воплощений, содержит тяжелую цепь (НС) и легкую цепь (LC), причем LC включает последовательность SEQ ID NO: 43, а НС по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, по меньшей мере на 95%, на 97% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы последовательностей НС, состоящей из:

- a) (НС) SEQ ID NO:40;

- b) (HC) SEQ ID NO:41; и
- c) (HC) SEQ ID NO:42.

В одном воплощении изобретения антитело против DR5, как определено в любом из приведенных здесь воплощений, содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем LC по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, по меньшей мере на 97% или на 99% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 43, а HC имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей HC, состоящей из:

- a) (HC) SEQ ID NO:40;
- b) (HC) SEQ ID NO:41; и
- c) (HC) SEQ ID NO:42.

В одном воплощении антитело по изобретению содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем LC включает последовательность SEQ ID NO:43, а HC включает одну из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из:

- a) (HC) SEQ ID NO:40;
- b) (HC) SEQ ID NO:41;
- c) (HC) SEQ ID NO:42; или

d) (HC), как определено выше в любом из пунктов а)–с), содержащая от одной до 10 мутаций, напр., замен в общей сложности по данной последовательности (HC).

Так, в одном воплощении допускается до 10 мутаций типа замен в общей сложности по тяжелой цепи, определяемых последовательностью тяжелой цепи. В некоторых воплощениях изобретения бывает до 10 мутаций, напр., замен, как-то 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мутаций, напр., замен по последовательности тяжелой цепи. При этом предусмотрены воплощения, которые допускают до 10 мутаций типа замен в последовательности тяжелой цепи, причем мутации типа замен являются консервативными или затрагивают аминокислоты с аналогичными физическими или функциональными свойствами, тем самым допускаются мутации типа замен в последовательности тяжелой цепи, не изменяющие средства связывания или функции антитела против DR5.

В одном воплощении антитело представляет собой человеческое антитело, химерное антитело или гуманизованное антитело.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 является агонистическим. То, что антитело является агонистическим, следует понимать так, что оно вызывает кластеризацию, стимулирует или активирует DR5. В одном воплощении агонистическое антитело против DR5 по настоящему изобретению при связывании с DR5 активирует те же внутриклеточные пути, что и TRAIL при связывании с DR5. Агонисти-

ческую активность одного или нескольких антител можно определить путем инкубации клеток мишени в течение 3 дней с рядом разведений концентрации антител (напр., от 20000 нг/мл до конечной концентрации 0,05 нг/мл в 5-кратных разведениях). Антитела можно добавлять прямо при посеве клеток (как описано в примерах 8, 9, 10, 39) или же клеткам сначала дают прилипнуть к 96-луночным планшетам с плоским дном, а затем добавляют образцы антител (как описано в примерах 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 48). Агонистическую активность, то есть агонистическое действие можно определить по измерению количества жизнеспособных клеток с помощью специальных наборов для этой цели типа люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo фирмы Promega (кат. № G7571).

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 обладает повышенной агонистической активностью. То, что антитело против DR5 обладает активностью, следует понимать так, что антитело способно вызывать кластеризацию DR5 или активировать по меньшей мере те же внутриклеточные пути, что и TRAIL при связывании с DR5. Так, антитело против DR5 с повышенной агонистической активностью способно индуцировать повышенный уровень апоптоза или запрограммированной клеточной смерти в клетке или ткани, экспрессирующей DR5, по сравнению с TRAIL или антителом IgG1 дикого типа против DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 индуцирует запрограммированную клеточную смерть у клеток мишени. В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 индуцирует зависимую от каспаз клеточную смерть. Зависимая от каспаз клеточная смерть может быть вызвана активацией каспазы-3 и/или каспазы-7. В одном воплощении изобретения антитело против DR5 индуцирует зависимую от каспазы-3 и/или каспазы-7 клеточную смерть. В одном воплощении настоящего изобретения антитело индуцирует апоптоз. Апоптоз под действием одного или нескольких агонистических антител против DR5 можно определять, к примеру, такими методами, как анализ активации каспазы-3/7, описанный в примерах 19, 20, 25 и 45, или по выделению фосфатидилсерина, описанному в примерах 19 и 25. К адгезированным клеткам можно добавить антитело против DR5 при фиксированной концентрации, напр., 1 мкг/мл, и инкубировать от 1 до 24 часов. Активацию каспазы-3/7 можно определять с помощью специальных наборов для этой цели типа PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit фирмы BD Pharmingen (кат. № 550914) (примеры 19 и 25) или Caspase-Glo 3/7 Assay фирмы Promega (кат. № G8091) (примеры 20 и 45). Выделение фосфатидилсерина и клеточную смерть можно определять с помощью специальных наборов для этой цели типа FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I фирмы BD Pharmingen (кат. № 556547) (примеры

19 и 25).

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 индуцирует выделение фосфатидилсерина (PS), которое можно измерить по связыванию с аннексином-V. В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 индуцирует транслокацию PS на клеточную поверхность клеток мишени. Следовательно, связывание аннексина-V коррелирует с запрограммированной клеточной смертью и может использоваться для измерения способности антитела против DR5 индуцировать клеточные события, ведущие к запрограммированной клеточной смерти.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 индуцирует апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5, типа опухолевых клеток.

В одном воплощении изобретения антитело против DR5 снижает жизнеспособность клеток.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 индуцирует кластеризацию DR5. То, что антитело может вызывать кластеризацию и даже усиливать кластеризацию, приводит к активации по меньшей мере тех же внутриклеточных сигнальных путей, что и TRAIL при связывании с DR5.

В одном воплощении антитела или композиции настоящего изобретения индуцируют, запускают, повышают или усиливают апоптоз или клеточную смерть у раковых клеток или раковых тканей, экспрессирующих DR5. Повышение или усиление апоптоза или клеточной смерти можно измерить по усилению или повышению уровня фосфатидилсерина в клетках, подвергнутых воздействию или обработанных одним или несколькими антителами против DR5 по изобретению. С другой стороны, повышение или усиление апоптоза или клеточной смерти можно измерить путем измерения активации каспазы-3 или каспазы-7 в клетках, подвергавшихся воздействию или обработанных одним или несколькими антителами против DR5 по изобретению. С другой стороны, повышение или усиление апоптоза или клеточной смерти можно измерить по потере жизнеспособности в культурах клеток, подвергнутых воздействию или обработанных одним или несколькими антителами против DR5 по изобретению по сравнению с необработанными культурами клеток. Индукцию опосредованного каспазой апоптоза можно оценить по торможению потери жизнеспособности после воздействия антител против DR5 ингибитором каспаз, к примеру, ZVAD.

В одном воплощении настоящего изобретения антитело против DR5 вовлекается в олигомеризацию типа гексамеризации антител на клетках мишени, экспрессирующих DR5. Олигомеризация типа гексамеризации опосредуется взаимодействиями Fc-Fc. Один из способов определения этого состоит в ингибировании взаимодействий Fc-Fc, которое

указывает на то, что антитела олигомеризуются, напр., гексамеризуются. Взаимодействия Fc-Fc могут ингибироваться при связывании пептидов с участвующим во взаимодействиях Fc-Fc гидрофобным участком типа DCAWHLGELVWCT, как описано в примере 15.

Биспецифические антитела

В другом аспекте настоящее изобретение охватывает биспецифические антитела, содержащие по меньшей мере один антигенсвязывающий участок, как описано здесь.

В другом аспекте настоящее изобретение охватывает биспецифические антитела, содержащие один или несколько антигенсвязывающих участков, как описано здесь.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий участок и второй антигенсвязывающий участок, как определено здесь.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит первый и второй антигенсвязывающий участок, причем первый антигенсвязывающий участок и второй антигенсвязывающий участок связывают разные эпитопы на DR5 человека.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит первый и второй антигенсвязывающий участок, причем связывание первого антигенсвязывающего участка с DR5 не блокирует связывание второго антигенсвязывающего участка с DR5 человека.

В одном воплощении настоящего изобретения биспецифическое антитело против DR5 содержит первую и вторую Fc-область, причем первая и/или вторая Fc-область содержит мутацию в положении аминокислоты, соответствующей E430, E345 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU, в соответствии с изобретением. В одном воплощении настоящего изобретения биспецифическое антитело против DR5 содержит первую и вторую Fc-область, причем первая и/или вторая Fc-область содержит мутацию в положении аминокислоты, соответствующей E430, E345 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU. В одном воплощении настоящего изобретения биспецифическое антитело против DR5 содержит первую и вторую Fc-область, причем первая Fc-область содержит мутацию в положении аминокислоты, соответствующей E430, E345 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU. В одном воплощении настоящего изобретения биспецифическое антитело против DR5 содержит первую и вторую Fc-область, причем вторая Fc-область содержит мутацию в положении аминокислоты, соответствующей E430, E345 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит первую и вторую антигенсвязывающую область, причем первая антигенсвязывающая область включает следующие шесть последовательностей CDR:

a) (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а вторая антигенсвязывающая область включает следующие шесть последовательностей CDR:

b) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

или же первая антигенсвязывающая область и вторая антигенсвязывающая область включает:

с) шесть последовательностей CDR, определенных выше в пункте а) или б), содержащих от одной до пяти мутаций или замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, соответственно.

При этом одна или несколько мутаций или замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания данного первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5. Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций или замен в общей сложности по всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций или замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций или замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на участках CDR в области V_L . В других воплощениях не бывает мутаций или замен на участках CDR в области V_H , но на участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций или замен, как-то одна, две, три, четыре или пять.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит первую и вторую антигенсвязывающую область, причем:

a) первая антигенсвязывающая область включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а вторая антигенсвязывающая область включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, или же первая антигенсвязывающая область и вторая антигенсвязывающая область включает:

b) шесть последовательностей CDR, определенных в пункте а), содержащих от одной до пяти мутаций, напр., замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR в каждой первой и второй области связывания антигена, соответственно.

При этом одна или несколько мутаций, напр., замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания данного первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопа DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5. Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций, напр., замен в общей сложности по

всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций или замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на участках CDR в области V_L . В других воплощениях не бывает мутаций, напр., замен на участках CDR в области V_H , но на участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит первую и вторую антигенсвязывающую область, причем первая антигенсвязывающая область включает следующие шесть последовательностей CDR:

а) (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а вторая антигенсвязывающая область включает следующие шесть последовательностей CDR:

б) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

или же первая антигенсвязывающая область и вторая антигенсвязывающая область включает:

с) шесть последовательностей CDR, определенных выше в пункте а) или б), содержащих от одной до пяти мутаций или замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, соответственно. При этом одна или несколько мутаций или замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания данного первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопа DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5. Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций или замен в общей сложности по всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций или замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций или замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на участках CDR в области V_L . В других воплощениях не бывает мутаций или замен на участках CDR в области V_H , но на участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций или замен, как-то одна, две, три, четыре или пять.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит первую и вторую антигенсвязывающую область, причем:

а) первая антигенсвязывающая область включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а вторая антигенсвязывающая область включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, или же первая антигенсвязывающая

область и вторая антигенсвязывающая область включает:

b) шесть последовательностей CDR, определенных в пункте а), содержащих от одной до пяти мутаций или замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR в каждой области связывания антигена, соответственно.

При этом одна или несколько мутаций, напр., замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания данного первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5. Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций, напр., замен в общей сложности по всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций или замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на участках CDR в области V_L . В других воплощениях не бывает мутаций, напр., замен на участках CDR в области V_H , но на участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит первую и вторую антигенсвязывающую область, причем первая антигенсвязывающая область включает следующие шесть последовательностей CDR:

a) (V_H) SEQ ID NOs 16, 17, 18 и (V_L) SEQ ID NOs 21, GAS, 6,

а вторая антигенсвязывающая область включает следующие шесть последовательностей CDR:

b) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

или же первая антигенсвязывающая область и вторая антигенсвязывающая область включает:

c) шесть последовательностей CDR, определенных выше в пункте а) или b), содержащих от одной до пяти мутаций или замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, соответственно. При этом одна или несколько мутаций или замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания данного первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5. Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций или замен в общей сложности по всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций или замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций или замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на участках CDR в области V_L . В других

воплощениях не бывает мутаций или замен на участках CDR в области V_H , но на участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций или замен, как-то одна, две, три, четыре или пять.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит первую и вторую антигенсвязывающую область, причем:

а) первая антигенсвязывающая область включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 16, 17, 18 и (V_L) SEQ ID NOs 21, GAS, 6, а вторая антигенсвязывающая область включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, или же первая антигенсвязывающая область и вторая антигенсвязывающая область включает:

б) шесть последовательностей CDR, определенных в пункте а), содержащих от одной до пяти мутаций, напр., замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR в каждой области связывания антигена.

При этом одна или несколько мутаций, напр., замен по всем 6 последовательностям CDR в каждой области связывания антигена не изменяют характеристики связывания данного первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5. Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций, напр., замен в общей сложности по всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций, напр., замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на участках CDR в области V_L . В других воплощениях не бывает мутаций, напр., замен на участках CDR в области V_H , но на участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит первую и вторую антигенсвязывающую область, причем первая антигенсвязывающая область включает следующие последовательности: а) (V_H) CDR1 SEQ ID NO 1, CDR2 SEQ ID NO 8, CDR3 SEQ ID NO 3 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO 6, или б) CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и CDR1, CDR2 и CDR3 V_L , как определено выше в пункте а), содержащие от одной до пяти мутаций в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, а вторая антигенсвязывающая область включает следующие последовательности: с) (V_H) CDR1 SEQ ID NO 10, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO 11 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO 14, или д) CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и CDR1, CDR2 и CDR3 V_L , как определено выше в пункте с), содержащие от одной до пяти мутаций в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит первую и вторую антигенсвязывающую область, причем: а) первая антигенсвязывающая область включает следующие последовательности: (V_H) CDR1 SEQ ID NO 1, CDR2 SEQ ID NO 8, CDR3 SEQ ID NO 3 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO 6, а вторая антигенсвязывающая область включает следующие последовательности: (V_H) CDR1 SEQ ID NO 10, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO 11 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO 14, или же б) первая антигенсвязывающая область или вторая антигенсвязывающая область содержит от одной до пяти мутаций в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR в каждой области связывания антигена.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит первую и вторую антигенсвязывающую область, причем первая антигенсвязывающая область включает следующие последовательности: а) (V_H) CDR1 SEQ ID NO 1, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO 3 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO 6, или б) CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и CDR1, CDR2 и CDR3 V_L, как определено выше в пункте а), содержащие от одной до пяти мутаций в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, а вторая антигенсвязывающая область включает следующие последовательности: с) (V_H) CDR1 SEQ ID NO 10, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO 11 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO 14, или д) CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и CDR1, CDR2 и CDR3 V_L, как определено выше в пункте с), содержащие от одной до пяти мутаций в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит первую и вторую антигенсвязывающую область, причем: а) первая антигенсвязывающая область включает следующие последовательности: (V_H) CDR1 SEQ ID NO 1, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO 3 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO 6, а вторая антигенсвязывающая область включает следующие последовательности: (V_H) CDR1 SEQ ID NO 10, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO 11 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO 14, или же б) первая антигенсвязывающая область или вторая антигенсвязывающая область содержит от одной до пяти мутаций в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR в каждой области связывания антигена.

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит первую и вторую антигенсвязывающую область, где указанная первая антигенсвязывающая область содержит следующие последовательности (а) (V_H) CDR1 SEQ ID NO 16, CDR2 SEQ ID NO 17, CDR3 SEQ ID NO 18 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 21, CDR2 GAS, CDR3 SEQ ID NO 22 или (б) CDR1, CDR2 и CDR3 и (V_L) CDR1, CDR2 и CDR3 (V_L), как определено в (а) выше содержащие от одной до пяти мутаций в целом по

указанным шести CDR-последовательностям, и где указанная вторая антигенсвязывающая область содержит следующие последовательности (с) (VH) CDR1 SEQ ID NO 10, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO 11 и (VL) CDR1 SEQ ID NO 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO 14 или (d) CDR1, CDR2 и CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 VL, как определено в (с), выше, содержащие от одной до пяти мутаций по всем указанным шести последовательностям CDR.

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит первую и вторую антигенсвязывающую область, где (а) указанная первая антигенсвязывающая область содержит следующие последовательности (VH) CDR1 SEQ ID NO 16, CDR2 SEQ ID NO 17, CDR3 SEQ ID NO 18 и (VL) CDR1 SEQ ID NO 21, CDR2 GAS, CDR3 SEQ ID NO 22 и указанная вторая антигенсвязывающая область содержит следующие последовательности (VH) CDR1 SEQ ID NO 10, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 и (VL) CDR1 SEQ ID NO 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO 14 или b) указанная первая антигенсвязывающая область или упомянутая вторая антигенсвязывающая область содержит от одной до пяти мутаций в общей сложности по всем шести последовательностям CDR каждого антигенсвязывающего участка.

Если антитело представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит Fc-область, содержащую первую и вторую тяжелую цепь, то мутация по настоящему изобретению, то есть мутация в положении, соответствующем E430, E345 или S440 в IgG1 по нумерации EU, в принципе может присутствовать только в одной из тяжелых цепей, т.е. в первой или во второй тяжелой цепи, хотя в предпочтительном воплощении по настоящему изобретению мутация присутствует как в первой, так и во второй тяжелой цепи биспецифического антитела.

В одном конкретном воплощении антитело может представлять собой биспецифическое антитело типа гетеродимерного белка, описанного в WO 11/131746, включенном сюда в качестве ссылки.

В одном воплощении антитело представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит первую тяжелую цепь, включающую первую Fc-область иммуноглобулина и первую антигенсвязывающую область, и вторую тяжелую цепь, включающую вторую Fc-область иммуноглобулина и вторую антигенсвязывающую область, причем первая и вторая области связывания антигена связывают различные эпитопы на одном и том же антигене или на разных антигенах.

В другом воплощении первая тяжелая цепь, включающая первую Fc-область, содержит дополнительную замену аминокислоты в положении, выбранном из числа соответствующих K409, T366, L368, K370, D399, F405 и Y407 в Fc-области тяжелой цепи

IgG1 человека; а вторая тяжелая цепь, включающая вторую Fc-область, содержит дополнительную замену аминокислоты в положении, выбранном из числа соответствующих F405, T366, L368, K370, D399, Y407 и K409 в Fc-области тяжелой цепи IgG1 человека, причем дополнительная замена аминокислоты в первой тяжелой цепи, включающей первую Fc-область, отличается от дополнительной замены аминокислоты во второй тяжелой цепи, включающей вторую Fc-область.

В следующем воплощении первая тяжелая цепь, включающая первую Fc-область, содержит замену аминокислоты в положении, соответствующем K409 в Fc-области тяжелой цепи IgG1 человека; а вторая тяжелая цепь, включающая вторую Fc-область, содержит замену аминокислоты в положении, соответствующем F405 в Fc-области тяжелой цепи IgG1 человека.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело включает введение первой и второй Fc-области, содержащей мутацию по меньшей мере в одном аминокислотном остатке, выбранном из числа соответствующих E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436 и K447 в Fc-области тяжелой цепи IgG1 человека при условии, что мутация в S440 представлена S440Y или S440W.

В другом воплощении мутации в первой и второй Fc-области по меньшей мере в одном аминокислотном остатке, выбранном из числа соответствующих E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436 и K447 в Fc-области тяжелой цепи IgG1 человека при условии, что мутация в S440 представлена S440Y или S440W, может находиться в положении одного и того же аминокислотного остатка или в другом положении. В другом воплощении это может быть такая же или другая мутация в положении одного и того же аминокислотного остатка в первой и второй Fc-области.

В другом воплощении биспецифическое антитело содержит первую или вторую область C_H2-C_H3, содержащую мутацию по меньшей мере в одном аминокислотном остатке, выбранном из числа соответствующих E345, E430, S440, Q386, P247, I253, S254, Q311, D/E356, T359, E382, Y436 и K447 в Fc-области тяжелой цепи IgG1 человека, при условии, что мутация в S440 представлена S440Y или S440W.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, причем первая тяжелая цепь содержит мутацию, соответствующую F405L в IgG1 человека по нумерации EU, а вторая тяжелая цепь содержит мутацию, соответствующую K409R в IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении изобретения биспецифическое антитело содержится в фармацевтической композиции.

Композиции антител против DR5

Антитела против DR5 типа моноклональных антител или биспецифических антител в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения могут быть включены в композицию типа фармацевтической композиции, диагностической композиции или любой другой композиции.

В одном аспекте изобретение касается композиций, содержащих по меньшей мере одно антитело против DR5 в соответствии с любым из описанных здесь воплощений.

В одном аспекте изобретение касается композиций, содержащих одно или несколько антител против DR5 в соответствии с любым из описанных здесь воплощений. Композиция может содержать одно, два или несколько антител против DR5 по изобретению, как описано здесь, которые не одинаковы, типа комбинации из двух разных моноклональных антител против DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция включает первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, как описано здесь. Так, в одном воплощении настоящего изобретения композиция включает первое антитело, как описано здесь, и второе антитело, как описано здесь, причем первое и второе антитело не являются одинаковыми.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция включает первое антитело против DR5, содержащее мутацию в положении, соответствующем E430 в IgG1 человека по нумерации EU, и второе антитело против DR5, содержащее мутацию в положении, соответствующем E430 в IgG1 человека по нумерации EU, причем первое и второе антитело связываются с разными эпитопами на DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция включает первое антитело против DR5, содержащее мутацию в положении, соответствующем E430 в IgG1 человека по нумерации EU, и второе антитело против DR5, содержащее мутацию в положении, соответствующем E430 в IgG1 человека по нумерации EU, причем первое антитело не блокирует связывание второго антитела с DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция включает первое и второе антитело против DR5, содержащие мутацию в положении, соответствующем E430 в IgG1 человека по нумерации EU, причем такая мутация может быть выбрана из группы, состоящей из E430G, E430S и E430T.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция включает первое антитело против DR5, содержащее мутацию E430G, и второе антитело против DR5, содержащее мутацию E430G, причем первое и второе антитело связываются с разными эпитопами на DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

а) (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

б) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию в положении, соответствующем E430.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию в положении, соответствующем E430 в IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

а) (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

б) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

причем первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5 содержит мутацию E430G в Fc-области.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию E430G в Fc-области.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

а) (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

b) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию в положении, соответствующем E430.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию в положении, соответствующем E430 в IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

a) (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

b) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, причем первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5 содержит мутацию E430G в Fc-области.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию E430G в Fc-области.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция включает первое антитело против DR5, содержащее мутацию в положении, соответствующем E345 в IgG1 человека по нумерации EU, и второе антитело против DR5, содержащее мутацию в положении, соответствующем E345 в IgG1 человека по нумерации EU, причем первое и второе антитело связываются с разными эпитопами на DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция включает первое антитело против DR5, содержащее мутацию в положении, соответствующем E345 в IgG1 человека по нумерации EU, и второе антитело против DR5, содержащее мутацию в положении, соответствующем E345 в IgG1 человека по нумерации EU, причем первое антитело не блокирует связывание второго антитела с DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция включает первое и второе антитело против DR5, содержащие мутацию в положении, соответствующем E345, причем такая мутация может быть выбрана из группы, состоящей из E345K, E345Q, E345R и E345Y.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5, содержащее мутацию E345K, и второе антитело против DR5, содержащее мутацию E345K, причем первое и второе антитело связываются с разными эпитопами на DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

a) (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

b) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию в положении, соответствующем E345.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию в положении, соответствующем E345 в IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

a) (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

b) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию E345K в Fc-области.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а второе антитело против DR5 включает следующие шесть пос-

ководательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию E345K в Fc-области.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

а) (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

б) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию в положении, соответствующем E345.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию в положении, соответствующем E345 в IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

а) (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

б) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию E345K в Fc-области.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию E345K в Fc-области.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция включает первое антитело против DR5, содержащее мутацию в положении, соответствующем S440 в IgG1

человека по нумерации EU, и второе антитело против DR5, содержащее мутацию в положении, соответствующем S440 в IgG1 человека по нумерации EU, причем первое и второе антитело связываются с разными эпитопами на DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция включает первое антитело против DR5, содержащее мутацию в положении, соответствующем S440 в IgG1 человека по нумерации EU, и второе антитело против DR5, содержащее мутацию в положении, соответствующем S440 в IgG1 человека по нумерации EU, причем первое антитело не блокирует связывание второго антитела с DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5, содержащее мутацию S440Y, и второе антитело против DR5, содержащее мутацию S440Y, причем первое и второе антитело связываются с разными эпитопами на DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция включает первое и второе антитело против DR5, содержащие мутацию в положении, соответствующем S440 в IgG1 человека по нумерации EU, причем такая мутация может быть выбрана из группы, состоящей из S440W и S440Y.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

a) (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

b) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию в положении, соответствующем S440.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию в положении, соответствующем S440 в IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

a) (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

b) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию S440Y в Fc-области.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию S440Y в Fc-области.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

a) (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

b) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию в положении, соответствующем S440.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию в положении, соответствующем S440 в IgG1 человека по нумерации EU.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

a) (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR:

b) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию S440Y в Fc-области.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое анти-

тело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6, а второе антитело против DR5 включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14, причем и первое антитело против DR5, и второе антитело против DR5 содержит мутацию S440Y в Fc-области.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, причем первое и второе антитело содержат дополнительную мутацию, ингибирующую гексамеризацию, соответствующую K439E или S440K в IgG1 человека по нумерации EU. В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое и второе антитело против DR5 содержат мутацию, усиливающую гексамеризацию, в положении аминокислоты, соответствующей E430, E345 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU, при этом первое антитело содержит дополнительную мутацию в положении аминокислоты, соответствующей K439, а второе антитело содержит дополнительную мутацию в положении аминокислоты, соответствующей S440, при условии, что усиливающая гексамеризацию мутация приходится не на S440, когда в S440 находится дополнительная мутация. Так, в одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 содержит усиливающую гексамеризацию мутацию типа E430G и K439E, а второе антитело против DR5 содержит усиливающую гексамеризацию мутацию типа E430G и S440K. Так, в одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело против DR5 содержит усиливающую гексамеризацию мутацию типа E345K и K439E, а второе антитело против DR5 содержит усиливающую гексамеризацию мутацию типа E345K и S440K. При этом предусмотрены воплощения, которые допускают композиции, в которых гексамеризация происходит исключительно между комбинациями антител, содержащих мутацию K439E, и антител, содержащих мутацию S440K.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5 и второе антитело против DR5, связывающие разные эпитопы на DR5 человека. В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое антитело против DR5, содержащее антигенсвязывающий участок, который связывается с эпитопом на DR5, содержащим или требующим один или несколько аминокислотных остатков, расположенных в пределах аминокислотных остатков 116-138, и один или несколько аминокислотных остатков, расположенных в пределах аминокислотных остатков

139-166 по SEQ ID NO 46, и второе антитело против DR5, содержащее антигенсвязывающий участок, который связывается с эпитопом на DR5, содержащим или требующим один или несколько аминокислотных остатков, расположенных в пределах аминокислотных остатков 79-138 по SEQ ID NO 46.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит указанное первое антитело против DR5, связывающееся с DR5, которое не блокирует связывание указанного второго антитела против DR5 с DR5. Так, в одном воплощении изобретения композиция содержит первое антитело против DR5, связывающееся с DR5, и второе антитело против DR5, связывающееся с DR5, причем первое и второе антитело против DR5 не конкурируют за связывание с DR5. Таким образом, в контексте настоящего изобретения следует понимать, что первое антитело против DR5, которое не блокирует связывание второго антитела против DR5, может быть тем же, что и первое антитело против DR5, которое не конкурирует со вторым антителом против DR5.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело содержит область V_H и область V_L , содержащую шесть последовательностей CDR, причем эти шесть последовательностей CDR в общей сложности по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям CDR, приведенных далее: а) (V_H) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6; а второе антитело содержит область V_H и область V_L , содержащую шесть последовательностей CDR, причем эти шесть последовательностей CDR в общей сложности по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям CDR, приведенных далее: б) (V_H) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14.

В одном воплощении степень идентичности последовательности у шести последовательностей CDR указанного первого антитела и указанного второго антитела в общей сложности составляет по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97% или 99%.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело включает следующие шесть последовательностей CDR:

а) (V_H) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6,

а второе антитело включает следующие шесть последовательностей CDR:

б) (V_H) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14,

или же первое антитело и второе антитело включает:

с) шесть последовательностей CDR, определенных выше в пункте а) или б), со-

державших от одной до пяти мутаций или замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, соответственно. При этом одна или несколько мутаций или замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания данного первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5. Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций или замен в общей сложности по всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций или замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций или замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на участках CDR в области V_L . В других воплощениях не бывает мутаций или замен на участках CDR в области V_H , но на участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций или замен, как-то одна, две, три, четыре или пять.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем:

а) указанное первое антитело включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6, а второе антитело включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14, или же

б) первое антитело и второе антитело включает шесть последовательностей CDR у каждого антитела, определенных в пункте а), содержащих от одной до пяти мутаций, напр., замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, соответственно.

При этом одна или несколько мутаций, напр., замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания данного первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5. Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций, напр., замен в общей сложности по всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций или замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на участках CDR в области V_L . В других воплощениях не бывает мутаций, напр., замен на участках CDR в области V_H , но на участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело содержит область V_H и область V_L , содержащую

шесть последовательностей CDR, причем эти шесть последовательностей CDR в общей сложности по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям CDR, приведенных далее: а) (V_H) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6; а второе антитело содержит область V_H и область V_L , содержащую шесть последовательностей CDR, причем эти шесть последовательностей CDR в общей сложности по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям CDR, приведенных далее: б) (V_H) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14.

В одном воплощении степень идентичности последовательности у шести последовательностей CDR указанного первого антитела и указанного второго антитела в общей сложности составляет по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97% или 99%.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело включает следующие шесть последовательностей CDR:

а) (V_H) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6,

а второе антитело включает следующие шесть последовательностей CDR:

б) (V_H) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14,

или же первое антитело и второе антитело включает:

с) шесть последовательностей CDR, определенных выше в пункте а) или б), содержащих от одной до пяти мутаций или замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, соответственно.

При этом одна или несколько мутаций или замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания данного первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5. Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций или замен в общей сложности по всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций или замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций или замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на участках CDR в области V_L . В других воплощениях не бывает мутаций или замен на участках CDR в области V_H , но на участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций или замен, как-то одна, две, три, четыре или пять.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем:

а) первое антитело включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6, а второе антитело включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14, или же

б) первое антитело и второе антитело включает шесть последовательностей CDR у каждого антитела, определенных в пункте а), содержащих от одной до пяти мутаций, напр., замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, соответственно. При этом одна или несколько мутаций, напр., замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания данного первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5. Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций, напр., замен в общей сложности по всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций или замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на участках CDR в области V_L . В других воплощениях не бывает мутаций, напр., замен на участках CDR в области V_H , но на участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело содержит область V_H и область V_L , содержащую шесть последовательностей CDR, причем эти шесть последовательностей CDR в общей сложности по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям CDR, приведенных далее: а) (V_H) SEQ ID NOs: 16, 17, 18 и (V_L) SEQ ID NOs: 21, GAS, 6; а второе антитело содержит область V_H и область V_L , содержащую шесть последовательностей CDR, причем эти шесть последовательностей CDR в общей сложности по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям CDR, приведенных далее: б) (V_H) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14.

В одном воплощении степень идентичности последовательности у шести последовательностей CDR указанного первого антитела и указанного второго антитела в общей сложности составляет по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97% или 99%.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело включает следующие шесть последовательностей CDR:

a) (V_H) SEQ ID NOs: 16, 17, 18 и (V_L) SEQ ID NOs: 21, GAS, 6,

а второе антитело включает следующие шесть последовательностей CDR:

b) (V_H) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14,

или же первое антитело и второе антитело включает:

с) шесть последовательностей CDR, определенных выше в пункте а) или б), содержащих от одной до пяти мутаций или замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, соответственно. При этом одна или несколько мутаций или замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания данного первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5. Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций или замен в общей сложности по всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций или замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций или замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на участках CDR в области V_L . В других воплощениях не бывает мутаций или замен на участках CDR в области V_H , но на участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций или замен, как-то одна, две, три, четыре или пять.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем:

a) первое антитело включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs: 16, 17, 18 и (V_L) SEQ ID NOs: 21, GAS, 6, а второе антитело включает следующие шесть последовательностей CDR: (V_H) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14, или же

b) первое антитело и второе антитело включает шесть последовательностей CDR у каждого антитела, определенных в пункте а), содержащих от одной до пяти мутаций, напр., замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, соответственно. При этом одна или несколько мутаций, напр., замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания данного первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5. Так, в одном воплощении допускается до пяти мутаций, напр., замен в общей сложности по всем 6 участкам CDR, составляющим антигенсвязывающую область. В некоторых воплощениях изобретения бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять мутаций или замен по 3 участкам CDR в области V_H , но без мутаций на участках

CDR в области V_L . В других воплощениях не бывает мутаций, напр., замен на участках CDR в области V_H , но на участках CDR в области V_L бывает до пяти мутаций, напр., замен, как-то одна, две, три, четыре или пять.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция включает первое и второе антитело против DR5, как определено в любом из вышеприведенных воплощений, причем первое и второе антитело дополнительно содержит мутацию в Fc-области, соответствующую положению K439 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU. В одном воплощении изобретения композиция включает первое антитело, содержащее мутацию, соответствующую K439 типа K439E, и второе антитело, содержащее мутацию, соответствующую S440 типа S440K. В одном воплощении изобретения композиция включает первое антитело, содержащее мутацию, соответствующую S440 типа S440K, и второе антитело, содержащее мутацию, соответствующую K439 типа K439E. При этом предусмотрено воплощение, в котором композиция включает первое антитело, содержащее по меньшей мере две мутации типа E430G и K439E, и второе антитело, содержащее по меньшей мере две мутации типа E430G и S440K. В другом воплощении настоящего изобретения композиция включает первое антитело, содержащее по меньшей мере две мутации типа E345K и K439E, и второе антитело, содержащее по меньшей мере две мутации типа E345K и S440K. При этом предусмотрены воплощения, которые допускают гексамеризацию антител с различной специфичностью.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело включает следующие последовательности: (a) (V_H) CDR1 SEQ ID NO 1, CDR2 SEQ ID NO 8, CDR3 SEQ ID NO 3 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO 6, а второе антитело включает следующие последовательности: (b) (V_H) CDR1 SEQ ID NO 10, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO 14, или же (c) CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и CDR1, CDR2 и CDR3 V_L , как определено выше в пункте (a) или (b), содержащие в общей сложности от одной до пяти мутаций или замен по всем 6 последовательностям CDR. При этом одна или несколько мутаций или замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания у первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое и второе антитело содержат следующие последовательности CDR: (a) первое антитело содержит следующие последовательности

CDR: (V_H) CDR1 SEQ ID NO 1, CDR2 SEQ ID NO 8, CDR3 SEQ ID NO 3 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO 6, а второе антитело содержит следующие последовательности CDR: (V_H) CDR1 SEQ ID NO 10, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO 11 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO 14, или же (b) последовательности CDR, описанные в пункте (a) для каждого антитела, содержащие в общей сложности от одной до пяти мутаций, напр., замен по всем последовательностям CDR для каждого антитела. При этом одна или несколько мутаций, напр., замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания у первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело включает следующие последовательности: (a) (V_H) CDR1 SEQ ID NO 1, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO 3 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO 6, а второе антитело включает следующие последовательности: (b) (V_H) CDR1 SEQ ID NO 10, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO 14, или же (c) CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и CDR1, CDR2 и CDR3 V_L, как определено выше в пункте (a) или (b), содержащие в общей сложности от одной до пяти мутаций или замен по всем 6 последовательностям CDR. При этом одна или несколько мутаций или замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания у первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое и второе антитело содержат следующие последовательности CDR: (a) первое антитело содержит следующие последовательности CDR: (V_H) CDR1 SEQ ID NO 1, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO 3 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 5, CDR2 FAS, CDR3 SEQ ID NO 6, а второе антитело содержит следующие последовательности CDR: (V_H) CDR1 SEQ ID NO 10, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO 11 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO 14, или же (b) последовательности CDR, описанные в пункте (a) для каждого антитела, содержащие в общей сложности от одной до пяти мутаций, напр., замен по всем последовательностям CDR для каждого антитела. При этом одна или несколько мутаций, напр., замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания

вания у первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело включает следующие последовательности: (a) (V_H) CDR1 SEQ ID NO 16, CDR2 SEQ ID NO 17, CDR3 SEQ ID NO 18 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 21, CDR2 GAS, CDR3 SEQ ID NO 22, а второе антитело включает следующие последовательности: (b) (V_H) CDR1 SEQ ID NO 10, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO: 11 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO 14, или же (c) CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и CDR1, CDR2 и CDR3 V_L, как определено выше в пункте (a) или (b), содержащие в общей сложности от одной до пяти мутаций или замен по всем 6 последовательностям CDR. При этом одна или несколько мутаций или замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания у первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое и второе антитело содержат следующие последовательности CDR: (a) первое антитело содержит следующие последовательности CDR: (V_H) CDR1 SEQ ID NO 16, CDR2 SEQ ID NO 17, CDR3 SEQ ID NO 18 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 21, CDR2 GAS, CDR3 SEQ ID NO 22, а второе антитело содержит следующие последовательности CDR: (V_H) CDR1 SEQ ID NO 10, CDR2 SEQ ID NO 2, CDR3 SEQ ID NO 11 и (V_L) CDR1 SEQ ID NO 13, CDR2 RTS, CDR3 SEQ ID NO 14, или же (b) последовательности CDR, описанные в пункте (a) для каждого антитела, содержащие в общей сложности от одной до пяти мутаций, напр., замен по всем последовательностям CDR для каждого антитела. При этом одна или несколько мутаций, напр., замен по всем 6 последовательностям CDR в области связывания антигена не изменяют характеристики связывания у первого или второго антитела, как-то агонистические свойства, связывание эпитопов DR5 и/или способность индуцировать апоптоз в клетках мишени, экспрессирующих DR5.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело и второе антитело присутствуют в композиции в молярном соотношении от 1:49 до 49:1, как-то в молярном соотношении 1:1, молярном соотношении 1:2, молярном соотношении 1:3, молярном соотношении 1:4, молярном соотношении 1:5, молярном соотношении 1:6, молярном соотношении 1:7, молярном

соотношении 1:8, молярном соотношении 1:9, молярном соотношении 1:10, молярном соотношении 1:15, молярном соотношении 1:20, молярном соотношении 1:25, молярном соотношении 1:30, молярном соотношении 1:35, молярном соотношении 1:40, молярном соотношении 1:45, молярном соотношении 1:50, молярном соотношении 50:1, молярном соотношении 45:1, молярном соотношении 40:1, молярном соотношении 35:1, молярном соотношении 30:1, молярном соотношении 25:1, молярном соотношении 20:1, молярном соотношении 15:1, молярном соотношении 10:1, молярном соотношении 9:1, молярном соотношении 8:1, молярном соотношении 7:1, молярном соотношении 6:1, молярном соотношении 5:1, молярном соотношении 4:1, молярном соотношении 3:1, молярном соотношении 2:1.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело и второе антитело присутствуют в композиции в молярном соотношении от 1:9 до 9:1.

В одном воплощении изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело и второе антитело присутствуют в композиции в молярном соотношении примерно 1:1.

В предпочтительном воплощении изобретения композиция содержит первое и второе антитело против DR5, причем первое антитело и второе антитело и/или любые дополнительные антитела присутствуют в композиции в эквимолярном отношении.

В одном воплощении изобретения композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения могут содержать антитела типа моноклональных антител или биспецифических антител в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения.

Фармацевтические композиции могут быть составлены с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, а также с любыми другими известными адъювантами и эксципиентами в соответствии с обычными методами типа описанных в Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, June 2012, ISBN 9780857110275.

Фармацевтически активные носители или разбавители, а также любые другие известные адъюванты и эксципиенты должны подходить для антител или биспецифических антител настоящего изобретения и выбранного способа введения. Пригодность носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяется на основании отсутствия значительного отрицательного влияния на требуемые биологические свойства выбранного соединения или фармацевтической композиции настоящего изобретения (напр., менее значительного влияния (относительное

ингибирование 10% или меньше, относительное ингибирование 5% или меньше и т.д.) при связывании антигена).

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут включать в себя разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (напр., неионные детергенты типа Tween-20 или Tween-80), стабилизаторы (напр., сахара или свободные от белков аминокислоты), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы и/или другие материалы, пригодные для включения в фармацевтические композиции.

Фактические уровни дозы активных ингредиентов в фармацевтических композициях настоящего изобретения могут варьироваться с тем, чтобы получить такое количество активного ингредиента, которое будет эффективным для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не будучи токсичным для пациента. Выбранный уровень дозы будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, в том числе, активности конкретных композиций настоящего изобретения либо их амидов, способа введения, времени введения, скорости выведения данного соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с данными композициями, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и предыстории болезни пациента, подлежащего лечению, а также других факторов, хорошо известных в медицине.

Фармацевтические композиции можно вводить любым подходящим способом и образом. Подходящие способы введения соединений настоящего изобретения *in vivo* и *in vitro* хорошо известны в данной области и могут быть выбраны рядовыми специалистами в данной области.

В одном воплощении фармацевтические композиции настоящего изобретения вводятся парентерально.

Термины “парентеральное введение” и “вводится парентерально” в настоящем изобретении относятся к способам введения, отличным от энтерального и топического введения, обычно путем инъекции, и включают эпидермальные, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, внутрикапсулярные, внутриглазные, внутрисердечные, интрадермальные, внутрибрюшинные, внутричерепные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, интраспинальные, внутричерепные, внутригрудные, эпидуральные и интратеральные инъекции и инфузии. В одном воплощении фармацевтические композиции настоящего изобретению вводятся посредством внутривенной или подкожной инъекции или инфузии.

В одном воплощении настоящего изобретения фармацевтическая композиция

содержит одно или несколько антител по изобретению типа моноклональных антител или биспецифических антител вместе с фармацевтическим носителем.

Фармацевтически приемлемые носители включают всевозможные подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства, антиоксиданты и средства, замедляющие всасывание, и т.п., которые физиологически совместимы с соединениями настоящего изобретения.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях настоящего изобретения, включают воду, физиологический раствор, физиологический раствор с фосфатным буфером, этанол, декстрозу, полиолы (как-то глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и др.) и подходящие их смеси, растительные масла, как-то оливковое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло и кунжутное масло, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовую камедь и органические сложные эфиры для инъекций типа этилолеата и/или различные буферы. В фармацевтической области хорошо известны и другие носители.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов или дисперсий *ex tempore*. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда какая-либо стандартная среда или средство несовместимы с активным соединением, предусматривается их применение в фармацевтических композициях настоящего изобретения.

Надлежащая текучесть может поддерживаться, к примеру, при помощи таких материалов для покрытия, как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и с помощью поверхностно-активных веществ.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать фармацевтически активные антиоксиданты, к примеру: (1) водорастворимые антиоксиданты, как-то аскорбиновая кислота, цистеин гидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и др.; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и др.; и (3) хелаторы металлов, как-то лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и др.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать средства поддержания изотоничности, как-то сахара, полиспирты типа маннита, сорбита, глицерина или хлорид натрия в композициях.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать

одно или несколько вспомогательных веществ, подходящих для выбранного способа введения, как-то консерванты, смачивающие вещества, эмульгаторы, диспергирующие средства, консерванты или буферы, которые могут увеличить срок хранения или эффективность фармацевтической композиции. Соединения настоящего изобретения могут быть приготовлены с носителями, которые должны защищать соединение от быстрого высвобождения, типа форм с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биоразрушаемые, биосовместимые полимеры типа этилен-винилацетата, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфиры и полимолочную кислоту сами по себе или с воском либо другие материалы, хорошо известные в этой области. Способы приготовления таких лекарственных форм общеизвестны специалистам в данной области.

В одном воплощении соединения настоящего изобретения могут быть составлены так, чтобы обеспечить надлежащее распределение *in vivo*. Фармацевтически приемлемые носители для парентерального введения включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов или дисперсий *ex tempore*. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда какая-либо стандартная среда или средство несовместимы с активным соединением, предусматривается их применение в фармацевтических композициях настоящего изобретения. В композиции также можно включать и другие активные или терапевтические соединения.

Фармацевтические композиции для инъекций или инфузий, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, липосом или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации препарата. Носителем может быть водный или неводный растворитель или дисперсионная среда, содержащая, к примеру, воду, этанол, полиолы (как-то глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и др.) и подходящие их смеси, растительные масла типа оливкового масла и органические эфиры для инъекций типа этилолеата. Надлежащая текучесть может поддерживаться, к примеру, при помощи покрытия типа лецитина, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и с помощью поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно нужно включать средства поддержания изотоничности, к примеру, сахара, полиспирты типа глицерина, маннита, сорбита или хлорид натрия в композиции. Продолжительное всасывание композиций для инъекций можно обеспечить включением в состав средства, замедляющего всасывание, к примеру, солей моностеарата и желатина.

Стерильные растворы для инъекций можно приготовить путем включения активного соединения в требуемом количестве в надлежащий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, напр., перечисленных выше, как потребуется, с последующей стерилизацией микрофильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты, напр., из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций примеры способов получения – вакуумная сушка и замораживание-высушивание (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного нужного ингредиента из предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Стерильные растворы для инъекций можно получить путем включения активного соединения в нужном количестве в надлежащий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, как потребуется, с последующей стерилизацией микрофильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций примеры способов получения – вакуумная сушка и замораживание-высушивание (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного нужного ингредиента из предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения могут содержать одно или несколько моноклональных антител либо одно или несколько биспецифических антител по настоящему изобретению, комбинацию антитела или биспецифического антитела по изобретению с другим терапевтическим соединением или комбинацию соединений настоящего изобретения.

Терапевтические применения

Антитела типа моноклональных антител, биспецифических антител или композиции в соответствии с любым аспектом или воплощением настоящего изобретения могут применяться в качестве лекарственных средств, т.е. для терапевтического применения.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция содержит одно или несколько антител по изобретению типа моноклональных антител или биспецифических антител для применения в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения или профилактики заболеваний с участием клеток, экспрессирующих DR5 у субъекта, причем

способы включают введение терапевтически эффективного количества антитела против DR5, биспецифического антитела или композиции, содержащей одно или несколько антител настоящего изобретения нуждающемуся в этом субъекту. Как правило, способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту антитела против DR5, биспецифического антитела или композиции по настоящему изобретению в количестве, эффективном для лечения или профилактики заболевания.

Антитела против DR5 по настоящему изобретению могут применяться для лечения или профилактики заболеваний с участием клеток, экспрессирующих DR5. Например, антитела могут вводиться людям, напр., *in vivo*, для лечения или профилактики заболеваний, связанных с экспрессирующими DR5 клетками. В настоящем изобретении термин “субъект” обычно означает человека, которому вводятся антитела или биспецифические антитела против DR5. Субъектами, к примеру, могут быть пациенты с заболеваниями, которые можно исправить или улучшить путем модулирования функции DR5 или путем уничтожения экспрессирующих DR5 клеток, прямо или косвенно.

В одном аспекте настоящее изобретение касается антител против DR5, биспецифических антител или композиций, как определено в любом его аспекте или воплощении, для применения при лечении или для улучшения симптомов заболеваний с участием клеток, экспрессирующих DR5.

В одном воплощении настоящего изобретения композиции, содержащие антитела против DR5 или биспецифические антитела в соответствии с любым аспектом или воплощением, как изложено здесь, предназначены для применения при лечении инфекционных заболеваний, аутоиммунных заболеваний или сердечно-сосудистых заболеваний.

В одном аспекте настоящее изобретение касается антител против DR5, биспецифических антител или композиций, как определено в любом его аспекте или воплощении, для применения при лечении или для улучшения симптомов рака и/или опухолей.

В одном воплощении настоящего изобретения композиции, содержащие антитела против DR5 или биспецифические антитела в соответствии с любым аспектом или воплощением изобретения, предназначены для лечения рака и/или опухолей.

Термин “рак” относится к или описывает физиологическое состояние у млекопитающих типа человека, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом. Большинство раковых заболеваний относятся к одной из двух крупных групп рака, т.е. к твердым опухолям и гематологическим опухолям.

В одном конкретном аспекте антитела против DR5, биспецифические антитела или композиции вводятся профилактически для того, чтобы уменьшить риск возникновения

рака, замедлить начало какого-то события при прогрессировании рака или уменьшить риск рецидива, когда рак находится в состоянии ремиссии и/или первичная опухоль была удалена хирургическим путем. В последнем случае антитела, биспецифические антитела или композиции против DR5 можно было бы вводить, к примеру, в сочетании (т.е. до, во время или после) с операцией. Профилактическое введение также может быть полезным у таких пациентов, у которых трудно локализовать опухоль, которая предположительно присутствует, из-за других биологических факторов.

В одном воплощении композиции, содержащие одно или несколько антител или биспецифических антител против DR5 по настоящему изобретению, предназначены для применения при лечении твердых опухолей и/или гематологических опухолей.

В одном воплощении композиции, содержащие одно или несколько антител или биспецифических антител против DR5 по настоящему изобретению, предназначены для применения при лечении таких твердых опухолей, как колоректальный рак, включая колоректальную карциному и колоректальную аденокарциному, рак мочевого пузыря, остеосаркома, хондросаркома, рак молочной железы, включая тройчатку отрицательный рак молочной железы, рак центральной нервной системы, включая глиобластому, астроцитому, нейробластому, неврофибросаркому, нейроэндокринные опухоли, рак шейки матки, рак эндометрия, рак желудка, включая аденокарциному желудка, рак головы и шеи, рак почек, рак печени, включая гепатоцеллюлярную карциному, рак легких, включая немелкоклеточный рак легких (NSCLC) и мелкоклеточный рак легких (SCLC), рак яичников, рак поджелудочной железы, включая карциному протоков поджелудочной железы и аденокарциному поджелудочной железы, саркома или рак кожи, включая злокачественную меланому и немеланомные виды рака кожи.

В одном воплощении изобретения композиции, содержащие одно или несколько антител или биспецифических антител против DR5, предназначены для применения при лечении таких гематологических опухолей, как лейкемия, включая хроническую лимфоцитарную лейкемию и миелоидную лейкемию, включая острую миелоидную лейкемию и хроническую миелоидную лейкемию, лимфома, включая неходжкинскую лимфому, или множественная миелома, включая лимфому Ходжкина, а также миелодиспластические синдромы.

В одном конкретном воплощении настоящего изобретения композиции, содержащие одно или несколько антител или биспецифических антител против DR5, предназначены для лечения рака, выбранного из следующей группы раковых заболеваний: рак мочевого пузыря, рак костей, колоректальный рак, саркома, рак эндометрия, рак фибробластов, рак желудка, рак головы и шеи, рак почек, лейкемия, рак печени, рак

легких, лимфома, рак мышц, рак нервной ткани, рак яичников, рак поджелудочной железы и рак кожи.

В одном воплощении изобретения композиции, содержащие одно или несколько антител или биспецифических антител против DR5, предназначены для применения при торможении роста DR5-положительных или DR5-экспрессирующих опухолей или форм рака.

В настоящем изобретении DR5-положительные опухоли или формы рака следует понимать как опухолевые клетки и/или раковые клетки, экспрессирующие DR5 на поверхности клетки. Такая экспрессия DR5 может детектироваться методом иммуногистохимии, проточной цитометрии, визуализации или другим подходящим диагностическим методом.

В одном воплощении изобретения композиции, содержащие одно или несколько антител или биспецифических антител против DR5, предназначены для применения при торможении роста экспрессирующих DR5 опухолей или форм рака. Опухоли и раковые ткани, проявляющие гетерогенную экспрессию DR5, также рассматриваются как DR5-положительные опухоли и формы рака.

Опухоли и/или формы рака могут экспрессировать DR5 на некоторых опухолевых и/или раковых клетках и/или тканях, проявляющих экспрессию DR5, а некоторые опухоли и/или формы рака могут проявлять гиперэкспрессию или аберрантную экспрессию DR5, тогда как другие опухоли и/или формы рака проявляют гетерогенную экспрессию DR5. Все такие опухоли и/или формы рака могут быть подходящими мишенями для лечения с помощью антител против DR5, биспецифических антител и композиций, содержащих такие антитела по настоящему изобретению.

В одном воплощении изобретения композиция, содержащая один или несколько антител против DR5 или биспецифические антитела, предназначена для применения при индуцировании апоптоза в экспрессирующих DR5 опухолях.

Другой аспект настоящего изобретения составляет способ лечения лиц с раковыми заболеваниями, включающий введение данному лицу эффективного количества антитела против DR5, биспецифического антитела или композиции по изобретению.

В одном воплощении изобретения способ лечения лиц с раковыми заболеваниями, включающий введение данному лицу эффективного количества антитела против DR5, биспецифического антитела или композиции по изобретению, дополнительно включает введение данному лицу дополнительного терапевтического средства.

В одном воплощении изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой единственное средство или комбинацию средств, содержащих средство

или режим, выбранный из группы химиотерапевтических средств (включая, без ограничения, паклитаксель, темозоломид, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, иринотекан, доксорубин, гемцитабин, 5-фторурацил, пеметрексед), ингибиторов киназ (включая, без ограничения, сорафениб, сунитиниб или эверолимус), средств, модулирующих апоптоз (включая, без ограничения, рекомбинантный TRAIL человека или биринапант), ингибиторов RAS, ингибиторов протеасом (включая, без ограничения, бортезомиб), ингибиторов гистондеацетилаз (включая, без ограничения, вориностат), нутрицевтиков, цитокинов (включая, без ограничения, IFN- γ), антител или миметиков антител (включая, без ограничения, антитела и миметики антител против TF, против AXL, против EGFR, против IGF-1R, против VEGF, против CD20, против CD38, против HER2, против PD-1, против PD-L1, против CTLA4, против CD40, против CD137, против GITR, против VISTA (или других иммуномодулирующих мишеней) и конъюгаты типа антитело-препарат, такие как брантуксимаб-ведотин, трастузумаб-энтансин, HuMax-TF-ADC или HuMax-AXL-ADC.

В следующем аспекте изобретение включает наборы из частей, содержащие антитела против DR5, биспецифические антитела или композиции по изобретению, причем данные антитела, биспецифические антитела или композиции находятся в одном или нескольких контейнерах типа в одном или нескольких флаконах.

В одном воплощении изобретения наборы из частей, содержащие антитела против DR5, биспецифические антитела или композиции по изобретению, предназначены для одновременного, отдельного или поочередного применения в терапии.

В следующем воплощении настоящее изобретение касается применения антител против DR5, биспецифических антител или композиций по изобретению для изготовления лекарственных средств для лечения рака.

При описании воплощений настоящего изобретения не были четко описаны комбинации и перестановки всех возможных воплощений. Тем не менее, тот факт, что некоторые меры перечислены в разных зависимых пунктах формулы изобретения или в различных воплощениях, не означает, что комбинация этих мер не может использоваться наилучшим образом. Настоящим изобретением предусмотрены все возможные комбинации и перестановки описанных воплощений.

В другом аспекте настоящего изобретения оно охватывает конструкции из нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела в соответствии с аминокислотными последовательностями, приведенными в табл. 1. Так, в одном воплощении настоящее изобретение включает конструкции из нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела, соответствующие аминокислотным последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 1–23 или 29–43. В одном воплощении настоящего изобретения конструкции из нуклеиновой кислоты коди-

руют антитела в соответствии с любыми изложенными здесь воплощениями.

В следующем аспекте настоящее изобретение касается нуклеиновых кислот, кодирующих антитела по настоящему изобретению, у которых Fc-область содержит мутацию в положении аминокислоты, соответствующей E430, E345 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU. Также предусматривается, что нуклеиновые кислоты кодируют антитела по изобретению, которые содержат аминокислотные замены в конкретных положениях аминокислот, описанных здесь. Так, в одном воплощении нуклеиновая кислота кодирует антитело, имеющее последовательность согласно SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 или 43.

В другом аспекте изобретение касается нуклеиновых кислот, кодирующих последовательности человеческих, гуманизованных или химерных антител против DR5 для применения в изобретении, экспрессирующих векторов, кодирующих последовательности таких антител, клеток хозяина, содержащих такие экспрессирующие векторы, гибридом, вырабатывающих такие антитела, и способов получения таких антител путем культивирования таких клеток хозяина или гибридом в подходящих условиях, при которых вырабатываются и необязательно выделяются антитела. Гуманизованные антитела против DR5 также могут обозначаться как “huDR5”.

В одном воплощении изобретения предусмотрен экспрессионный вектор, содержащий последовательность нуклеотидов, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей согласно SEQ ID NO: 33–43.

В одном воплощении изобретения предусмотрен экспрессионный вектор, содержащий последовательность нуклеотидов, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 и 43 или любых комбинаций из них. В другом воплощении экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей CDR3 V_H, выбранных из SEQ ID NOs: 3 и 11. В другом воплощении экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую аминокислотную последовательность V_H, выбранную из SEQ ID NOs: 4, 9 и 12. В другом воплощении экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую аминокислотную последовательность V_L, выбранную из SEQ ID NOs: 7 и 15. В другом воплощении экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую константную область легкой цепи антител человека, тяжелой цепи антител человека или того и другого. В другом воплощении экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую константную область тяжелой цепи антител человека, выбранную из группы,

состоящей из SEQ ID NOs: 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 и 68.

В одном конкретном воплощении экспрессионный вектор содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую вариант одной или нескольких из вышеуказанных аминокислотных последовательностей, причем данный вариант имеет не более 25 аминокислотных модификаций, как-то не более 20, не более 15, 14, 13, 12 или 11 аминокислотных модификаций, как-то 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных модификаций типа делеций или вставок, предпочтительно замен типа консервативных замен, либо он по меньшей мере на 80% идентичен любой из указанных последовательностей, как-то по меньшей мере на 85% или на 90% или на 95%, как-то на 96% или на 97% или на 98% или на 99% идентичен вышеуказанным аминокислотным последовательностям.

Экспрессирующим вектором в контексте настоящего изобретения может быть любой подходящий вектор, включая векторы из хромосомной, нехромосомной и синтетической нуклеиновой кислоты (последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей подходящий набор контролирующих экспрессию элементов). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговые ДНК, бакуловирусы, дрожжевые плазмиды, векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, и векторы из вирусной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК). В одном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая гуманизованное антитело CD3, заключена в вектор из голой ДНК или РНК, включающий, к примеру, линейный экспрессионный элемент (как описано, к примеру, в Sykes and Johnston, *Nat Biotech* 17, 355-59 (1997)), вектор из упакованной нуклеиновой кислоты (как описано, к примеру, в US 6,077,835 и/или WO 00/70087), плазмидный вектор типа pBR322, pUC19/18 или pUC118/119, вектор из нуклеиновой кислоты минимального размера "midge" (как описано, к примеру, в Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)) или в виде осаждаемой векторной конструкции из нуклеиновой кислоты типа конструкции, осаждаемой CaPO_4^- (как описано, к примеру, в WO 00/46147, Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978) и Coram and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603 (1981)). Такие векторы из нуклеиновых кислот и их применение хорошо известны в данной области (к примеру, см. US 5,589,466 и US 5,979,772).

В одном воплощении вектор подходит для экспрессии гуманизованных антител против DR5 в бактериальной клетке. Примеры таких векторов включают экспрессионные векторы типа BlueScript (Stratagene), векторы pIN (Van Heeke & Schuster, *J Biol Chem* 264, 5503-5509 (1989)), векторы pET (Novagen, Madison, WI) и др.

С другой стороны, экспрессирующим вектором также может быть вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Можно использовать любой вектор, подхо-

дящий для экспрессии в дрожжевой системе. Подходящие векторы включают, к примеру, векторы, содержащие конститутивные или индуцируемые промоторы типа альфа-фактора, алкогольоксидазы и PGH (см. обзоры в F. Ausubel et al., Ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience, New York (1987)); и Grant et al., *Methods in Enzymol.* 153, 516-544 (1987)).

Нуклеиновая кислота и/или вектор также может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность секреции/локализации, которая может направить полипептид в виде образующейся полипептидной цепи в периплазматическое пространство или в среду для культивирования клеток. Такие последовательности известны в данной области и включают лидеры секреции или сигнальные пептиды, нацеленные на органеллы последовательности (напр., последовательности ядерной локализации, сигналы удержания в ER, транзитные последовательности митохондрий, транзитные последовательности хлоропластов), последовательности мембранной локализации/якорные последовательности (напр., последовательности останковки переноса, якорные последовательности GPI) и др.

У экспрессионного вектора по изобретению нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против DR5, и нуклеиновые кислоты первого и второго полипептида могут содержать или быть связаны с любым подходящим промотором, энхансером и другими элементами, способствующими экспрессии. Примеры таких элементов включают сильные промоторы экспрессии (напр., промотор/энхансер IE CMV человека, а также промоторы LTR RSV, SV40, SL3-3, MMTV и HIV), эффективные последовательности терминации поли(A), начало репликации для плазмидных продуктов у *E. coli*, гены устойчивости к антибиотикам в качестве отборочных маркеров и/или удобные сайты для клонирования (напр., полилинкеры). Нуклеиновые кислоты также могут содержать индуцируемые промоторы, в отличие от конститутивных промоторов типа IE CMV (квалифицированные специалисты должны понимать, что такие термины фактически являются дескрипторами степени экспрессии генов при определенных условиях).

В одном воплощении экспрессионный вектор, кодирующий антитело против DR5, располагается и/или доставляется в клетки хозяина или организм животного как вирусный вектор.

Такие экспрессионные векторы могут применяться для рекомбинантного получения антител против DR5. В одном аспекте антитела против DR5 из любого аспекта или воплощения, описанного здесь, обеспечиваются при помощи рекомбинантной эукариотической или прокариотической клетки хозяина, которая вырабатывает антитела. Соответственно, изобретением предусмотрены рекомбинантные эукариотические или

прокариотические клетки хозяина типа трансфектомы, которые вырабатывают антитела против DR5, как определено здесь.

Примеры клеток хозяина включают дрожжевые, бактериальные и клетки млекопитающих, как-то клетки CHO или HEK-293. Например, в одном воплощении клетки хозяина содержат нуклеиновую кислоту, стабильно встроенную в клеточный геном, которая содержит последовательность, кодирующую экспрессию антитела против DR5, описанного здесь. В другом воплощении клетки хозяина содержат нуклеиновую кислоту, стабильно встроенную в клеточный геном, которая содержит последовательность, кодирующую экспрессию первого или второго полипептида, описанного здесь. В другом воплощении клетки хозяина содержат невстроенную нуклеиновую кислоту типа плазмиды, космиды, фагемиды или линейного экспрессирующего элемента, которая содержит последовательность, кодирующую экспрессию антитела против DR5, первого или второго полипептида, описанных здесь.

Термин “рекомбинантная клетка хозяина” (или просто “клетка хозяина”) в настоящем изобретении служит для обозначения таких клеток, в которые был введен экспрессионный вектор. Следует иметь в виду, что такие термины служат для обозначения не только данных конкретных клеток, но и потомства таких клеток. Поскольку в последующих поколениях могут происходить определенные модификации вследствие мутаций или воздействий окружающей среды, то такое потомство на самом деле может и не быть идентичным родительской клетке, но все-таки включается в рамки термина “клетка хозяина” настоящем изобретении. Рекомбинантные клетки хозяина включают, к примеру, такие трансфектомы, как клетки CHO-S, клетки HEK-293F, клетки PER.C6, NS0, лимфоцитарные клетки, и прокариотические клетки типа *E. coli*, и другие эукариотические клетки, как-то клетки растений и грибов.

Термин “трансфектома” в настоящем изобретении охватывает рекомбинантные эукариотические клетки хозяина, экспрессирующие антитела или целевые антигены, как-то клетки CHO, клетки PER.C6, NS0, клетки HEK-293, клетки растений или грибов, в том числе, дрожжевые клетки.

В следующем аспекте изобретение касается способа получения антител по изобретению, причем данный способ включает стадии:

- a) культивирование гибридомы или клеток хозяина по изобретению, как описано выше, и
- b) извлечение и/или очистка антител по изобретению из культуральной среды.

В следующем аспекте последовательность нуклеотидов, кодирующая последова-

тельность антитела, дополнительно кодирует вторую молекулу типа терапевтического полипептида. Примеры терапевтических антител описаны здесь в другом месте. В одном воплощении изобретение касается способа получения слитого с антителом белка, причем данный способ включает стадии:

- a) культивирования клетки-хозяина, содержащей экспрессионный вектор, содержащий такую последовательность нуклеотидов, и
- b) извлечения и/или очистки слитого с антителом белка из культуральной среды.

В одном аспекте настоящего изобретения оно включает экспрессионный вектор, содержащий одну или несколько конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело в соответствии с любым воплощением, изложенным здесь.

В другом аспекте изобретения оно включает клетку-хозяина, содержащего экспрессионный вектор.

В одном воплощении изобретения клетка-хозяин представляет собой рекомбинантную клетку-хозяин, как-то рекомбинантную прокариотическую клетку, рекомбинантную эукариотическую клетку или рекомбинантную микробную клетку-хозяина.

Таблица 1. Последовательности

SEQ ID NO:	Название	Последовательность	Клон
SEQ ID NO: 1	VH hDR5-01 CDR1	GFNIKDTF	hDR5-01
SEQ ID NO: 2	VH hDR5-01 CDR2	IDPANGNT	
SEQ ID NO: 3	VH hDR5-01 CDR3	VRGLYTYFDY	
SEQ ID NO: 4	VH hDR5-01	EVQLQQSGAEVVKPGA SVKLSCKASGFNIKDTFI HWVKQAPGQGLEWIG RIDPANGNTKYDPKFQ GKATITTDTSNTAYME LSSLRSEDTAVYYCVRGL YTYFDYWGQGLTVV SS	
SEQ ID NO: 5	VL hDR5-01 CDR1	QSIENN	
	VL hDR5-01 CDR2	FAS	
SEQ ID NO: 6	VL hDR5-01 CDR3	QQGNSWPYT	
SEQ ID NO: 7	VL hDR5-01	EIVMTQSPATLSVSPGE RATLSCRASQSIENNLH WYQKPGQAPRLIKE ASQITGIPARFSGSGG TEFTLTISSLQSEDFAVY YCQQGNSWPYTFGG TKLEIK	
SEQ ID NO: 1	VH hDR5-01-G56T CDR1	GFNIKDTF	hDR5-01-G56T
SEQ ID NO: 8	VH hDR5-01-G56T CDR2	IDPANTNT	
SEQ ID NO: 3	VH hDR5-01-G56T CDR3	VRGLYTYFDY	
SEQ ID NO: 9	VH hDR5-01-G56T	EVQLQQSGAEVVKPGA	

		<u>SVKLSCKASGFNIKDTFI</u> HWVKQAPGQGLEWIG RIDPANTNTKYDPKFQG KATITTDTSNTAYMEL SSLRSED AVYYC <u>VRGL</u> <u>YTYFDYWGQGLVTV</u> SS	
SEQ ID NO: 5	VL hDR5-01-G56T CDR1	Q SIS NN	
	VL hDR5-01-G56T CDR2	FAS	
SEQ ID NO: 6	VL hDR5-01-G56T CDR3	Q QGN SWPYT	
SEQ ID NO: 7	VL hDR5-01-G56T	EIVMTQSPATLSVSPGE RATLSCRASQ SIS NNLH WYQKPGQAPRLLIKF <u>ASQ</u> SITGIPARFSGSGG TEFTLTISSLQSEDFAVY YC QGN SWPYTFGQG TKLEIK	
SEQ ID NO:10	VH hDR5-05 CDR1	GFNIKDTH	hDR5-05
SEQ ID NO: 2	VH hDR5-05 CDR2	IDPANGNT	
SEQ ID NO:11	VH hDR5-05 CDR3	ARWGTVNYFAY	
SEQ ID NO:12	VH hDR5-05	QVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGFNIKDTH MHWVRQAPGQRLEWI GRIDPANGNTEYDQKF QGRVTITVDTSASTAYM ELSSLRSED AVYYC <u>AR</u> <u>WGTVNYFAYWGQGL</u> VTVSS	
SEQ ID NO:13	VL hDR5-05 CDR1	SSVS Y	
	VL hDR5-05 CDR2	RTS	
SEQ ID NO:14	VL hDR5-05 CDR3	Q QYH SYPT	
SEQ ID NO:15	VL hDR5-05	DIQLTQSPSSLSASVGD RVTITCSASS SVSY MYW YQKPGKAPK PWI YRT <u>SN</u> LASGVPSRFSGSGG TDFTLTISSLQPEDFATY YC QYH SYPTFGGGT KVEIK	
SEQ ID NO:16	VH CONA-CDR1	GGSISSGDYF	Конатумумаб IgG1-DR5-CONA
SEQ ID NO:17	VH CONA-CDR2	IHN SG TT	
SEQ ID NO:18	VH CONA-CDR3	ARDRGGDYYYGMDV	
SEQ ID NO:19	VH CONA	QVQLQESG PGLV KPSQ <u>TL</u> SLTCTVSGGSISSGDY FWSWIRQLPGKGLECIG HIHN SG TTYYNPSL KSR VTISVDTSKKQFSLRLSS VTAADTAVYYC <u>AR</u> DRG <u>GD</u> YYYGMDVWGQGT VTVSS	
SEQ ID NO:20	VH CONA-C49W	QVQLQESG PGLV KPSQ <u>TL</u> SLTCTVSGGSISSGDY	

		<u>F</u> WSWIRQLPGKGLEW <u>I</u> GHIHNSGTTYYNPSLKS RVTISVDTSKKQFSLRLS SVTAADTAVYYC <u>AR</u> DR <u>GG</u> DYYYGMDVWGQGT TVT <u>V</u> SS	
SEQ ID NO:21	VL CONA-CDR1	QGISRSY	
	VL CONA-CDR2	GAS	
SEQ ID NO:22	VL CONA-CDR3	QQFGSSPWT	
SEQ ID NO:23	VL CONA	EIVLTQSPGTLSSLSPGER ATLSCRASQGISRSYLA WYQQKPGQAPSLLIY <u>G</u> <u>A</u> SSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAV YYC <u>QQ</u> FGSSPWTFGQG TKVEIK	
SEQ ID NO:24	DR5 человека	MEQRGQNAPAASGA RKRHGP <pre>PREARGA RPGPRV PKTLVLVVA AVLLVSAESALITQ QDLAPQQR AAPQQK RSSPSEGLCPPGHHI SEDGRDCISCKYGG DYSTHWNDLLFCLR CTRCDSGEVELSPCT TTRNTVCQEEGTFR EEDSPEMCRKCR TG CPRGMVKVGDCTPW SDIECVHKESG TKH SGEVP AVEETVTSSP GTPASPCSLSGIIGV TVA AVVLIVAVFVCK SLLWKKVLPY LKGIC SGGGGDPERVDRSS QRPGAEDNVLNEIVS ILQPTQVPEQEMEVQ EPAEPTGVNMLSPGE SEHLEPAEAERSQR RLLVPANEGDPTET LRQCFDDFADLVPFD SWEPLMRKLGLMDN EIKVAKAEAAGHRDT LYTMLIKWVNKTGR DASVHTLLDALETG ERLAKKIEDHLLSSG KFMYLEGNADSAMS</pre>	
SEQ ID NO:25	DR5 макаки-резус	MGQLRQSAPAASGA RKGRGPG <pre>PREARGA RPGLRV LKTLVLVVA AARVLSADCAPITR QSLDPQRR AAPQQK RSSPTEGLCPPGHHI SEDSRDCISCKYGG</pre>	

		DYSTHWNDFLFLCLR CTKCDSGEVEVNSC TTRNTVCQCEEGTF REEDSPEICRKCRGTG CPRGMVKVKDCTPW SDIECVHKESGTKHT GEVPAVEKTVTTSPG TPASPCSLSGIIIIGVI VFVVIVVVAVIVWKT SLWKKVLPYLKGVC SGDGGDPERVDSSP QRPGAEDNALNEIVS IVQPSQVPEQEMEV QEPAEQTDVNTLSP GESEHLLEPAKAEGP QRRGQLVPVNENDP TETLRQCFDDFAAIV PFDawePLVRQLGLT NNEIKVAKAEAASSR DTLYVMLIKWVNKT GRAASVNTLLDALET LEERLAKQKIQRLL SSGKFMYLEDNADS ATS	
SEQ ID NO:26	DR5 мыши	MEPPGSPTPTASAAA RADHYTPGLRPLPPKR RLLYSFALLLAVLQAV FVPVTANPAHNRPAG LQRPEESPSRGPCLA GQYLSEGNCKPCRE GIDYTSHSNHSLDS CILCTVCKEDKVVET RCNITTNTVCRCKPG TFEDKDSPEICQSCS NCTDGEEELTSCTPR ENRKCVSKTAWAS WHKLGLWIGLLVPV VLLIGALLVWKTGA WRQWLLCIKRGKER DPESANSVHSSLLD RQTSSTTNDNSNHNT EPGKTQKTGKKLLVP VNGNDSIDDLKFIFE YCSDIVPFDSWNRL MRQLGLTDNQIQMV KAETLVTREALYQML LKWRHQTGRSASIN HLLDALEAVEERDAM EKIEDYAVKSGRFTY QNAAAQPETGPGGS QCV	
SEQ ID NO:27	DR5ECD-FcHistag	MEQRGQNAPAASGAR	

		<p>KRHGPGPREARGARPG <u>L</u>RVPKTLVLVVAVLLLV SAESALITQQDLAPQQR <u>V</u>APQQKRSSPSEGLCPP GHHISEDGRDCISCKYG QDYSTHWNDLLFCLRC TRCDSGEVELSPCTTTR NTVCQCEEGTFREEDSP EMCRKCR TGCPRGMV KVGDC TPWSDIECVHK ESGTKHSGE<u>A</u>PAVEETV TSSPGTPASPCPKSCD KTHTCPPCPAPEAEGAP SVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTRYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTAPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKHHHHHH HHEPEA</p>	
SEQ ID NO:28	DR5ECDdelHis	<p>MEQRGQNAPAASGA RKRHGPGPREARGA RPGPRVPKTLVLVA AVLLVSAESALITQ QDLAPQQR AAPQQK RSSPSEGLCPPGHHI SEDGRDCISCKYGQ DYSTHWNDLLFCLR CTRCD SGEVELSPCT TTRNTVCQCEEGTFR EEDSPEMCRKCR TG CPRGMVKVGDCTPW SDIECVHKESGHHH HHHHH</p>	
SEQ ID NO:29	Fc IgG1m(f)	<p>STKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGF</p>	

		YPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	
SEQ ID NO:30	Fc IgG1m(z)	STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDK K VEPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	
SEQ ID NO:31	Fc IgG1m(a)	STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDK P VEPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP SR DEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	
SEQ ID NO:32	Fc IgG1m(x)	STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVK	

		<p>DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKPVPEKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCS VMHEGLHNHYTQKS LSLSPGK</p>	
SEQ ID NO:33	HC-hDR5-01	<p>EVQLQQSGAEVVKPGA SVKLSCKASGFNIKDTFI HWVKQAPGQGLEWIG RIDPANGNTKYDPKFQ GKATITTTDTSSNTAYME LSSLRSEDVAVYYCVRGL YTYYFDYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVPE KSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPP PSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHN HYTQKLSLSLSPGK</p>	
SEQ ID NO:34	HC-hDR5-01-E345K	<p>EVQLQQSGAEVVKPGA SVKLSCKASGFNIKDTFI HWVKQAPGQGLEWIG RIDPANGNTKYDPKFQ GKATITTTDTSSNTAYME LSSLRSEDVAVYYCVRGL YTYYFDYWGQGLVTV</p>	

		SSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPRK <u>PQ</u> VYTLP PSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO:35	HC-hDR5-01-E430G	EVQLQQSGAEVVKPGA SVKLSCKASG <u>FN</u> IKDTFI HWVKQAPGQGLEWIG RIDPANGNTKYDPKFQ GKATITTDTSNTAYME LSSLRSED <u>TA</u> VYYCVRGL <u>Y</u> TYFDYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMH <u>G</u> ALHN HYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO:36	HC-hDR5-01-G56T	EVQLQQSGAEVVKPGA SVKLSCKASG <u>FN</u> IKDTFI HWVKQAPGQGLEWIG RIDPANTNTKYDPKFQ KATITTDTSNTAYMEL SSLRSED <u>TA</u> VYYCVRGL <u>Y</u> TYFDYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSG	

		<p>VHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYITLP PSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK</p>	
SEQ ID NO:37	HC-hDR5-01-G56T-E345K	<p>EVQLQQSGAEVVKPGA SVKLSCKASGFNIKDTFI HWVKQAPGQGLEWIG RIDPANTNTKYDPKFQG KATITTTDTSSNTAYMEL SSLRSEDTAVYYCVRGL YTYYFDYWGQGLLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPRKPQVYITLP PSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK</p>	
SEQ ID NO:38	HC-hDR5-01-G56T-E430G	<p>EVQLQQSGAEVVKPGA SVKLSCKASGFNIKDTFI HWVKQAPGQGLEWIG RIDPANTNTKYDPKFQG KATITTTDTSSNTAYMEL SSLRSEDTAVYYCVRGL YTYYFDYWGQGLLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEP</p>	

		<p>KSCDKTHTCPPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHGALHN HYTQKSLSLSPGK</p>	
SEQ ID NO:39	LC-hDR5-01	<p>EIVMTQSPATLSVSPGE RATLSCRASQISNNLH WYQQKPGQAPRLIKE ASQSITGIPARFSGSGG TEFTLTISSLQSEDFAVY YCQQGNSWPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC</p>	
SEQ ID NO:40	HC-hDR5-05	<p>QVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGFNIKDTH MHWVRQAPGQRLEWI GRIDPANGNTEYDQKF QGRVTITVDTSASTAYM ELSSLRSEDVAVYYCAR WGTNVYFAYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
SEQ ID NO:41	HC-hDR5-05-E345K	<p>QVQLVQSGAEVKKPGA SVKVSCKASGFNIKDTH MHWVRQAPGQRLEWI</p>	

		<p> GRIDPANGNTEYDQKF QGRVTITVDTSASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAR <u>WGTNVYFAYWGQGL</u> VTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRKQVY TLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK </p>	
SEQ ID NO:42	HC-hDR5-05-E430G	<p> QVQLVQSGAEVKKKPGA SVKVSCKASGFNIKDTH MHWVRQAPGQRLEWI GRIDPANGNTEYDQKF QGRVTITVDTSASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAR <u>WGTNVYFAYWGQGL</u> VTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGL YLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHGA LHNHYTQKSLSLSPGK </p>	
SEQ ID NO:43	LC-hDR5-05	<p> DIQLTQSPSSLSASVGD RVTITCSASSVSSYMYW <u>YQKPGKAPKPIYRT</u> <u>SNLASGVPSRFSGSGSG</u> TDFTLTISLQPEDFATY YCQQYHSYPPTFGGGT </p>	

		KVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO:44	DR5 человека, K415N	MEQRGQNAPAASGAR KRHGPMPREARGARPG PRVPKTLVLVVAAVLLL VSAESALITQQDLAPQQ RAAPQQKRSSPSEGLCP PGHHISEDGRDCISCKY GQDYSTHWNDLLFCLR CTRCDSGEVELSPCTTT RNTVCQCEEGTFREEDS PEMCRKCRTGCPRGM VKVGDCTPWSIECVH KESGTKHSGEVPVEET VTSSPGTPASPCSLSGIII GVTVAAVVLIVAVFVCK SLLWKKVLPYLGICSG GGGDPERVDRSSQRPG AEDNVLNEIVSILQPTQ VPEQEMEVQEPAEPTG VNMLSPGESEHLLEPAE AERSQRRRLV PANEG DPTETLRQCFDDFADLV PFDSWEPLMRKLG LMD NEIKVAKAEAAGHRDTL YTMLIKWVNKTGRDAS VHTLLDALETGERLAN QKIEDHLLSSGKFMYLE GNADSAMS	DR5 человека с мутацией K415N
SEQ ID NO:45	DR5 человека (природный вариант) (№ доступа: AAB70578)	MEQRGQNAPAASGA RKRHGPMPREARGA RPGLRVPKTLVLVVA AVLLLVSAESALITQ QDLAPQQRVAPQQK RSSPSEGLCPPGHHI SEDGRDCISCKYGG DYSTHWNDLLFCLR CTRCDSGEVELSPCT TTRNTVCQCEEGTFR EEDSPEMCRKCRTG CPRGMVKVGDCTPW SDIECVHKESGTKH SGEAPAVEETVTSSP GTPASPCSLSGIIIGV TVAAVVLIVAVFVCK SLLWKKVLPYLGIC SGGGDPERVDRSS QRPGAEDNVLNEIVS ILQPTQVPEQEMEVQ EPAEPTGVNMLSPGE	

		SEHLEPAEAERSQR RRLVPANEGDPTET LRQCFDDFADLVPFD SWEPLM RKLGLMDN EIKVAKAEAAGHRDT LYTMLIKWVNKTGR DASVHTLLDALETG ERLAKQKIEDHLLSS GKFMYLEGNADSAMS	
SEQ ID NO:46	DR5 человека (Uniprot 014763)	MEQRGQNAPAASGA RKRHGPGPREARGA RPGPRVPKTLVLVVA AVLLVSAESALITQ QDLAPQQRAPQK RSSPSEGLCPPGHHI SEDGRDCISCKYGQ DYSTHWNDLLFCLR CTRCDSGEVELSPCT TTRNTVCQCEGTFR EEDSPEMCRKCRGTG CPRGMVKVGDCTPW SDIECVHKESGTKH SGEVPAVEETVTSSP GTPASPCSLSGIIGV TVAAVVLIVAVFVCK SLLWKKVLPYKLGIC SGGGGDPERVDRSS QRPGAEDNVLNEIVS ILQPTQVPEQEMEVQ EPAEPTGVNMLSPGE SEHLEPAEAERSQR RRLVPANEGDPTET LRQCFDDFADLVPFD SWEPLMRKLGLMDN EIKVAKAEAAGHRDT LYTMLIKWVNKTGR DASVHTLLDALETG ERLAKQKIEDHLLSS GKFMYLEGNADSAMS	
SEQ ID NO:47	DR5del-K386N человека	MEQRGQNAPAASGA RKRHGPGPREARGA RPGPRVPKTLVLVVA AVLLVSAESALITQ QDLAPQQRAPQK RSSPSEGLCPPGHHI SEDGRDCISCKYGQ DYSTHWNDLLFCLR CTRCDSGEVELSPCT TTRNTVCQCEGTFR EEDSPEMCRKCRGTG CPRGMVKVGDCTPW SDIECVHKESGIIGV	

		<p>TVAAVVLIVAVFVCK SLLWKKVLPYLK GIC SGGGGDPERVDRSS QRPGAEDNVLNEIVS ILQPTQVPEQEMEVQ EPAEPTGVNMLSPGE SEHLLPEAEAERSQR RRLVLPANEGDPTET LRQCFDDFADLVPFD SWEPLMRKLGMDN EIKVAKAEAAGHRDT LYTMLIKWVNKTGR DASVHTLLDALET LG ERLANQKIEDHLLSS GKFMYLEGNADSAMS</p>	
SEQ ID NO:48	DR5 макаки- крабоеда (NCBI XP_005562887,1)	<p>MGQLRQSAPAASGA RKGRGPGPREARGA RPGLRVLKTLLVVA AARVLLSVSADCAPI TRQSLDPQRRAPQ QKRSSPTEGLCPPG HHISEDSRECISCKY GQDYSTHWNDFLFC LRCTKCDSGEVEVN SCTTTRNTVCQCEE GTFREEDSPEICRKC RTGCPRGMVKVKDC TPWSDIECVHKESG TKHTGEVPAVEKTVT TSPGTPASPCSLSGII IGVIVLVVIVVVAVIV WKTSWKKVLPYLK GVCSSGGGDPERVD SSSHSPQRPGAEDN ALNEIVSIVQPSQVP EQEMEVQEPAEQTD VNTLSPGESEHLLPE AKAEGPQRRGQLVP VNENDPTETLRQCFD DFAAIVPFDWEPLV RQLGLTNNEIKVAKA EAASSRDTLYVMLIK WVNKTGRAASVNTL LDALETLEERLAKQK IQDRLLSSGKFMYLE DNADSATS</p>	
SEQ ID NO:49	DR5-K420N макаки- крабоеда	<p>MGQLRQSAPAASGA RKGRGPGPREARGA RPGLRVLKTLLVVA AARVLLSVSADCAPI TRQSLDPQRRAPQ QKRSSPTEGLCPPG</p>	

		HHISEDSRECISCKY GQDYSTHWNDFLFC LRCTKCDSGEVEVN SCTTTRNTVCQCEE GTFREEDSPEICRKC RTGCPRGMVKVKDC TPWSDIECVHKESG TKHTGEVPAVEKTVT TSPGTPASPCSLSGII IGVIVLVVIVVVAVIV WKTSWKKVLPYLK GVCSSGGGGDPERVD SSSHSPQRPGAEDN ALNEIVSIVQPSQVP EQEMEVQEPAEQTD VNTLSPGESEHLLEP AKAEGPQRRGQLVP VNENDPTETLRQCFD DFAAIVPFDAWEPLV RQLGLTNNEIKVAKA EAASSRDTLYVMLIK WVNKTGRAASVNTL LDALETLEERLANQK IQDRLLSSGKFMYLE DNADSATS	
SEQ ID NO:50	DR5Mfdel-K420N макаки-крабoeda	MGQLRQSAPAASGA RKGRGPGPREARGA RPGLRVLKTLLVVA AARVLLSVSADCAPI TRQSLDPQRRAPQ QKRSSPTEGLCPPG HHISEDSRECISCKY GQDYSTHWNDFLFC LRCTKCDSGEVEVN SCTTTRNTVCQCEE GTFREEDSPEICRKC RTGCPRGMVKVKDC TPWSDIECVHKESGI IIGVIVLVVIVVVAVI VWKTSWKKVLPYL KGVCSGGGGDPERV DSSSHSPQRPGAED NALNEIVSIVQPSQV PEQEMEVQEPAEQT DVNTLSPGESEHLLE PAKAEGPQRRGQLV PVNENDPTETLRQCF DDFAAIVPFDAWEPL VRQLGLTNNEIKVAK AEAASSRDTLYVMLI KWVNKTGRAASVNT LLDALETLEERLANQ	

		KIQDRLLSSGKFMYLE DNADSATS	
SEQ ID NO:51	VH chTRA8 CDR1	GFTFSSYV	
SEQ ID NO:52	VH chTRA8 CDR2	ISSGGSYT	
SEQ ID NO:53	VH chTRA8 CDR3	ARRGDSMITTDY	
SEQ ID NO:54	VL chTRA8 CDR1	QDVGTA	
	VL chTRA8 CDR2	WAS	
SEQ ID NO:55	VL chTRA8 CDR3	QQYSSYRT	
SEQ ID NO:56	HC-chTRA8	EVMLVESGGGLVKP GGSLKLSCAASGFT FSSYVMSWVROTPE KRLEWVATISSGGS YTYYPDSVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMSS LRSEDAMYYCARR GDSMITTDYWGQG TTLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSVHT FPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGFSF FLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO:57	LC-chTRA8	DIVMTQSHKFMSTS VGDRVSITCKASQD VGTAVAWYOOKPG QSPKLLIYWASTRH TGVPDRFTGSGSGT DFTLTISNVQSEDLA DYFCQQYSSYRTFG GGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLKADY	

		EKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	
SEQ ID NO:58	Fc IgG1m(f)-E430G	STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCS VMHGALHNHYTQKS LSLSPGK	
SEQ ID NO:59	Fc IgG1m(f)-E345K	STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISK AKGQPR <u>K</u> PQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	
SEQ ID NO:60	Fc IgG1m(f)-S440Y	STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS	

		SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKY LSLSPGK	
SEQ ID NO:61	Fc IgG1m(f)-E430G-K439E	STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCS VMHGALHNHYTQES LSLSPGK	
SEQ ID NO:62	Fc IgG1m(f)-E430G-S440K	STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD	

		<p>VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFIYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCS VMHGALHNHYTQK<u>K</u> LSLSPGK</p>	
SEQ ID NO:63	Fc IgG1m(f)-K409R	<p>STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFIYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYS<u>R</u>LTVD KSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKS LSLSPGK</p>	
SEQ ID NO:64	Fc IgG1m(f)-K409R-E345K	<p>STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAIEKTISK AKGQPR<u>K</u>PQVYTLPP</p>	

		<p>SREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYS<u>R</u>LTVD KSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKS LSLSPGK</p>	
SEQ ID NO:65	Fc IgG1m(f)-K409R-E430G	<p>STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYS<u>R</u>LTVD KSRWQQGNVFSCS VMH<u>G</u>ALHNHYTQKS LSLSPGK</p>	
SEQ ID NO:66	Fc IgG1m(f)-F405L	<p>STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVL DSDGSF<u>L</u>LYSKLTVD KSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKS</p>	

SEQ ID NO:67	Fc IgG1m(f)-F405L-E345K	LSLSPGK STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWSNG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISK AKGQPR <u>K</u> PQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVL DSDGSF <u>L</u> LYSKLTVD KSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	
SEQ ID NO:68	Fc IgG1m(f)-F405L-E430G	STKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWSNG ALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVL DSDGSF <u>L</u> LYSKLTVD KSRWQQGNVFSCS VM <u>H</u> GALHNHYTQKS LSLSPGK	

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Конструкции антител и антигенов

Экспрессионные конструкции для DR5

Создавали оптимизированные по кодомам конструкции для экспрессии полно-размерных белков DR5 человека (SEQ ID NO 46), макаки-резус (SEQ ID NO 25) и мыши (SEQ ID NO 26) на основе доступных последовательностей: DR5 человека (*Homo sapiens*) (Genbank, № доступа NP_003833, UniprotKB/Swiss-Prot 014763-1), DR5 макаки-резус (*Macaca mulatta*) (Genbank, № доступа EHH28346), DR5 мыши (*Mus musculus*) (UniprotKB/Swiss-Prot Q9QZM4). Для картирования областей связывания антител против DR5 (как описано в примере 6) получали следующие химерные конструкции DR5 человек-мышь, а именно DR5 человека, в котором следующие части, соответственно, были заменены соответствующими последовательностями DR5 мыши (номера относятся к последовательности человека): конструкция А - а.к. 56-68, конструкция В - а.к. 56-78, конструкция С - а.к. 69-78, конструкция D - а.к. 79-115, конструкция Е - а.к. 79-138, конструкция F - а.к. 97-138, конструкция G - а.к. 139-166, конструкция H - а.к. 139-182, конструкция I - а.к. 167-182, конструкция J - а.к. 167-210, конструкция K - а.к. 183-210. В домен смерти DR5 человека (SEQ ID NO 44) вводили мутацию K415N, инактивирующую функциональность. Кроме того, создавали оптимизированные по кодомам конструкции для внеклеточного домена (ECD) DR5 человека с С-концевым тегом His: DR5ECD-FcHistag (SEQ ID NO 27) и DR5ECDdelHis (SEQ ID NO 28). Все конструкции содержали подходящие рестрикционные сайты для клонирования и оптимальную последовательность Kozak (GCCGCCACC). Конструкции клонировали в экспрессионный вектор pсDNA3.3 для млекопитающих (Invitrogen).

Экспрессионные конструкции для антител

Для экспрессии антител последовательности V_H и V_L , как описано ранее, из химерных антител к DR5 человек/мышь DR5-01 и DR5-05 (на основе EP 2684896A1) и их гуманизованных вариантов hDR5-01 и hDR5-05 (на основе WO 2014/009358) клонировали в экспрессионные векторы (pсDNA3.3), содержащие соответствующие константные области HC и LC. Требуемые мутации вводили либо путем синтеза гена, либо с помощью направленного мутагенеза.

В некоторых примерах использовали контрольные антитела против DR5, которые были описаны ранее. IgG1-CONA (на основе US 7521048 B2 и WO 2010/138725) и IgG1-chTRA8 (на основе EP 1506285B1 и US 7244429B2) клонировали в соответствующие экспрессирующие антитела векторы, как описано выше.

В некоторых примерах в качестве отрицательного контроля использовали человеческое IgG1-антитело IgG1-b12, специфичное к gp120 (Barbas et al., J Mol Biol. 1993 Apr 5, 230(3): 812-23).

Краткосрочная экспрессия

Антитела экспрессировали в виде IgG1,κ. Клетки Expi293F (Life Technologies, USA) подвергали краткосрочной трансфекции смесью плазмидных ДНК, кодирующих тяжелые и легкие цепи антител, с помощью 293fectin (Life Technologies), в основном как описано Vink et al. (Vink et al., Methods, 65(1), 5-10, 2014).

Мембранные белки экспрессировали в клетках Freestyle CHO-S (Life Technologies) с помощью реагента Freestyle Max, как описано изготовителем.

Очистка и анализ белков

Антитела очищали методом хроматографии с иммобилизованным белком G. Рекомбинантные белки с His-тегом очищали методом аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом. Партии белков подвергали анализу различными биоаналитическими методами, включая SDS-PAGE, эксклюзионную хроматографию и измерение уровня эндотоксина.

Получение биспецифических антител

Биспецифические антитела IgG1 получали путем обмена Fab-плеча в контролируемых восстановительных условиях. Основой этого метода является использование комплементарных доменов C_H3, которые способствуют образованию гетеродимеров при определенных условиях анализа, как описано в WO 02011/131746. Для получения пар антител с комплементарными доменами C_H3 в антитела IgG1 против DR5 вводили мутации F405L и K409R (по нумерации EU). Мутацию F405L вводили в IgG1-DR5-05 и IgG1-DR5-05-E430G, а мутацию K409R вводили в IgG1-DR5-01 и IgG1-DR5-01-E430G. Для получения биспецифических антител два исходных комплементарных антитела, каждое при конечной концентрации 0,5 мг/мл, инкубировали с 75 мМ 2-меркаптоэтиламина-HCl (2-MEA) в общем объеме 100 мкл TE при 31°C в течение 5 ч. Реакцию восстановления останавливали путем удаления восстановителя 2-MEA с помощью spin-колонок (центрифужные фильтры Microcon, 30k, Millipore) в соответствии с методикой изготовителя. При этом получали биспецифические антитела IgG1-DR5-01-K409R × IgG1-DR5-05-F405L (bsAb DR5-01-K409R × DR5-05-F405L) и IgG1-DR5-01-K409R-E430G × IgG1-DR5-05-F405L-E430G (bsAb DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G).

Мутация K409R и/или мутация F405L не влияет на связывание антитела с соответствующим антигеном. Так, мутация K409R и/или мутация F405L не влияет на связывание антител против DR5 с DR5.

Пример 2. Уровни экспрессии DR5 в различных линиях раковых клеток человека

Для различных линий раковых клеток человека определяли плотность DR5 на 1 кле

тку методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью набора QIFIKIT (DAKO, кат. № K0078) с мышинным моноклональным антителом В-К29 (Diaclone, кат. № 854.860.000). Клетки собирали посредством трипсинизации и пропускали через сетчатый фильтр. Клетки осаждали центрифугированием 5 мин при 1200 об/мин, промывали PBS и ресуспендировали при концентрации 2×10^6 клеток/мл. Дальнейшие операции выполняли при 4°C. По 50 мкл одноклеточных суспензий (100 000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные круглодонные планшеты из полистирола (Greiner Bio-One, кат. № 650101). Клетки осаждали центрифугированием в течение 3 мин при $300 \times g$ и ресуспендировали в 50 мкл образца антител или изотипного контрольного образца IgG1 мыши (BD/Pharmlingen, кат. № 555746) при насыщающей концентрации 10 мкг/мл. После инкубации 30 мин при 4°C клетки осаждали и ресуспендировали в 150 мкл буфера FACS (PBS + 0,1% масс. бычьего сывороточного альбумина (BSA) + 0,02% масс. азида натрия). В лунки добавляли установочные и калибровочные шарики в соответствии с инструкциями производителя. Клетки и шарики параллельно промывали еще два раза 150 мкл буфера FACS и ресуспендировали в 50 мкл конъюгированного с FITC козьего антитела против IgG мыши (1/50, DAKO, кат. № F0479). Вторичное антитело инкубировали в течение 30 мин при 4°C с защитой от света. Клетки и шарики дважды промывали 150 мкл буфера FACS и ресуспендировали в 150 мкл буфера FACS. Измеряли иммунофлуоресценцию на приборе FACS Canto II (BD Biosciences), регистрируя 10 000 событий в популяции жизнеспособных клеток. Для расчета калибровочной кривой использовали среднее геометрическое интенсивности флуоресценции калибровочных гранул, которая выходила из нуля по интенсивности и концентрации с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, США). Для каждой линии клеток вычисляли связывающую способность антитела (ABC), т.е. оценку количества молекул DR5, экспрессированных на плазматической мембране, используя среднее геометрическое интенсивности флуоресценции у окрашенных антителом к DR5 клеток, исходя из уравнения калибровочной кривой (интерполяция неизвестных по стандартной кривой с помощью GraphPad). Как правило, у исследуемых клеточных линий экспрессия DR5 на поверхности клеток была низкой или умеренной. На основании этих данных клеточные линии подразделяли согласно низкой экспрессии DR5 (ABC <10000) или умеренной экспрессии DR5 (ABC > 10000). У линий раковых клеток НСТ-15 (ATCC, CCL-225), НТ-29 (ATCC, НТВ-38) и SW480 (ATCC, CCL-228) толстой кишки, ВхРС-3 (ATCC, CRL-1687), НРАФ-II (ATCC, CRL-1997) и PANC-1 (ATCC, CRL-1469) поджелудочной железы и А549 (ATCC, CCL-185) и SK-MES-1 (ATCC, НТВ-58) легких экспрессия DR5 оказалась низкой (диапазон ABC по QIFIKIT: 3081-8411). У линий раковых клеток COLO 205 (ATCC, CCL-222™) и НСТ 116 (ATCC, CCL-247) толстой

кишки, A375 кожи (ATCC, CRL-1619) и SNU-5 (ATCC, CRL-5973) желудка экспрессия DR5 оказалась умеренной (диапазон ABC по QIFIKIT: 10777-21262).

Пример 3. Связывание гуманизованных антител DR5-01 и DR5-05 с клетками НСТ 116

Гуманизованные антитела hDR5-01 и hDR5-05 описаны в патентной заявке WO 02014/009358. Анализировали связывание очищенных антител IgG1-hDR5-01-K409R и IgG1-hDR5-05-F405L с DR5-положительными раковыми клетками толстой кишки НСТ 116 и сравнивали со связыванием химерных антител IgG1-DR5-01-K409R и IgG1-DR5-05-F405L методом FACS. Для приготовления одноклеточных суспензий адгезированные клетки НСТ 116 дважды промывали PBS (B.Braun, кат. № 3623140), а затем инкубировали с Trypsin 1x/EDTA 0,05% в течение 2 мин при 37°C. Добавляли 10 мл среды [среда МакКой 5А с L-глутамином и HEPES (Lonza, кат. № BE12-168F) + 10% бычьей сыворотки с железом (Life Technologies, кат. № 10371-029) + 100 ед. пенициллина/100 ед. стрептомицина (Lonza, кат. № DE17-603E)], а затем осаждали клетки центрифугированием 5 мин при 1200 об/мин. Клетки ресуспендировали в 10 мл среды, опять осаждали центрифугированием 5 мин при 1200 об/мин и ресуспендировали в буфере FACS при концентрации $1,0 \times 10^6$ клеток/мл. Дальнейшие операции выполняли при 4°C. По 100 мкл клеточных суспензий (100 000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные круглодонные планшеты из полистирола (Greiner Bio-One, кат. № 650101) и осаждали центрифугированием при $300 \times g$ в течение 3 мин при 4°C. Клетки ресуспендировали в 100 мкл серийного разведения препарата антител (диапазон от 0 до 10 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и инкубировали 30 мин при 4°C. Клетки осаждали центрифугированием при $300 \times g$ в течение 3 мин при 4°C и дважды промывали 150 мкл буфера FACS. Клетки инкубировали с 50 мкл вторичного антитела – конъюгированного с R-фикоэритрином (R-PE) козьего антитела против IgG-F(ab')₂ человека (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-116-098, 1/100) в течение 30 мин при 4°C с защитой от света. Клетки дважды промывали 150 мкл буфера FACS, ресуспендировали в 150 мкл буфера FACS и анализировали связывание антител на приборе FACS Canto II (BD Biosciences), регистрируя 10 000 событий. Кривые связывания анализировали методом нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Как видно из фиг. 2, гуманизованные антитела IgG1-hDR5-01-K409R и IgG1-hDR5-05-F405L проявляли такие же кривые связывания, как и соответствующие химерные антитела IgG1-DR5-01-K409R или IgG1-DR5-05-F405L, соответственно. Гуманизация не влияла на связывание антител к DR5.

Пример 4. Введение усиливающей гексамеризацию мутации не влияет на связывание химерных антител DR5-01 и DR5-05 и биспецифического антитела DR5-01×DR5-05 с DR5-положительными раковыми клетками толстой кишки человека

Анализировали связывание очищенных вариантов антител IgG1-DR5-01-K409R, IgG1-DR5-05-F405L и биспецифического антитела IgG1-DR5-01-K409R×IgG1-DR5-05-F405L (bsAb DR5-01-K409R×DR5-05-F405L) с усиливающей гексамеризацию мутацией (E430G или E345K) и без нее с раковыми клетками толстой кишки человека COLO 205 методом FACS. Клетки собирали путем объединения супернатантов культур, содержащих неадгезированные клетки и трипсинированные адгезированные клетки COLO 205. Клетки центрифугировали 5 минут при 1200 об/мин и ресуспендировали в 10 мл культуральной среды [RPMI 1640 с 25 mM Hepes и L-глутамином (Lonza, кат. № BE12-115F) + 10% бычьей сыворотки с железом (Life Technologies, кат. № 10371-029) + 50 ед. пенициллина/50 ед. стрептомицина (Lonza, кат. № DE17-603E)]. Клетки подсчитывали, снова центрифугировали и ресуспендировали в буфере FACS при концентрации $0,3 \times 10^6$ клеток/мл. Дальнейшие операции выполняли при 4°C. По 100 мкл клеточных суспензий (30 000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные круглодонные планшеты из полистирола и осаждали центрифугированием при $300 \times g$ в течение 3 мин при 4°C. Клетки ресуспендировали в 50 мкл серийного разведения препарата антител (диапазон конечных концентраций от 0 до 10 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и инкубировали 30 минут при 4°C. Планшеты центрифугировали при $300 \times g$ в течение 3 мин при 4°C и дважды промывали клетки 150 мкл буфера FACS. Клетки инкубировали с 50 мкл вторичного антитела – конъюгированного с R-PE козьего антитела против IgG-F(ab')₂ человека (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-116-098, 1/100) в течение 30 мин при 4°C с защитой от света. Клетки дважды промывали 150 мкл буфера FACS, ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS и анализировали связывание антител на приборе FACS Canto II (BD Biosciences), регистрируя 5000 событий. Кривые связывания анализировали методом нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Из фиг. 3А видно, что антитела IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-01-K409R-E345K проявляли такое же дозозависимое связывание с раковыми клетками COLO 205 толстой кишки человека, как и IgG1-DR5-01-K409R. Из фиг. 3В видно, что антитела IgG1-DR5-05-F405L-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E345K проявляли такое же дозозависимое связывание с клетками COLO 205, как и IgG1-DR5-05-F405L. Из фиг. 3С видно, что bsAb DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G и bsAb DR5-01-K409R-E345K × DR5-05-F405L-E345K проявляли такое же дозозависимое связывание с клетками COLO 205, как и

bsAb DR5-01-K409R × DR5-05-F405L. Эти данные показывают, что введение усиливающих гексамеризацию мутаций E430G или E345K не влияло на связывание антител IgG1-DR5-01-K409R, IgG1-DR5-05-F405L и bsAb DR5-01-K409R × DR5-05-F405L с DR5-положительными клетками COLO 205.

Пример 5. Связывание химерных антител DR5-01 и DR5-05 с DR5 макаки-резус

Анализировали связывание очищенного IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G с клетками CHO, экспрессирующими DR5 макаки-резус или DR5 человека (описаны в Примере 1), методом FACS. За 1 день до анализа FACS клетки CHO подвергали краткосрочной трансфекции вектором, кодирующим DR5 макаки-резус, DR5 человека или некодирующим вектором (холостым). Для приготовления одноклеточных суспензий клетки промывали PBS и ресуспендировали в буфере FACS при концентрации $1,0 \times 10^6$ клеток/мл. Дальнейшие операции выполняли при 4°C. По 75 мкл клеточных суспензий (75 000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные круглодонные планшеты из полистирола и осаждали центрифугированием при $300 \times g$ в течение 3 мин при 4°C. Клетки ресуспендировали в 50 мкл серийного разведения препарата антител (диапазон от 0 до 10 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и инкубировали 30 минут при 4°C. Планшеты центрифугировали при $300 \times g$ в течение 3 мин при 4°C и дважды промывали клетки 150 мкл буфера FACS. Клетки инкубировали с 50 мкл вторичного антитела – конъюгированного с R-PE козьего антитела против IgG-F(ab')₂ человека (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-116-098, 1/100) в течение 30 мин при 4°C с защитой от света. Клетки дважды промывали 150 мкл буфера FACS, ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS и анализировали связывание антител на приборе FACS Canto II (BD Biosciences), регистрируя 100000 событий. Кривые связывания анализировали методом нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Из фиг. 4 видно, что антитела IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G проявляли дозозависимое связывание с DR5 макаки-резус, экспрессированным на клетках CHO. Связывание с клетками CHO, трансфецированными DR5 человека, и с клетками, подвергнутыми ложной трансфекции, тестировали в качестве положительного и отрицательного контроля, соответственно. Для IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G значения EC₅₀ для связывания с DR5 человека и DR5 макаки-резус были в одном и том же диапазоне ([0,014-0,023 мкг/мл] и [0,051-0,066 мкг/мл], соответственно, указывая на то, что IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G проявляют сопоставимое связывание с DR5 человека и макаки-резус.

Пример 6. Картирование областей связывания антител DR5-01 и DR5-05 с DR5 человека с использованием молекул DR5 с заменой доменов

Аминокислотные последовательности внеклеточных доменов DR5 человека и мыши проявляют ограниченную гомологию (фиг. 5A), а гуманизованные антитела IgG1-hDR5-01-F405L и IgG1-hDR5-05-F405L не связываются с DR5 мыши (фиг. 5C,D). С целью идентификации аминокислотных отрезков во внеклеточном домене DR5 человека, участвующих в связывании антител, мы разработали 11 химерных молекул DR5 человек-мышь, в которых определенные домены DR5 человека были заменены мышинными аналогами (молекулы DR5 с заменой доменов, описанные в примере 1), как показано на фиг. 5B. Варианты DR5 с заменой доменов подвергали краткосрочной экспрессии на клетках CHO. Потеря связывания у антител к DR5 с молекулами DR5 с заменой доменов указывает на то, что заменяемый домен DR5 человека содержит одну или несколько аминокислот, имеющих решающее значение для связывания. И наоборот, сохранность связывания антител к DR5 с молекулами DR5 с заменой доменов означает, что заменяемый домен DR5 человека не содержит аминокислот, имеющих решающее значение для связывания. Для анализа связывания промывали 3×10^6 трансфицированных клеток и ресуспендировали в 3 мл буфера FACS. Вносили по 100 мкл клеточной суспензии на лунку (100000 клеток на лунку) в 96-луночные круглодонные планшеты (Greiner Bio-One, кат. № 650101). Дальнейшие операции выполняли при 4°C. Клетки осаждали, ресуспендировали в 50 мкл образца антител к DR5 (конечная концентрация 10 мкг/мл) и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Клетки дважды промывали и инкубировали с 50 мкл вторичного антитела – конъюгированного с R-PE козьего антитела против IgG-F(ab')₂ человека (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-116-098, 1/100) в течение 30 мин при 4°C с защитой от света. Клетки дважды промывали, ресуспендировали в 120 мкл буфера FACS и проводили анализ на приборе FACS Canto II (BD Biosciences). Наносили на график процент жизнеспособных PE-положительных клеток с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Для каждой молекулы DR5 с заменой доменов проверяли поверхностную экспрессию с помощью комплекта антител к DR5, направленных против разных эпитопов (не показано). В качестве отрицательного контроля на связывание включали не связывающееся с мишенью антитело IgG1-b12 против gp120. Из фиг. 5C видно, что IgG1-hDR5-01-F405L проявлял потерю связывания с конструкциями E (79-138), F (97-138), G (139-166) и H (139-182), тогда как связывание с конструкциями A-D (охватывающими последовательность 56-115 DR5 человека) и I-K (охватывающими последовательность 167-210 DR5 человека) сохранялось. В целом эти данные означают, что участки аминокислот 116-138 и 139-166 содержат одну или несколько аминокислот, необходимых для связывания IgG1-hDR5-01-F405L

с DR5 человека. Из фиг. 5D видно, что IgG1-hDR5-05-F405L проявлял потерю связывания с конструкциями D (79-115), E (79-138) и F (97-138), тогда как связывание с конструкциями A-C (охватывающими последовательность 56-78 DR5 человека) и G-K (охватывающими последовательность 139-210 DR5 человека) сохранялось. В целом эти данные означают, что участок аминокислот 79-138 содержит одну или несколько аминокислот, необходимых для связывания IgG1-hDR5-05-F405L с DR5 человека.

Пример 7. Перекрестное блокирование по ELISA с антителами DR5-01 и DR5-05

Измеряли конкуренцию между гуманизованными антителами DR5-01 и DR5-05 за связывание с внеклеточным доменом DR5 методом “сэндвич”-анализа связывания в виде ферментного иммуносорбентного “сэндвич”-анализа (ELISA), как описано в этом примере, и методом интерферометрии Bio-Layer (BLI) на установке ForteBio Octet® HTX (данные не приводятся). Для ELISA 96-луночные плоскодонные планшеты для ELISA (Greiner Bio-One, кат. № 655092) покрывали антителами к DR5 (IgG1-hDR5-01-E430G или IgG1-hDR5-05-E430G) по 2 мкг/мл в 100 мкл PBS в течение ночи при 4°C. Лунки блокировали добавлением 200 мкл PBSA [PBS/1% бычьего сывороточного альбумина (BSA; Roche, кат. № 10735086001)] и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Лунки промывали три раза PBST [PBS/0,05% Tween-20 (Sigma-Aldrich, кат. № 63158)]. Затем добавляли DR5ECD-FcHistag (SEQ ID 27) (конечная концентрация 0,2 мкг/мл) и конкурирующее антитело (конечная концентрация 1 мкг/мл) в общем объеме 100 мкл PBSTA (PBST/0,2% BSA) и инкубировали 1 час при комнатной температуре со встряхиванием. После трехкратной отмывки PBST лунки инкубировали на качалке для ELISA с биотинилированным антителом против гистидинового метки (R&D Systems, кат. № BAM050, 1:2000) в 100 мкл PBSTA в течение 1 часа при комнатной температуре. После трехкратной отмывки PBST лунки инкубировали с помеченной стрептавидином Poly-HRP (Sanquin, кат. № M2032, 1:10000) в PBSTA в течение 20 мин при комнатной температуре на качалке для ELISA. После трехкратной отмывки PBST реакцию визуализировали путем инкубации с 100 мкл 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты [ABTS; Roche, кат. № 11112597001]) в течение 30 мин при комнатной температуре с защитой от света. Реакцию с субстратом останавливали добавлением равного объема 2% щавелевой кислоты. Измеряли флуоресценцию при 405 нм на считывающем устройстве для ELISA (BioTek ELx808 Absorbance Microplate Reader). На фиг. 6 представлена конкурентное связывание, выраженное в виде процента ингибирования связывания DR5ECD-FcHistag с покрывающим антителом в присутствии конкурирующего антитела относительно связывания DR5ECD-FcHistag в отсутствие конкурирующего антитела (% ингибирования

= 100 – [(связывание в присутствии конкурирующего антитела/связывание в отсутствие конкурирующего антитела)] × 100). Связывание DR5ECD-FcHistag с фиксированным IgG1-hDR5-01-E430G не ингибировалось в присутствии растворимого IgG1-hDR5-05-E430G. И наоборот, связывание DR5ECD-FcHistag с фиксированным IgG1-hDR5-05-E430G также не ингибировалось в присутствии растворимого IgG1-hDR5-01-E430G. Эти данные показывают, что IgG1-hDR5-01-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G не конкурируют друг с другом за связывание с DR5ECD-FcHistag, свидетельствуя о том, что они распознают различные эпитопы во внеклеточном домене DR5 человека. Эти данные подтверждали методом BLI, используя классический “сэндвич”-анализ, в котором IgG1-hDR5-01-F405L или IgG1-hDR5-05-F405L (20 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия, pH 6,0, ForteBio, кат. № 18-1070) иммобилизовали на аминоктивных биосенсорах второго поколения (ForteBio, кат. № 18-5092). Затем биосенсоры инкубировали с DR5ECDdelHis (SEQ ID 28) (100 нМ в разбавителе образцов, ForteBio, кат. № 18-1048) и анализировали связывание конкурирующего антитела (5 мкг/мл в разбавителе образцов) (данные не приводятся).

Пример 8. Введение усиливающей гексамеризацию мутации повышает эффективность индуцирования клеточной смерти антителами DR5-01 и DR5-05 и их комбинацией

Для изучения эффекта усиливающей гексамеризацию мутации E430G в IgG1-DR5-01-K409R и IgG1-DR5-05-F405L на способность антител к уничтожению раковых клеток COLO 205 и НСТ 116 толстой кишки человека проводили анализ жизнеспособности. Антитела тестировали в виде единственного средства и в виде комбинации антител DR5-01 и DR5-05. Клетки COLO 205 собирали путем объединения супернатантов культур, содержащих неадгезированные клетки и трипсинизированные адгезивные клетки. Клетки НСТ 116 собирали посредством трипсинизации. Клетки пропускали через сетчатый фильтр, осаждали центрифугированием 5 мин при 1200 об/мин, промывали PBS и ресуспендировали в культуральной среде при концентрации $0,5 \times 10^5$ клеток/мл. По 100 мкл одно-клеточных суспензий (5000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты из полистирола (Greiner Bio-One, кат. № 655182). Добавляли 50 мкл серийного разведения препарата антител (диапазон конечных концентраций от 0,05 до 20000 нг/мл в 5-кратных разведениях) и инкубировали 3 дня при 37°C. В образцах, которые обрабатывали комбинацией двух антител, общая концентрация антител при анализе была такой же, как и в образцах, которые обрабатывали одиночными антителами. В качестве положительного контроля клетки инкубировали с 5 мкМ стауроспорина (Sigma Aldrich, кат. № S6942). Жизнеспособность культивируемых клеток определяли с помощью набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega, кат. № G7571), в

котором определяется наличие АТФ, который является индикатором метаболически активных клеток. Добавляли из набора 20 мкл рабочего раствора люциферина на лунку и перемешивали путем встряхивания планшета в течение 2 мин при 500 об/мин. Затем планшеты инкубировали 1,5 часа при 37°C. По 100 мкл супернатанта переносили в белые планшеты OptiPlate-96 (Perkin-Elmer, кат. № 6005299) и измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (Perkin-Elmer). Данные анализировали и строили графики методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. На фиг. 7 представлено содержание жизнеспособных клеток, которое рассчитывали по следующей формуле: % жизнеспособных клеток = [(люминесценция образца с антителом – люминесценция образца со стауроспорином)/(люминесценция образца без антитела – люминесценция образца со стауроспорином)] × 100.

Из фиг. 7 видно, что введение мутации E430G повышает эффективность химерных антител IgG1-DR5-01-K409R и IgG1-DR5-05-F405L на клетках COLO 205 (A) и HCT 116 (B). Комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G была более эффективной, чем каждое антитело само по себе, и более эффективной, чем комбинация антител без мутации E430G. Комбинация IgG1-DR5-01-K409R и IgG1-DR5-05-F405L была более эффективной, чем каждое антитело само по себе. Эти данные показывают, что введение усиливающей гексамеризацию мутации E430G приводит к усилению гибели клеток при связывании химерных антител DR5 01 и 05 как в виде отдельных антител, так и в комбинации, причем комбинация является наиболее эффективной.

Пример 9. Комбинирование двух неперекрестных антител к DR5 с усиливающими гексамеризацию мутациями приводит к усилению гибели клеток мишени

В примере 8 показано, что комбинирование двух неперекрестных антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G против DR5 с усиливающими гексамеризацию мутациями приводит к усилению гибели клеток раковых линий по сравнению с эффективностью отдельных антител. Здесь сравнивается эффективность двух неперекрестных и двух перекрестных антител против DR5. Для изучения способности комбинации антитела IgG1-chTRA8-F405L-E430G с неперекрестным антителом IgG1-DR5-01-K409R-E430G либо с перекрестным антителом IgG1-DR5-05-F405L-E430G индуцировать гибель раковых клеток HCT 116 толстой кишки в сравнении с одиночными антителами проводили анализ жизнеспособности. Проводили ELISA с перекрестным блокированием для антител IgG1-chTRA8-F405L и IgG1-DR5-05-F405L, как описано в примере 7, и проверяли методом “сэндвич”-анализа связывания на установке Octet® HTX (данные не приводятся). Анализ жизнеспособности на клетках HCT 116 проводили, как описано в примере

8, с серийным разведением антител в диапазоне конечных концентраций от 0,00005 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях. Из фиг. 8 видно, что эффективность отдельных антител в гибели клеток HCT116 повышалась при комбинировании двух неперекрестных антител IgG1-chTRA8-F405L-E430G и IgG1-DR5-01-K409R-E430G (фиг. 8B), но не при комбинировании двух перекрестных антител IgG1-chTRA8-F405L-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G (фиг. 8C).

Пример 10. Способность комбинации неперекрестных антител DR5-05 + CONA и биспецифического антитела DR5-05×CONA с усиливающими гексамеризацию мутациями вызывать гибель клеток мишени

Для изучения способности другой комбинации двух неперекрестных антител (IgG1-CONA-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E345K) и их биспецифичного производного bsAb IgG1-CONA-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E345K вызывать гибель раковых клеток HCT 116 толстой кишки в сравнении с комбинацией антител и биспецифическим антителом без усиливающей гексамеризацию мутации, соответственно, проводили анализ жизнеспособности. Проводили ELISA с перекрестным блокированием для антител IgG1-CONA-K409R и IgG1-DR5-05-F405L, как описано в примере 7, и проверяли методом “сэндвич”-анализа связывания на установке Octet[®] НТХ (данные не приводятся). Анализ жизнеспособности на клетках HCT 116 проводили, как описано в примере 8, с серийным разведением антител в диапазоне конечных концентраций от 0,01 до 20000 нг/мл в 5-кратных разведениях. Из фиг. 9 видно, что комбинация неперекрестных антител IgG1-CONA-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E345K и bsAb IgG1-CONA-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E345K с усиливающими гексамеризацию мутациями проявляли большую эффективность в уничтожении клеток HCT116 по сравнению с этими же антителами без усиливающих гексамеризацию мутаций E430G или E345K.

Пример 11. Способность комбинации антител DR5-01 + DR5-05 с усиливающей гексамеризацию мутацией E430G вызывать гибель клеток мишени в различных линиях раковых клеток

Для изучения способности комбинации химерных антител человек-мышь IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L с усиливающей гексамеризацию мутацией E430G и без неё вызывать гибель раковых клеток COLO 205, HCT-15, HCT 116, HT-29 и SW480 толстой кишки, VxPC-3, HPAF-II и PANC-1 поджелудочной железы, SNU-5 желудка, A549 и SK-MES-1 легких и A375 кожи проводили анализ жизнеспособности. Адгезированные клетки собирали посредством трипсинизации и пропускали через сетчатый фильтр. Клетки осаждали центрифугированием 5 мин при 1200 об/мин и ресуспендировали в культуральной среде при концентрации $0,5 \times 10^5$ клеток/мл [COLO 205, HCT-15,

SW480 и ВхРС-3: среда RPMI 1640 с 25 мМ Нeпес и L-глутамином (Lonza, кат. № BE12-115F) + 10% DBSI (Life Technologies, кат. № 10371-029) + Pen/Strep (Lonza, кат. № DE17-603E); НСТ116 и НТ-29: среда МакКоя 5А с L-глутамином и Нeпес (Lonza, кат. № BE12-168F) + 10% DBSI + Pen/Strep; НРАF-II и SK-MES-1: минимальная основная среда Игла (EMEM, ATCC, кат. № 30-2003) + 10% DBSI + Pen/Strep; PANC-1 и А375: DMEM с 4,5 г/л глюкозы без L-Gln с Нeпес (Lonza, кат. № LO BE12-709F) + 10% DBSI + 1 мМ L-глутамин (Lonza, кат. № BE17-605E) + Pen/Strep; SNU-5: IMDM (Lonza, кат. № BE12-722F) + 10% DBSI + Pen/Strep; А549: среда F-12K (ATCC, кат. № 30-2004) + 10% DBSI + 1 мМ L-глутамин + Pen/Strep]. По 100 мкл одноклеточных суспензий (5000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты из полистирола (Greiner Bio-One, кат. № 655182) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Супернатанты адгезированных клеток заменяли на 150 мкл образцов антител (конечная концентрация 10 мкг/мл) и инкубировали 3 дня при 37°C. В качестве положительного контроля клетки инкубировали с 5 мкМ стауроспорина (Sigma Aldrich, кат. № S6942). Жизнеспособность культивируемых клеток определяли с помощью набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в примере 8. У всех исследуемых клеточных линий процент жизнеспособных клеток был значительно ниже после инкубации с 10 мкг/мл комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G, чем после инкубации с несвязывающимся с мишенью отрицательным контрольным антителом IgG1-b12 (фиг. 10). У всех, кроме двух исследуемых клеточных линий, эффективность комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G была значительно лучше, чем у комбинации IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L без усиливающей гексамеризацию мутации. Эти данные показывают, что комбинация химерных антител к DR5 с усиливающими гексамеризацию мутациями IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G очень эффективно вызывает гибель раковых клеток-мишеней различного происхождения, включая рак толстой кишки, поджелудочной железы, желудка, легких и кожи, не требуя вторичного сшивающего агента. Не отмечалось корреляции между эффективностью в гибели клеток от IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и уровнем экспрессии DR5 в мишенях (описаны в примере 2).

Пример 12. Способность комбинации гуманизованных антител DR5-01 + DR5-05 с усиливающей гексамеризацию мутацией E430G вызывать гибель клеток мишени

Для того, чтобы сравнить эффективность комбинации химерных антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G с эффективностью комбинации гу-

манизованных антител IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G в индуцировании гибели раковых клеток ВхРС-3 и PANC-1 поджелудочной железы *in vitro*, проводили анализ жизнеспособности. Клетки собирали посредством трипсинизации и пропускали через сетчатый фильтр. Клетки осаждали центрифугированием 5 мин при 1200 об/мин и ресуспендировали в культуральной среде при концентрации $0,5 \times 10^5$ клеток/мл. По 100 мкл одноклеточных суспензий (5000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты из полистирола (Greiner Bio-One, кат. № 655182) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Супернатанты адгезированных клеток заменяли на 150 мкл образца из серийного разведения препарата антител и инкубировали 3 дня при 37°C. В качестве положительного контроля клетки инкубировали с 5 мкМ стауроспорина (Sigma Aldrich, кат. № S6942). Жизнеспособность культивируемых клеток определяли с помощью набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в примере 8. Комбинация гуманизованных антител с усиливающей гексамеризацию мутацией IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G проявляла такие же кривые доза-эффект, как и комбинация соответствующих химерных антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G (фиг. 11).

Пример 13. Оптимизация антитела IgG1-hDR5-01-E430G

В участках CDR2 тяжелых цепей IgG1-hDR5-01 и IgG1-hDR5-05 (SEQ ID NO: 2) была идентифицирована аминокислотная последовательность N55-G56 в качестве потенциального мотива дезамидирования аспарагина (Asn). Для проверки эффекта дезамидирования на связывание мишени дезамидирование в этом положении имитировали путем введения мутации N55D в IgG1-hDR5-01-K409R и IgG1-hDR5-05-F405L. IgG1-hDR5-01-N55D-K409R и IgG1-hDR5-05-N55D-F405L тестировали на связывание с клетками НСТ 116 методом FACS, как описано в примере 3. Из фиг. 12А видно, что имитация дезамидирования путем введения мутации N55D приводила к сильному снижению связывания IgG1-hDR5-01-K409R на клетках НСТ 116. Напротив, IgG1-hDR5-05-F405L и IgG1-hDR5-05-N55D-F405L проявляли сравнимые кривые связывания. Чтобы уменьшить риск дезамидирования Asn у антитела DR5-01, вводили мутацию G56T в IgG1-hDR5-01-E430G и этот вариант антитела тестировали на связывание с клетками НСТ 116 методом FACS, как описано в примере 3. Из фиг. 12В видно, что мутация не влияла на связывание IgG1-hDR5-01-E430G с клетками НСТ 116.

Проводили анализ жизнеспособности, чтобы сравнить способность комбинации гуманизованных антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G со способностью комбинации гуманизованных антител IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G индуцировать гибель раковых клеток ВхРС-3 поджелудочной железы. Жизнеспособность

определяли, как описано в примере 11, при 1000 клеток на лунку и с серийными разведениями антител в диапазоне конечных концентраций от 0,0001 до 10000 нг/мл в 4-кратных разведениях, в общем объеме 200 мкл. Из фиг. 12С видно, что введение мутации G56T в IgG1-hDR5-01-E430G не влияло на эффективность уничтожения у этого антитела в комбинации с IgG1-hDR5-05-E430G.

Пример 14. Индуцирование клеточной смерти комбинацией гуманизованных антител hDR5-01-G56T-E430G и hDR5-05-E430G требует взаимодействия Fc:Fc для образования гексамеров

Для анализа потребности в образовании гексамеров антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G для индуцирования клеточной смерти использовали ауто-репульсионные мутации K439E и S440K (Diebolder et al., Science 2014 Mar 14, 343 (6176): 1260-3). Отталкивание Fc между антителами, которое вызывается присутствием K439E или S440K в одном антителе IgG1 или в комбинации антител, приводит к ингибированию гексамеризации даже в присутствии усиливающей гексамеризацию мутации типа E345K или E430G (WO 2013/0044842). Вызванное мутациями K439E и S440K отталкивание нейтрализуется при комбинировании обеих мутаций в смеси двух антител, каждая из которых содержит ту или другую мутацию, что приводит к восстановлению взаимодействий Fc:Fc и гексамеризации. Для IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G были созданы и протестированы варианты с мутацией K439E или S440K во всевозможных комбинациях. Проводили анализ жизнеспособности с серийными разведениями препаратов антител в диапазоне общих концентраций от 0,3 до 20000 нг/мл в 4-кратных разведениях на раковых клетках поджелудочной железы ВхРС-3 и толстой кишки НСТ-15, как описано в примере 11.

Из фиг. 13 видно, что комбинация вариантов IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G, которые оба содержат одну и ту же репульсионную мутацию (K439E или S440K), проявляла сильное снижение эффективности уничтожения клеток ВхРС-3 (А) и НСТ-15 (В). Эффективность уничтожения восстанавливалась при нейтрализации отталкивания путем комбинирования двух антител, каждое из которых содержит одну из комплементирующих мутаций K439E или S440K. Эти данные указывают на то, что для индуцирования клеточной смерти от IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G требуется гексамеризация посредством взаимодействий Fc-Fc.

Пример 15. Взаимодействия Fc-Fc антител участвуют в кластеризации DR5 и индуцировании апоптоза комбинацией антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G с усиливающими гексамеризацию мутациями

Для проверки участия опосредованной Fc-Fc гексамеризации антител в индуциро-

вания клеточной смерти комбинацией антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G использовали пептид DCAWHLGELVWCT из 13 остатков (DeLano et al., Science 2000 Feb 18, 287(5456):1279-83), который связывает Fc в области, содержащей базовые аминокислоты в гидрофобном участке, которые участвуют во взаимодействиях Fc-Fc (Diebold et al., Science 2014 Mar 14, 343(6176):1260-3). Проводили анализ жизнеспособности на клетках ВхРС-3, как описано в примере 11, для комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G в присутствии или в отсутствие пептида DCAWHLGELVWCT. Вкратце, после инкубации клеток в течение ночи при 37°C удаляли культуральную среду и заменяли её 100 мкл культуральной среды, содержащей серийные разведения (в диапазоне 0-100 мкг/мл) Fc-связывающего пептида DCAWHLGELVWCT, неспецифичного контрольного пептида GWTVFQKRLDGSV или в отсутствие пептидов. Затем добавляли 50 мкл образцов антител (конечная концентрация 833 нг/мл) и инкубировали 3 дня при 37°C. Способность комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G вызывать гибель клеток ВхРС-3 сильно ингибировалась Fc-связывающим пептидом DCAWHLGELVWCT при 100 мкг/мл (фиг. 14). Эти данные указывают на участие взаимодействий Fc:Fc в способности комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G с усиливающими гексамеризацию мутациями индуцировать кластеризацию DR5 на клеточной поверхности раковых клеток и вызывать апоптоз.

Пример 16. Способность комбинации химерных антител DR5-01 и DR5-05 с усиливающей гексамеризацию мутацией E430G индуцировать гибель раковых клеток при различных соотношениях в комбинации

Для изучения способности комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G индуцировать гибель раковых клеток ВхРС-3 поджелудочной железы при комбинировании в различных соотношениях IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G проводили анализ жизнеспособности. Клетки собирали посредством трипсинизации и пропускали через сетчатый фильтр. Клетки осаждали центрифугированием 5 мин при 1200 об/мин и ресуспендировали в культуральной среде при концентрации $0,5 \times 10^5$ клеток/мл. По 100 мкл одноклеточных суспензий (5000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты из полистирола (Greiner Bio-One, кат. № 655182) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Добавляли 50 мкл образцов антител с различными соотношениями IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G (указаны как соотношения DR5-01:DR5-05 в 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 и 0:100 в серийных разведениях при конечных концентрациях от 0,06 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях) и инкубировали 3 дня при 37°C. В качестве положительного контроля клетки инкубировали с 5 мкМ стауроспорина (Sigma Aldrich,

кат. № S6942). Жизнеспособность культивируемых клеток определяли с помощью набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в примере 8. При общей концентрации антител в 20 мкг/мл и 4 мкг/мл гибель клеток была одинаково эффективной при всех исследованных соотношениях антител, содержащих оба антитела IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G. При общей концентрации антител в 0,8 мкг/мл и 0,16 мкг/мл все исследованные соотношения антител, содержащие оба антитела IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G, вызывали гибель клеток (фиг. 15).

Пример 17. Способность комбинации гуманизованных антител DR5-01 и DR5-05 с усиливающей гексамеризацию мутацией E430G индуцировать гибель раковых клеток при различных соотношениях в комбинации

Для изучения способности комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G индуцировать гибель раковых клеток ВхРС-3 поджелудочной железы и НСТ-15 толстой кишки при комбинировании в различных соотношениях IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G проводили анализ жизнеспособности. Как правило, эксперименты проводили, как описано в примере 16. Вкратце, адгезированные клетки (5000 клеток на лунку) инкубировали 3 дня при 37°C в 150 мкл в 96-луночных плоскодонных планшетах из полистирола при различных соотношениях IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G (указаны на фиг. 16 как соотношения DR5-01:DR5-05 в 100:0, 98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10, 50:50, 10:90, 8:92, 6:94, 4:96, 2:98 и 0:100) при конечных концентрациях антител в 10 мкг/мл для ВхРС-3 и 20 мкг/мл для НСТ-15. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли с помощью набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в примере 8. Гибель клеток была одинаково эффективной при всех исследованных соотношениях антител, содержащих оба антитела IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G (фиг. 16).

Пример 18. Комбинация гуманизованных антител DR5-01 + DR5-05 с усиливающей гексамеризацию мутацией E430G индуцирует зависимость от каспаз цитотоксичность

Для того, чтобы сравнить цитотоксичность комбинации гуманизованных антител IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G в присутствии и в отсутствие ингибитора каспаз, проводили анализ жизнеспособности. Раковые клетки PANC-1 и ВхРС3 поджелудочной железы собирали посредством трипсинизации и пропускали через сетчатый фильтр. Клетки осаждали центрифугированием 5 мин при 1200 об/мин и ресуспендировали в культуральной среде при концентрации $0,5 \times 10^5$ клеток/мл. По 100 мкл одноклеточных суспензий (5000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные плоскодонные

планшеты из полистирола (Greiner Bio-One, кат. № 655182) и инкубировали в течение ночи при 37°C. В культуры клеток добавляли 25 мкл пан-каспазного ингибитора Z-Val-Ala-DL-Asp-фторметилкетона (Z-VAD-FMK, конечная концентрация 5 мкМ в 150 мкл, Bachem, кат. № 4026865.0005) и инкубировали 1 час при 37°C, после чего добавляли 25 мкл образца антител из серийного разведения препарата антител (диапазон конечных концентраций от 1 до 20 мкг/мл в 4-кратных разведениях) и еще инкубировали 3 дня при 37°C. В качестве положительного контроля клетки инкубировали с 5 мкМ стауроспорина (Sigma Aldrich, кат. № S6942). Рекombинантный TRAIL/APO-2L человека (eBioscience, кат. № BMS356) использовали в конечной концентрации 6 мкг/мл. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли с помощью набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в примере 8. Комбинация гуманизованных антител с усиливающей гексамеризацию мутацией IgG1-hDR5-05-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G не снижала жизнеспособность раковых клеток PANC-1 и VxPC3 поджелудочной железы в присутствии пан-каспазного ингибитора Z-VAD-FMK, указывая на то, что комбинация IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G индуцирует зависимую от каспаз запрограммированную клеточную смерть (фиг. 17). Это также было показано для естественного DR5-лиганда TRAIL.

Пример 19. Индуцирование клеточной смерти при связывании комбинации химерных антител DR5-01 и DR5-05 на раковых клетках COLO 205 толстой кишки при оценке по окрашиванию на аннексин V/пропидия иодид и активную каспазу-3

Анализировали кинетику индуцирования клеточной смерти по двойному окрашиванию на аннексин V/пропидия иодид (PI) и окрашиванию на активную каспазу-3. Аннексин V связывается с фосфатидилсеринем, который появляется на поверхности клеток после запуска запрограммированной клеточной смерти, что является обратимым процессом. PI представляет собой краситель, который интеркалирует в двухцепочечную ДНК и РНК при попадании в клетки. Поскольку PI не может проходить через интактную плазматическую и ядерную мембрану, он не должен окрашивать живые клетки, а будет проникать и окрашивать лишь умирающие клетки, у которых нарушена целостность мембран. Вследствие этих характеристик двойное окрашивание на аннексин V/PI может применяться для различения инициации (аннексин V-положительная/PI-отрицательная) и необратимой (аннексин V-положительная/PI-положительная) запрограммированной клеточной смерти. Каспаза-3 активируется как индуцированными внешними рецепторами смерти, так и внутренними митохондриальными путями клеточной смерти. Поэтому активная каспаза-3 также является маркером инициации каскада смерти. Анализировали индуцирование клеточной смерти при связывании комбинации IgG1-DR5-01-K409R-

E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G в DR5-положительных раковых клетках COLO 205 толстой кишки. Клетки собирали путем объединения супернатантов культур, содержащих неадгезированные клетки и трипсинизированные адгезированные клетки. Клетки пропускали через сетчатый фильтр, осаждали центрифугированием 5 мин при 1200 об/мин и ресуспендировали в культуральной среде при концентрации $0,2 \times 10^6$ клеток/мл. По 500 мкл одноклеточных суспензий (100000 клеток на лунку) высевали в 24-луночные плоскодонные планшеты для культивирования (Greiner Bio-One, кат. № 662160) и инкубировали 16 часов при 37°C. Добавляли 500 мкл образца антител (конечная концентрация 1 мкг антитела) и инкубировали 5 часов или 24 часа при 37°C. В качестве положительного контроля клетки инкубировали с 5 мкМ стауроспорина (Sigma Aldrich, кат. № S6942). Клетки промывали один раз 250 мкл PBS. Адгезированные клетки собирали путем инкубации со 100 мкл 0,05% трипсина в течение 10 мин при 37°C. К трипсинизированным клеткам добавляли 200 мкл среды и переносили клетки в 96-луночный круглодонный планшет для FACS (Greiner Bio-One, кат. № 650101), а затем объединяли с неадгезированными клетками. Клетки осаждали центрифугированием 5 минут при 1200 об/мин, ресуспендировали в 200 мкл ледяного PBS и разделяли на два образца по 100 мкл в 96-луночных круглодонных планшетах для FACS для окрашивания на аннексин V/PI и активную каспазу-3, соответственно.

Двойное окрашивание на аннексин V/PI проводили с помощью набора для выявления апоптоза FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, кат. № 556547). Клетки один раз промывали ледяным PBS и инкубировали в 50 мкл раствора для окрашивания на аннексин V/PI (аннексин V-FITC 1:00 и PI 1:25) в течение 15 мин при 4°C. Клетки промывали 100 мкл буфера для связывания, ресуспендировали в 20 мкл буфера для связывания и измеряли флуоресценцию на iQue Screener (IntelliCyt) в течение 1 часа. Данные анализировали и наносили на графики с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Окрашивание на активную каспазу-3 проводили с помощью набора PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit (BD Pharmingen, кат. № 550914). Клетки один раз промывали ледяным PBS, ресуспендировали в 100 мкл раствора Cytofix/Cytoperm для фиксации и пермеабиллизации и инкубировали 20 минут на льду. Клетки осаждали при комнатной температуре, дважды промывали 100 мкл буфера 1×Perm/Wash и ресуспендировали в 100 мкл кроличьего PE-антитела против активной каспазы-3 (1:10) для инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре. Клетки осаждали при комнатной температуре, один раз промывали 100 мкл буфера 1×Perm/Wash и ресуспендировали в 20 мкл буфера 1×Perm/Wash. Измеряли флуоресценцию на iQue Screener. Данные анализировали и нано-

сили на графики с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Из фиг. 18 видно, что после 5-часовой инкубации комбинация химерных антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G эффективно индуцировала ранние стадии клеточной смерти, о чем свидетельствует повышение процента аннексин V-положительных/PI-отрицательных (A) и положительных по активной каспазе-3 клеток (B) по сравнению с антителом отрицательного контроля IgG1-b12. Содержание аннексин V-положительных/PI-отрицательных и положительных по активной каспазе-3 клеток было выше у клеток, обработанных комбинацией IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G, по сравнению с комбинацией антител к DR5 без мутации E430G (IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L) или с любым из одиночных антител. В точке времени 5 ч содержание двойных аннексин V/PI-положительных клеток было сравнимо с фоновым уровнем во всех образцах (C).

После 24-часовой инкубации содержание двойных аннексин V/PI-положительных клеток (D) повышалось в образцах, обработанных IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G, указывая на то, что клетки вступили в необратимые стадии клеточной смерти. Также на этой стадии эффект комбинации IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G был сильнее (большее повышение доли двойных аннексин V/PI-положительных клеток (E)), чем в образцах, обработанных комбинацией антител к DR5 без мутации E430G (IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L) или любым из отдельных антител. В той же точке времени процент положительных по активной каспазе-3 клеток был самым высоким у клеток, обработанных IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G.

Эти данные указывают на то, что комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G индуцирует как ранние, так и поздние стадии клеточной смерти в раковых клетках COLO 205 толстой кишки и делает это более эффективно, чем комбинация антител без усиливающей гексамеризацию мутации E430G.

Пример 20. Активация каспазы-3 и -7 при связывании комбинации химерных антител DR5-01 и DR5-05 с усиливающей гексамеризацию мутацией на раковых клетках COLO 205 толстой кишки

В примере 19 было показано, что инкубация с комбинацией химерных антител к DR5 IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G индуцирует активацию каспазы-3 в раковых клетках COLO 205 толстой кишки. Через 5 часов содержание положительных по активной каспазе-3 клеток было выше, чем после 24 часов инкубации с комбинацией антител. А в этом примере измеряли активацию каспазы-3/7 по времени с помощью набора Caspase-Glo 3/7 (Promega, кат. № G8091), в котором субстрат с мотивом

распознавания каспазы-3/7 DEVD высвобождает аминолюциферин, субстрат люциферазы, после расщепления. Клетки собирали путем объединения супернатантов культур, содержащих неадгезированные клетки и трипсинизированные адгезированные клетки COLO 205. Клетки пропускали через сетчатый фильтр, осаждали центрифугированием 5 мин при 1200 об/мин и ресуспендировали в культуральной среде при концентрации $0,8 \times 10^5$ клеток/мл. По 25 мкл одноклеточных суспензий (2000 клеток на лунку) высевали в 384-луночные культуральные планшеты (Perkin Elmer, кат. № 6007680) и инкубировали 16 часов при 37°C. Добавляли 25 мкл образца антител (конечная концентрация 1 мкг антител) и инкубировали в течение 1, 2, 5 и 24 часов при 37°C. Планшеты вынимали из инкубатора, чтобы температура понизилась до комнатной. Клетки осаждали центрифугированием 3 мин при 300×g. Удаляли 25 мкл супернатанта и заменяли на 25 мкл субстрата Caspase-Glo 3/7. После перемешивания встряхиванием в течение 1 мин при 500 об/мин планшеты инкубировали 1 час при комнатной температуре. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве Envision Multilabel Reader (PerkinElmer).

Из фиг. 19 видно, что в течение времени от 1, 2 до 5 часов индуцировалась активация каспазы-3/7 комбинациями антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L, а также биспецифическим антителом к DR5 bsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G. Через 24 часа активация каспазы-3/7 снижалась почти до исходного уровня для всех исследованных антител к DR5. Уже через 1 час активация каспазы-3/7 наблюдалась в клетках, которые были обработаны комбинацией IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G, тогда как активация каспазы-3/7 не наблюдалась в клетках, которые были обработаны комбинацией IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L без мутации, усиливающей гексамеризацию. Точно так же, через 2 и 5 часов активация каспазы-3/7, индуцированная комбинацией IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G, была сильнее, чем у комбинации IgG1-DR5-01-K409R + IgG1-DR5-05-F405L. Эти данные показывают, что комбинация химерных антител к DR5 с усиливающей гексамеризацию мутацией IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G индуцировала более быструю и более сильную активацию каспазы-3/7, чем комбинация антител без усиливающей гексамеризацию мутации.

Пример 21. Эффективность комбинации химерных антител DR5-01 и DR5-05 с усиливающей гексамеризацию мутацией E430G не зависит от присутствия вторичного сшивающего Fc средства

Для того, чтобы сравнить способность комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G в отсутствие и в присутствии вторичного сшиваю-

шего антитела средства индуцировать гибель колоректальных раковых клеток COLO 205 и раковых клеток ВхРС-3 и PANC-1 поджелудочной железы, проводили анализ жизнеспособности. Для сравнения в тех же условиях тестировали два антитела к DR5, IgG1-CONA и IgG1-chTRA8-F405L, у которых проявляется повышенная гибель клеток в присутствии вторичного сшивающего антитела средства. Клетки собирали посредством трипсинизации и пропускали через сетчатый фильтр. Клетки осаждали центрифугированием 5 мин при 1200 об/мин и ресуспендировали в культуральной среде при концентрации $0,5 \times 10^5$ клеток/мл. По 100 мкл одноклеточных суспензий (5000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты из полистирола (Greiner Bio-One, кат. № 655182) и инкубировали в течение ночи при 37°C. Супернатанты адгезированных клеток заменяли на 150 мкл образцов антител (конечная концентрация 10 мкг/мл) в отсутствие или в присутствии F(ab')₂-фрагментов козьего антитела против IgG человека (1/150; Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-006-098) и инкубировали 3 дня при 37°C. В качестве положительного контроля на гибель клеток инкубировали клетки с 5 мкМ стауроспорина (Sigma Aldrich, кат. № S6942). Жизнеспособность культивируемых клеток определяли с помощью набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в примере 8. Комбинация антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G вызывала значительную гибель раковых клеток COLO 205, ВхРС-3 и PANC-1 по сравнению с отрицательным контролем, как в присутствии, так и в отсутствие сшивающего Fc средства (фиг. 20). Напротив, антитела к DR5 IgG1-DR5-CONA и IgG1-DR5-chTRA8-F405L не вызывали гибели клеток мишени в отсутствие сшивающего Fc средства. Сшивка Fc индуцировала гибель клеток COLO 205 и ВхРС-3 под действием IgG1-DR5-CONA и IgG1-DR5-chTRA8-F405L, хотя и со значительно меньшей эффективностью, чем комбинация антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G в присутствии или в отсутствие сшивки. Эти данные указывают на то, что гибель раковых клеток COLO 205, ВхРС-3 и PANC-1 под действием комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G не зависит от наличия вторичной сшивки Fc, причем это независимое от сшивки уничтожение более эффективно, чем у Fc-сшитого IgG1-DR5-CONA и IgG1-DR5-chTRA8-F405L.

Пример 22. Введение мутации K409R в IgG1-hDR5-01-430G и мутации F405L в IgG1-hDR5-05-E430G не влияет на эффективность комбинации гуманизованных антител IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G

Во многих экспериментах, описанных в данной заявке, антитела против DR5 IgG1-01 и IgG1-05 содержат в Fc-домене IgG мутацию K409R или F405L (по нумерации EU), соответственно. Эти мутации позволяют создавать биспецифические антитела к DR5 по

реакции обмена Fab-плеча между IgG1-01-K409R и IgG1-05-F405L в контролируемых восстановительных условиях, как описано в WO 02011/131746. Считается, что без обмена Fab-плеча антитела IgG1 человека, несущие мутации K409R и F405L, проявляют такие же функциональные характеристики, что и IgG1 человека дикого типа (Labrijn et al., Proc Natl Acad Sci USA 2013 Mar 26, 110(13):5145-50). Здесь мы показываем, что присутствие мутаций K409R или F405L не влияет на способность комбинации исходных антител IgG1-01 и IgG1-05 индуцировать клеточную смерть у DR5-положительных раковых клеток *in vitro*. Для того, чтобы сравнить способность комбинации гуманизованных антител IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G со способностью комбинации гуманизованных антител IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G индуцировать гибель раковых клеток ВхРС-3 поджелудочной железы, проводили анализ жизнеспособности. Анализ жизнеспособности на клетках ВхРС-3 выполняли, как описано в примере 11, с серийным разведением антител в диапазоне конечных концентраций от 0,001 до 20000 нг/мл в 4-кратных разведениях. Клетки раковой линии ВхРС-3 поджелудочной железы проявляли такие же кривые жизнеспособности после инкубации с комбинацией гуманизованных антител IgG1-hDR5-01-K409R-E430G + IgG1-hDR5-05-F405L-E430G, как и с комбинацией гуманизованных антител IgG1-hDR5-01-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G (фиг. 21). Эти данные показывают, что мутации K409R и F405L не влияют на эффективность комбинации гуманизованных антител DR5-01 и DR5-05 с усиливающей гексамеризацию мутацией E430G.

Пример 23. Химерное биспецифическое антитело IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G индуцирует гибель DR5-положительных раковых клеток

Биспецифическое антитело, нацеленное на два разных эпитопа DR5, получали путем обмена Fab-плеча между химерными антителами IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G, как описано в примере 1. Для проверки способности химерного bsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G при 10 мкг/мл индуцировать гибель раковых клеток из тканей различного происхождения (клеток линии колоректального рака COLO 205, рака кожи A375, рака легких SK-MES-1, рака поджелудочной железы ВхРС-3 и рака желудка SNU-5) проводили анализ жизнеспособности, как описано в примере 11. У всех исследуемых клеточных линий процент жизнеспособных клеток был значительно ниже при инкубации с 10 мкг/мл химерного антитела bsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G по сравнению с не связывающимся с мишенью антителом отрицательного контроля IgG1-b12 (фиг. 22). Эти данные показывают, что биспецифическое антитело типа DR5×DR5' с усиливающей гексамеризацию мутацией E430G индуцирует гибель раковых клеток

различного происхождения, включая рак толстой кишки, поджелудочной железы, желудка, легких и кожи, не требуя вторичного сшивающего средства.

Пример 24. Эффективность химерного bsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G×DR5-05-F405L-E430G не зависит от присутствия вторичного сшивающего Fc средства

Для того, чтобы сравнить способность химерного bsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G в отсутствие и в присутствии вторичного сшивающего антитела средства индуцировать гибель раковых клеток ВхРС-3 и PANC-1 поджелудочной железы и COLO 205 толстой кишки, проводили анализ жизнеспособности, как описано в примере 21. Для сравнения в тех же условиях тестировали два антитела к DR5, IgG1-CONA и IgG1-chTRA8-F405L, у которых проявляется повышенная гибель клеток в присутствии вторичного сшивающего антитела средства. Химерное bsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G индуцировало значительную гибель раковых клеток COLO 205 и ВхРС-3 по сравнению с отрицательным контролем, как в присутствии, так и в отсутствие сшивающего Fc средства (фиг. 23). Напротив, антитела к DR5 IgG1-DR5-CONA и IgG1-DR5-chTRA8-F405L вызывали гибель только в присутствии сшивающего Fc средства.

Пример 25. Индуцирование клеточной смерти при связывании bsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G на раковых клетках COLO 205 толстой кишки при оценке по окрашиванию на аннексин V/пропидия иодид и активную каспазу-3

Анализировали кинетику индуцирования клеточной смерти bsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G при 1 мкг/мл на клетках COLO 205 по двойному окрашиванию на аннексин V/пропидия иодид (PI) и окрашиванию на активную каспазу-3, как описано в примере 19.

Из фиг. 24 видно, что после 5-часовой инкубации bsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G эффективно индуцировало ранние стадии клеточной смерти, о чем свидетельствует повышение процента аннексин V-положительных/PI-отрицательных (A) и положительных по активной каспазе-3 клеток (B) по сравнению с антителом отрицательного контроля IgG1-b12. Содержание аннексин V-положительных/PI-отрицательных и положительных по активной каспазе-3 клеток было выше у клеток, обработанных bsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G, по сравнению с биспецифическим антителом без мутации E430G (bsAb IgG1-DR5-01-K409R × DR5-05-F405L) или любым из моноспецифичных антител. В точке времени 5 ч содержание двойных аннексин V/PI-положительных клеток было сравнимо с фоновым уровнем во всех образцах (C).

После 24-часовой инкубации содержание двойных аннексин V/PI-положительных

клеток (D) повышалось в образцах, обработанных bsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G×DR5-05-F405L-E430G, указывая на то, что клетки вступили в необратимые стадии клеточной смерти. Также на этой стадии эффект bsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G был сильнее (большее повышение доли двойных аннексин V/PI-положительных клеток) (E), чем в образцах, обработанных биспецифическим антителом без мутации E430G (bsAb IgG1-DR5-01-K409R × DR5-05-F405L) или любым из моноспецифичных антител. В той же точке времени процент положительных по активной каспазе-3 клеток был самым высоким у клеток, обработанных bsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G×DR5-05-F405L-E430G.

Эти данные указывают на то, что bsAb IgG1-DR5-01-K409R-E430G×DR5-05-F405L-E430G индуцирует как ранние, так и поздние стадии клеточной смерти в раковых клетках COLO 205 толстой кишки и делает это более эффективно, чем биспецифическое антитело без усиливающей гексамеризацию мутации E430G.

Пример 26. Эффективность in vivo вариантов антител DR5-01 и DR5-05 с усиливающей гексамеризацию мутацией и без неё на модели подкожных ксенотрансплантатов COLO 205 рака толстой кишки

Оценивали противоопухолевое действие in vivo различных антител против DR5 и комбинации антител DR5-01 + DR5-05 с усиливающей гексамеризацию мутацией на модели подкожных ксенотрансплантатов с раковыми клетками COLO 205 толстой кишки человека. В день 0 собирали клетки путем объединения супернатантов культур, содержащих неадгезированные клетки и трипсинизированные адгезированные клетки. Вводили 3×10^6 клеток в объеме 200 мкл PBS в бока 6–11-недельных самок мышей SCID (C.B-17/IcrHan[®] Hsd-Prkdc^{scid}; Harlan). Все эксперименты и работы с животными были одобрены местными властями и проводились в соответствии со всеми применимыми международными, национальными и местными законами и директивами. Развитие опухолей отслеживали по меньшей мере два раза в неделю по измерению кронциркулем (PLEXX) в виде $0,52 \times (\text{длина}) \times (\text{ширина})^2$. Опухоли измеряли до достижения конечного объема опухоли в 1500 мм³, до появления изъязвлений опухоли, до появления серьезных клинических признаков или пока рост опухоли не заблокирует передвижения мыши. На 6-й день средний объем опухолей составлял ~ 200 мм³, и мышей разбивали на группы с одинаковыми пределами размера опухолей (табл. 2 ниже). Мышей обрабатывали путем внутривенной (i.p.) инъекции 100 мкг антител в 200 мкл PBS на 6-й и 13-й день (в дозе 5 мг/кг). Для проверки правильного введения антител брали пробы крови для определения IgG в сыворотке через три дня после введения первой дозы. У трех отдельных мышей не выявлялся уровень IgG человека в плазме и их исключали из статистического анализа (см.

табл. 2 ниже). У остальных мышей концентрация антител человека в плазме соответствовала ожиданиям по 2-компарментной модели с $V_{cen} = 50$ мл/кг, $V_s = 100$ мл/кг и периодом полувыведения 11,6 дней (данные не приводятся). Опухоли измеряли вплоть до 16 недель после их инокуляции.

Таблица 2. Опытные группы и дозировка

Кол-во мышей	Прошли анализ	Антитело	Общая доза антител	День введения после прививки опухоли
8	7	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (50 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (50 мкг)	100 мкг (5 мг/кг)	6, 13
7	7	IgG1-DR5-05-F405L (100 мкг)	100 мкг (5 мг/кг)	6, 13
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (100 мкг)	100 мкг (5 мг/кг)	6, 13
8	8	IgG1-DR5-05-F405L-E430G (100 мкг)	100 мкг (5 мг/кг)	6, 13
8	8	IgG1-CONA (100 мкг)	100 мкг (5 мг/кг)	6, 13
8	7	bsAb DR5-01-K409R × DR5-05-F405L (100 мкг)	100 мкг (5 мг/кг)	6, 13
8	8	bsAb DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G (100 мкг)	100 мкг (5 мг/кг)	6, 13
8	7	IgG1-b12 (100 мкг)	100 мкг (5 мг/кг)	6, 13

На фиг. 25А представлены средние объемы опухолей в каждой опытной группе по времени. На фиг. 25В представлены средние объемы опухолей на 23-й день после прививки опухолей, когда все группы еще были целыми. Все образцы антител против DR5 значительно ингибировали рост опухолей по сравнению с антителом отрицательного контроля IgG1-b12 (непараметрический метод ANOVA (Kruskal-Wallis) с последующим тестом множественных сравнений Данна на 23-й день: $p < 0,0001$). Полное устранение опухолей наблюдалось для комбинации антител DR5-01 + DR5-05 с усиливающей гексамеризацию мутацией (IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G), для биспецифических антител с усиливающей гексамеризацию мутацией и без неё (bsAb DR5-01-K409R×DR5-05-F405L и bsAb DR5-01-K409R-E430G×DR5-05-F405L-E430G), а также для антител против DR5 с усиливающей гексамеризацию мутацией (IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G). IgG1-CONA и IgG1-DR5-05-F405L без усиливающей гексамеризацию мутации сильно ингибировали рост опухолей по сравнению с IgG1-b12, но не приводили к полному устранению опухолей.

На фиг. 25С представлен график развития опухолей Каплана-Мейера с порогом отсечения при объеме опухолей > 750 мм³. По сравнению с мышами, получавшими антитело отрицательного контроля IgG1-b12, рост опухолей значительно замедлялся во всех группах, получавших антитела против DR5 (анализ Мантиеля-Кокса с порогом отсечения при размерах опухолей в 750 мм³: $p < 0,001$). По окончании исследования (день 112) в группе мышей, получавших комбинацию антител DR5-01 + DR5-05 с усиливающей

гексамеризацию мутацией (IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G), оказалось значительно меньше мышей с ростом опухолей, чем в группе конатумумаба (точный критерий сопряжённости Фишера: $p < 0,01$).

Эти данные показывают, что введение усиливающей гексамеризацию мутации E430G в IgG1-DR5-05-F405L приводит к усилению ингибирования опухолей на модели подкожных опухолей COLO 205 рака толстой кишки по сравнению с IgG1-DR5-05-F405L без усиливающей гексамеризацию мутации. Как антитела DR5-01 и DR5-05 с усиливающей гексамеризацию мутацией (IgG1-DR5-01-K409R-E430G и IgG1-DR5-05-F405L-E430G), так и биспецифические антитела с усиливающей гексамеризацию мутацией (bsAb DR5-01-K409R × DR5-05-F405L и bsAb DR5-01-K409R-E430G × DR5-05-F405L-E430G) и комбинация антител с усиливающей гексамеризацию мутацией (IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G) проявляли лучшее ингибирование опухолей, чем IgG1-CONA и IgG1-DR5-05-F405L без усиливающей гексамеризацию мутации.

Пример 27. Эффективность in vivo различных доз комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G на модели подкожных ксенотрансплантатов COLO 205 рака толстой кишки

Оценивали противоопухолевое действие in vivo различных доз IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и сравнивали с эквивалентной дозировкой IgG1-CONA на модели подкожных ксенотрансплантатов COLO 205 рака толстой кишки человека. Инокуляцию раковых клеток, обработку мышей, измерение роста опухолей и определение конечной точки выполняли, как описано в примере 26. На 10-й день средний объем опухолей составлял ~ 400 мм³, и мышей разбивали на группы с одинаковыми пределами размера опухолей (табл. 3 ниже). Мышам вводили внутривенно (iv) 40 мкг (2 мг/кг), 10 мкг (0,5 мг/кг) или 2 мкг (0,1 мг/кг) антител в 100 мкл PBS на 10-й день. Мыши в контрольной группе получали 40 мкг (2 мг/кг) IgG1-b12. Опухоли измеряли вплоть до 17 недель после их инокуляции.

Таблица 3. Опытные группы и дозировка

Кол-во мышей	Антитело	Общая доза антител	День введения после прививки опухоли
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (20 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (20 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	10
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (5 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (5 мкг)	10 мкг (0,5 мг/кг)	10
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (1 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (1 мкг)	2 мкг (0,1 мг/кг)	10
8	IgG1-CONA (40 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	10

8	IgG1-CONA (10 мкг)	10 мкг (0,5 мг/кг)	10
8	IgG1-CONA (2 мкг)	2 мкг (0,1 мг/кг)	10
8	IgG1-b12 (40 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	10

На фиг. 26А представлены средние объемы опухолей по опытным группам. Обработка однократной дозой в 0,5 мг/кг или 2 мг/кг комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G приводила к полной регрессии опухолей до тех пор, пока исследование не было остановлено на 126-й день. Обработка при 0,5 мг/кг и 2 мг/кг IgG1-CONA также вызывала регрессию опухолей, но регрессия была неполной с рецидивом роста опухолей у всех мышей или почти всех (7/8) мышей, соответственно. При 0,1 мг/кг ни IgG1-CONA, ни комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G не проявляли противоопухолевой активности. Из фиг. 26В видно, что на 16-й день после инокуляции опухолей ингибирование их при 2 мг/кг и 0,5 мг/кг IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G было значительно лучше, чем при эквивалентной дозе IgG1-CONA (непарный t-критерий).

На фиг. 26С представлен график развития опухолей Каплана-Мейера с порогом отсека при объеме опухолей $> 500 \text{ мм}^3$. В дозе 0,5 мг/кг и 2 мг/кг комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и IgG1-CONA значительно ингибировала прогрессирование роста опухолей по сравнению с антителом отрицательного контроля IgG1-b12 ($p < 0,001$, анализ Мантеля-Кокса с порогом отсека при размерах опухолей в 500 мм^3). В дозе 0,5 мг/кг ингибирование роста опухолей было значительно лучше у комбинации IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G, чем при эквивалентной дозе IgG1-CONA.

Эти данные показывают, что комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G обладает более сильным противоопухолевым действием по сравнению с IgG1-CONA, так как комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G в дозе 2 мг/кг значительно снижала опухолевую нагрузку на 16-й день по сравнению с IgG1-CONA, а при 0,5 мг/кг комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G значительно снижала опухолевую нагрузку на 16-й день и продлевала время выживания без прогрессирования (порог отсека размера опухолей 500 мм^3) по сравнению с IgG1-CONA.

Пример 28. Эффективность *in vivo* различных доз комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G на модели подкожных ксенотрансплантатов ВхРС-3 рака поджелудочной железы

Оценивали противоопухолевое действие *in vivo* различных доз IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и сравнивали с эквивалентной дозировкой

IgG1-CONA-F405L на модели подкожных ксенотрансплантатов ВхРС-3 рака поджелудочной железы человека. В день 0 собирали адгезированные клетки посредством трипсинизации. Вводили 5×10^6 клеток в объеме 100 мкл PBS в бока 6–11-недельных самок мышей SCID (C.B-17/IcrHan[®] Hsd-Prkdc^{scid}; Harlan). Обработку мышей, измерение роста опухолей и определение конечной точки проводили, как описано в примере 26. На 10-й день средний объем опухолей составлял ~ 250 мм³, и мышей разбивали на группы с одинаковыми пределами размера опухолей (табл. 4 ниже). Мышам вводили внутривенно (i.v.) 200 мкг (10 мг/кг), 40 мкг (2 мг/кг) или 10 мкг (0,5 мг/кг) антител в 200 мкл PBS на 20-й и 28-й день. Мыши в контрольной группе получали 200 мкг (10 мг/кг) IgG1-b12. Для проверки правильности введения антител брали пробы крови для определения IgG в сыворотке через 1 неделю после введения дозы. Опухоли измеряли вплоть до 10 недель после их инокуляции.

Таблица 4. Опытные группы и дозировка

Кол-во мышей	Антитело	Общая доза антител	День введения после прививки опухоли
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (100 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (100 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	20, 28
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (20 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (20 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	20, 28
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (5 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (5 мкг)	10 мкг (0,5 мг/кг)	20, 28
8	IgG1-CONA-F405L (200 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	20, 28
8	IgG1-CONA-F405L (40 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	20, 28
8	IgG1-CONA-F405L (10 мкг)	10 мкг (0,5 мг/кг)	20, 28
8	IgG1-b12 (200 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	20, 28

На фиг. 27А представлены средние объемы опухолей по опытным группам. Все исследованные дозы комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G ингибировали рост опухолей по сравнению с антителом отрицательного контроля IgG1-b12, тогда как получавшие IgG1-CONA-F405L группы не ингибировали. Из фиг. 27В видно, что на 48-й день после инокуляции опухолей ингибирование их роста комбинацией IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G было значительно лучше, чем при эквивалентных дозах IgG1-CONA-F405L (непарный t-критерий, $p < 0,05$).

На фиг. 27С представлен график развития опухолей Каплана-Мейера с порогом отсека при объеме опухолей > 500 мм³. Комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G значительно ингибировала прогрессирование роста опухолей по сравнению с антителом отрицательного контроля IgG1-b12 и по сравнению с IgG1-

CONA-F405L (анализ Мантиеля-Кокса с порогом отсечения при размерах опухолей в 500 мм³: $p < 0,001$).

Эти данные показывают, что комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G ингибирует рост опухоли в разных дозах (0,5 мг / кг, 2 мг / кг и 10 мг / кг), и что противораковая эффективность была значительно лучше, чем при эквивалентных дозах IgG1-CONA-F405L в модели ксенотрансплантата рака поджелудочной железы человека ВхРС-3 *in vivo*.

Пример 29. Эффективность *in vivo* различных доз комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G на модели подкожных ксенотрансплантатов A375 рака кожи

Оценивали противоопухолевое действие *in vivo* различных доз IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и сравнивали с эквивалентной дозировкой IgG1-CONA-F405L на модели подкожных ксенотрансплантатов A375 рака кожи человека. В день 0 собирали адгезированные клетки посредством трипсинизации. Вводили 5×10^6 клеток в объеме 100 мкл PBS в бока 6–11-недельных самок мышей SCID (C.B-17/ICrHan[®] Hsd-Prkdc^{scid}; Harlan). Обработку мышей, измерение роста опухолей и определение конечной точки проводили, как описано в примере 26. На 19-й день средний объем опухолей составлял ~ 250 мм³, и мышей разбивали на группы с одинаковыми пределами размера опухолей (табл. 5 ниже). Мышам вводили внутривенно (*i.v.*) 200 мкг (10 мг/кг), 40 мкг (2 мг/кг) или 10 мкг (0,5 мг/кг) антител в 200 мкл PBS на 19-й и 26-й день. Мыши в контрольной группе получали 200 мкг (10 мг/кг) IgG1-b12. Для проверки правильности введения антител брали пробы крови для определения IgG в сыворотке через 1 неделю после введения дозы. Опухоли измеряли вплоть до 7 недель после их инокуляции.

Таблица 5. Опытные группы и дозировка

Кол-во мышей	Антитело	Общая доза антител	День введения после прививки опухоли
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (100 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (100 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	19, 26
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (20 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (20 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	19, 26
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (5 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (5 мкг)	10 мкг (0,5 мг/кг)	19, 26
8	IgG1-CONA-F405L (200 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	19, 26
8	IgG1-CONA-F405L (40 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	19, 26
8	IgG1-CONA-F405L (10 мкг)	10 мкг (0,5 мг/кг)	19, 26
8	IgG1-b12 (200 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	19, 26

На фиг. 28А представлены средние объемы опухолей по опытным группам. Все исследованные дозы комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G ингибировали рост опухолей по сравнению с антителом отрицательного контроля IgG1-b12, тогда как получавшие IgG1-CONA-F405L группы не ингибировали. Из фиг. 28В видно, что на 29-й день после инокуляции средний размер опухолей у мышей, получавших комбинацию IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G, был меньше, чем у мышей, получавших IgG1-b12 ($p < 0,05$ для всех уровней дозы, односторонний ANOVA с коррекцией Dunnett для множественных сравнений), причем комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G была значительно более эффективной, чем IgG1-CONA-F405L (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) при эквивалентных дозах.

Эти данные показывают, что комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G ингибирует рост опухолей при различных дозах (0,5 мг/кг, 2 мг/кг и 10 мг/кг) на модели ксенотрансплантатов A375 рака кожи человека *in vivo*, причем противоопухолевое действие было значительно лучше, чем при эквивалентных дозах IgG1-CONA-F405L.

Пример 30. Эффективность *in vivo* различных доз комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G на модели подкожных ксенотрансплантатов HCT-15 рака толстой кишки

Оценивали противоопухолевое действие *in vivo* различных доз IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и сравнивали с эквивалентной дозировкой IgG1-CONA на модели подкожных ксенотрансплантатов HCT-15 рака толстой кишки человека на фирме CrownBiosciences, Taicang, Китай. Клетки поддерживали *in vitro* в виде монослойной культуры в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Собирали адгезированные клетки в экспоненциальной фазе роста путем обработки трипсином-ЭДТА. Вводили 5×10^6 клеток в объеме 100 мкл PBS в бока 6–8-недельных самок мышей BALB/c nude (Shanghai Laboratory Animal Center). Содержание и использование животных во время исследования проводилось в соответствии с правилами Ассоциации по оценке и аккредитации содержания лабораторных животных (AAALAC). Измеряли объемы опухолей два раза в неделю в двух измерениях с помощью кронциркуля и выражали объем в мм³ по формуле: $V = 0,5a \times b^2$, где *a* и *b* – длинный и короткий диаметр опухоли, соответственно. Через 11 дней после инокуляции опухолей их средний объем составлял ~ 186 мм³, мышей разбивали на группы по схеме рандомизованных блоков и начинали обработку. Мышам дважды по схеме Q7D вводили внутривенно (*i.v.*) 200 мкг (10 мг/кг), 40 мкг (2 мг/кг) или 10 мкг (0,5 мг/кг) антител в 10 мкл PBS на 1 г массы тела. Мыши в контрольной группе параллельно получали

200 мкг (10 мг/кг) IgG1-b12. После инокуляции опухолей каждый день проверяли состояние животных и измеряли объемы опухолей два раза в неделю.

Таблица 6. Опытные группы и дозировка, пример 30

Кол-во мышей	Кол-во проанализированных	Антитело	Общая доза антител	День введения после прививки опухоли
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (100 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (100 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	11, 18
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (20 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (20 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	11, 18
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (5 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (5 мкг)	10 мкг (0,5 мг/кг)	11, 18
8	8	IgG1-CONA-F405L (200 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	11, 18
8	8	IgG1-CONA-F405L (40 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	11, 18
8	8	IgG1-CONA-F405L (10 мкг)	10 мкг (0,5 мг/кг)	11, 18
8	8	IgG1-b12 (200 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	11, 18

На фиг. 29А представлены средние объемы опухолей по опытным группам. Все исследованные дозы комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G ингибировали рост опухолей по сравнению с антителом отрицательного контроля IgG1-b12, тогда как IgG1-CONA не ингибировали. Из фиг. 29В видно, что на 17-й день после начала обработки комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G ингибировала рост опухолей значительно лучше, чем IgG1-CONA в эквивалентных дозах (непарный t-критерий, $p < 0,05$).

На фиг. 29С представлен график развития опухолей Каплана-Мейера с порогом отсека при объеме опухолей $> 500 \text{ мм}^3$. Комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G значительно ингибировала прогрессирование роста опухолей по сравнению с антителом отрицательного контроля IgG1-b12 и по сравнению с эквивалентной дозой IgG1-CONA (анализ Мантеля-Кокса с порогом отсека при размерах опухолей в 500 мм^3 : $p < 0,001$).

Эти данные показывают, что комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-

05-F405L-E430G ингибирует рост опухолей при различных дозах (0,5 мг/кг, 2 мг/кг и 10 мг/кг) на модели ксенотрансплантатов НСТ-15 рака толстой кишки человека *in vivo*, причем противоопухолевое действие было значительно лучше, чем при эквивалентных дозах IgG1-CONA.

Пример 31. Эффективность *in vivo* различных доз комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G на модели подкожных ксенотрансплантатов SW480 рака толстой кишки

Оценивали противоопухолевое действие *in vivo* различных доз IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и сравнивали с эквивалентной дозировкой IgG1-CONA на модели подкожных ксенотрансплантатов SW480 рака толстой кишки человека на фирме CrownBiosciences, Taicang, Китай. Клетки поддерживали *in vitro* в виде монослойной культуры в среде L-15 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки при 37°C в 100% воздухе. Собирали адгезированные клетки в экспоненциальной фазе роста путем обработки трипсином-ЭДТА. Вводили 1×10^7 клеток в объеме 200 мкл PBS с матригелем (1:1) в бока 6–8-недельных самок мышей NOD/SCID (Beijing HFK Bioscience). Работа с мышами и измерение объема опухолей выполнялись, как описано в примере 30. Через 10 дней после инокуляции опухолей их средний объем составлял $\sim 175 \text{ мм}^3$, мышей разбивали на группы по схеме рандомизованных блоков и начинали обработку. Мышам дважды по схеме Q7D вводили внутривенно (*i.v.*) 200 мкг (10 мг/кг), 40 мкг (2 мг/кг) или 10 мкг (0,5 мг/кг) антител в 10 мкл PBS на 1 г массы тела. Мыши в контрольной группе параллельно получали 200 мкг (10 мг/кг) IgG1-b12. После инокуляции опухолей каждый день проверяли состояние животных и измеряли объемы опухолей два раза в неделю.

Таблица 7. Опытные группы и дозировка, пример 31

Кол-во мышей	Кол-во проанализированных	Антитело	Общая доза антител	День введения после прививки опухоли
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (100 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (100 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	10, 17
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (20 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (20 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	10, 17

8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (5 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (5 мкг)	10 мкг (0,5 мг/кг)	10, 17
8	8	IgG1-CONA-F405L (200 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	10, 17
8	8	IgG1-CONA-F405L (40 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	10, 17
8	8	IgG1-CONA-F405L (10 мкг)	10 мкг (0,5 мг/кг)	10, 17
8	8	IgG1-b12 (200 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	10, 17

На фиг. 30А представлены средние объемы опухолей по опытным группам. Все исследованные дозы комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G ингибировали рост опухолей по сравнению с антителом отрицательного контроля IgG1-b12 (10 мг/кг, $p < 0,0001$; 2 мг/кг, $p < 0,001$; 0,5 мг/кг, $p < 0,05$). Опытные группы IgG1-CONA были лучше, чем IgG1-b12 только в самых высоких дозах (10 мг/кг и 2 мг/кг, $p < 0,01$), но не при 0,5 мг/кг. Из фиг. 30В видно, что на 28-й день после начала обработки комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G ингибировала рост опухолей значительно лучше, чем IgG1-CONA в эквивалентных дозах при 10 мг/кг и 0,5 мг/кг (непарный t-критерий, $p < 0,05$).

На фиг. 30С представлен график развития опухолей Каплана-Мейера с порогом отсека при объеме опухолей $> 500 \text{ мм}^3$. Комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G в дозе 10 мг/кг значительно ингибировала прогрессирование роста опухолей по сравнению с антителом отрицательного контроля IgG1-b12 и по сравнению с эквивалентной дозой IgG1-CONA (анализ Манталя-Кокса с порогом отсека при размерах опухолей в 500 мм^3 ; $p < 0,001$).

Эти данные показывают, что комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G ингибирует рост опухолей при различных дозах (0,5 мг/кг, 2 мг/кг и 10 мг/кг) на модели ксенотрансплантатов SW480 рака толстой кишки человека *in vivo*, причем противоопухолевое действие для доз 10 мг/кг и 0,5 мг/кг было значительно лучше, чем при эквивалентных дозах IgG1-CONA.

Пример 32. Эффективность *in vivo* различных доз комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G на модели подкожных ксенотрансплантатов SNU-5 рака желудка

Оценивали противоопухолевое действие *in vivo* различных доз IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и сравнивали с эквивалентной дозировкой IgG1-CONA на модели подкожных ксенотрансплантатов SNU-5 рака желудка человека на

фирме CrownBiosciences, Taicang, Китай. Клетки поддерживали *in vitro* в виде суспензионной культуры в среде IMDM с добавлением 20% фетальной телячьей сыворотки при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Собирали клетки в экспоненциальной фазе роста и вводили 1×10⁷ клеток в объеме 200 мкл PBS с матригелем (1:1) в бока 6–8-недельных самок мышей CB17/SCID (Beijing HFK Bioscience). Работа с мышами и измерение объема опухолей выполнялись, как описано в примере 30. Через 8 дней после инокуляции опухолей их средний объем составлял 169 мм³, мышей разбивали на группы по схеме рандомизованных блоков и начинали обработку. Мышам дважды по схеме Q7D вводили внутривенно (*i.v.*) 200 мкг (10 мг/кг), 40 мкг (2 мг/кг) или 10 мкг (0,5 мг/кг) антител в 10 мкл PBS на 1 г массы тела. Мыши в контрольной группе параллельно получали 200 мкг (10 мг/кг) IgG1-b12. После инокуляции опухолей каждый день проверяли состояние животных и измеряли объемы опухолей два раза в неделю.

Таблица 8. Опытные группы и дозировка, пример 32

Кол-во мышей	Кол-во проанализированных	Антитело	Общая доза антител	День введения после прививки опухоли
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (100 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (100 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	8, 15
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (20 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (20 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	8, 15
8	8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (5 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (5 мкг)	10 мкг (0,5 мг/кг)	8, 15
8	8	IgG1-CONA-F405L (200 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	8, 15
8	8	IgG1-CONA-F405L (40 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	8, 15
8	8	IgG1-CONA-F405L (10 мкг)	10 мкг (0,5 мг/кг)	8, 15
8	8	IgG1-b12 (200 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	8, 15

На фиг. 31А представлены средние объемы опухолей по опытным группам. Все исследованные дозы комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G ингибировали рост опухолей по сравнению с антителом отрицательного контроля

IgG1-b12. При дозах 2 мг/кг и 10 мг/кг комбинация антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G вызывала полную регрессию опухолей, которая продолжалась в течение всего времени исследования (7 недель после начала обработки). Из фиг. 31B видно, что на 23-й день после начала обработки комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G ингибировала рост опухолей значительно лучше, чем IgG1-CONA в эквивалентных дозах при 10 мг/кг и 0,5 мг/кг (критерий Mann-Whitney, $p < 0,05$).

На фиг. 31C представлен график развития опухолей Каплана-Мейера с порогом отсека при объеме опухолей $> 500 \text{ мм}^3$. Комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G значительно ингибировала прогрессирование роста опухолей по сравнению с антителом отрицательного контроля IgG1-b12 и по сравнению с эквивалентной дозой IgG1-CONA (анализ Мантеля-Кокса с порогом отсека при размерах опухолей в 500 мм^3 : $p < 0,05$).

Эти данные показывают, что комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G ингибирует рост опухолей при различных дозах (0,5 мг/кг, 2 мг/кг и 10 мг/кг) на модели ксенотрансплантатов SNU-5 рака желудка человека *in vivo*, причем противоопухолевое действие было значительно лучше, чем при эквивалентных дозах IgG1-CONA.

Пример 33. Эффективность *in vivo* различных доз комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G на модели подкожных ксенотрансплантатов SK-MES-1 рака легких

Оценивали противоопухолевое действие *in vivo* различных доз IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G и сравнивали с эквивалентной дозировкой IgG1-CONA на модели подкожных ксенотрансплантатов SK-MES-1 рака легких человека на фирме CrownBiosciences, Taicang, Китай. Клетки поддерживали *in vitro* в виде монослойной культуры в среде MEM с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки и 0,01 мМ NEAA при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в воздухе. В день 0 собирали адгезированные клетки в экспоненциальной фазе роста путем обработки трипсином-ЭДТА. Вводили 5×10^6 клеток в объеме 100 мкл PBS в бока 6–8-недельных самок мышей BALB/c nude (Shanghai Laboratory Animal Center). Работа с мышами и измерение объема опухолей выполнялись, как описано в примере 30. Через 21 день после инокуляции опухолей их средний объем составлял 161 мм^3 , мышей разбивали на группы по схеме рандомизованных блоков и начинали обработку. Мышам дважды по схеме Q7D вводили внутривенно (*i.v.*) 200 мкг (10 мг/кг), 40 мкг (2 мг/кг) или 10 мкг (0,5 мг/кг) антител в 10 мкл PBS на 1 г массы тела. Мыши в контрольной группе параллельно получали 200 мкг (10 мг/кг) IgG1-b12. После инокуляции опухолей каждый день проверяли состояние животных и измеряли объемы

опухолей два раза в неделю.

Таблица 9. Опытные группы и дозировка, пример 33

Кол-во мышей	Антитело	Общая доза антител	День введения после прививки опухоли
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (100 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (100 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	21, 28
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (20 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (20 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	21, 28
8	IgG1-DR5-01-K409R-E430G (5 мкг) IgG1-DR5-05-F405L-E430G (5 мкг)	10 мкг (0,5 мг/кг)	21, 28
8	IgG1-CONA-F405L (200 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	21, 28
8	IgG1-CONA-F405L (40 мкг)	40 мкг (2 мг/кг)	21, 28
8	IgG1-CONA-F405L (10 мкг)	10 мкг (0,5 мг/кг)	21, 28
8	IgG1-b12 (200 мкг)	200 мкг (10 мг/кг)	21, 28

На фиг. 32А представлены средние объемы опухолей по опытным группам. Все исследованные дозы комбинации антител IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G ингибировали рост опухолей по сравнению с антителом отрицательного контроля IgG1-b12 ($p < 0,0001$), тогда как IgG1-CONA оказывал существенный эффект по сравнению с IgG1-b12 только в дозе 10 мг/кг ($p < 0,01$) и 2 мг/кг ($p < 0,05$), но не при 0,5 мг/кг (односторонний ANOVA с последующим критерием Dunnett для множественных сравнений). Из фиг. 32В видно, что на 14-й день после начала обработки комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G+IgG1-DR5-05-F405L-E430G значительно лучше ингибировала рост опухолей, чем эквивалентные дозы IgG1-CONA в 2 мг/кг и 0,5 мг/кг (непарный t-критерий, $p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно).

На фиг. 32С представлен график развития опухолей Каплана-Мейера с порогом отсека при объеме опухолей $> 1000 \text{ мм}^3$. Комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G значительно ингибировала прогрессирование роста опухолей по сравнению с антителом отрицательного контроля IgG1-b12 (анализ Мантеля-Кокса с порогом отсека при размерах опухолей в 1000 мм^3 : $p < 0,001$) и по сравнению с эквивалентной дозой IgG1-CONA в 2 мг/кг и 0,5 мг/кг (анализ Мантеля-Кокса с порогом отсека при размерах опухолей в 1000 мм^3 : $p < 0,05$).

Эти данные показывают, что комбинация IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G ингибирует рост опухолей при различных дозах (0,5 мг/кг, 2 мг/кг и 10 мг/кг) на модели ксенотрансплантатов SK-MES-1 рака легких человека *in vivo*, причем противоопухолевое действие было значительно лучше, чем при эквивалентных дозах IgG1-CONA в 0,5 мг/кг и 2 мг/кг.

Пример 34. Уровни экспрессии DR5 в различных линиях раковых клеток человека

Определяли плотность DR5 на клетку для различных линий раковых клеток человека методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью набора QIFIKIT с мышиним моноклональным антителом В-К29, как описано в примере 2. Клеточные линии классифицировали согласно низкой экспрессии DR5 ($ABC < 10000$) или умеренной экспрессии DR5 ($ABC > 10000$). У линий раковых клеток человека: злокачественной меланомы K-MEL-5 (ATCC, HTB-070), острой Т-клеточной лейкемии Jurkat (ATCC, TIB-152) и лимфомы Беркитта Daudi (ATCC, CCL-231) экспрессия DR5 оказалась низкой (ABC по QIFIKIT в пределах 3,500-6,500). У клеточных линий колоректальной карциномы человека экспрессия DR5 оказалась умеренной (ABC по QIFIKIT в пределах 12000-44500).

Пример 35. Введение усиливающей гексамеризацию мутации не влияет на связывание антител IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-05 с DR5-положительными раковыми клетками толстой кишки человека

Анализировали связывание очищенных вариантов антител IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-05 с мутацией E430G и без нее с раковыми клетками HCT 116 толстой кишки методом проточной цитометрии. Готовили одноклеточные суспензии и анализировали связывание у серийных разведений препаратов антител (конечные концентрации от 0,0006 до 10 мкг/мл в 4-кратных разведениях), как описано в примере 3. После инкубации со вторичным антителом клетки дважды отмывали, ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS и анализировали связывание антител на клеточном анализаторе BD LRSFFortessa (BD Biosciences). Кривые связывания анализировали методом нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Из фиг. 33 видно, что антитела IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G проявляли такое же дозо-зависимое связывание с клетками HCT 116, как и соответствующие им антитела без мутации E430G. Введение мутации E430G не оказывало влияния на связывание у антител к DR5. Рассчитывали значения EC_{50} из шести повторных экспериментов: 74,4 (\pm 58,4) нг/мл для IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и 101,2 (\pm 52,6) нг/мл для IgG1-hDR5-05-E430G.

Пример 36. Связывание антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G с DR5-положительными раковыми клетками человека

Анализировали связывание антител с раковыми клетками HCT 116 человека с умеренной экспрессией DR5 методом проточной цитометрии для очищенных образцов меченного Alexa 647 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и меченного Alexa 647 IgG1-hDR5-05-

E430G в виде отдельных антител и в виде комбинации двух антител. 1 мг/мл IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G метили в течение 1 часа при комнатной температуре с 5-молярным избытком сукцинимидилового эфира карбоновой кислоты Alexa Fluor[®] 647 (Molecular Probes, кат № A-20006) в буфере для конъюгирования 0,1 М NaHCO₃ до получения 3-кратной степени мечения. Избыток свободного Alexa 647 удаляли на колонке PD 10 (Amersham Bioscience, кат № 17-0851-01). Готовили одноклеточные суспензии и анализировали связывание у серийных разведений препаратов антител (конечные концентрации от 0,0019 до 30 мкг/мл в 5-кратных разведениях), как описано в примере 3. После инкубации с антителами клетки дважды отмывали, ресуспендировали в 100 мкл буфера FACS и анализировали связывание антител на клеточном анализаторе BD LRSFFortessa (BD Biosciences). Кривые связывания анализировали методом нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Из фиг. 34 видно, что как отдельные антитела, так и комбинация перекрестных антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G проявляла дозо-зависимое связывание с раковыми клетками HCT 116 человека.

Пример 37. Связывание антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G с DR5 макаки-крабоведа

Анализировали связывание очищенных IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G с клетками CHO, экспрессирующими короткую изоформу DR5 человека или DR5 макаки-крабоведа, методом проточной цитометрии. Создавали оптимизированные по кодам конструкции для экспрессии короткой изоформы белка DR5 человека с вызывающей потерю функции домена смерти мутацией K386N (SEQ ID NO 47 на основе номера доступа Uniprot 014763-2) и белка DR5 макаки-крабоведа с делецией аминокислот 185-213 и вызывающей потерю функции домена смерти мутацией K420N (SEQ ID NO 50 на основе номера доступа NCBI XP_005562887.1), как описано в примере 1. Связывание с трансфицированными DR5 клетками CHO обычно анализировали, как описано в примере 5. Трансфицированные клетки хранили в жидком азоте и быстро оттаивали при 37°C и суспендировали в 10 мл среды. Клетки промывали PBS и ресуспендировали в буфере FACS при концентрации $1,0 \times 10^6$ клеток/мл. По 100 мкл клеточных суспензий (100 000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные планшеты и осаждали центрифугированием при $300 \times g$ в течение 3 мин при 4°C. Добавляли 25 мкл серийного разведения препарата антител (конечные концентрации от 0 до 20 мкг/мл в 6-кратных разведениях) и инкубировали 30 минут при 4°C. Затем клетки промывали и инкубировали с 50 мкл вторичного антитела – конъюгированного с R-PE козьего антитела против IgG-F(ab')₂ человека

(Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-116-098, 1/100) в течение 30 мин при 4°C с защитой от света. Клетки дважды промывали 150 мкл буфера FACS, ресуспендировали в 50 мкл буфера FACS и анализировали связывание антител на клеточном анализаторе BD LRSFFortessa (BD Biosciences), регистрируя 10000 событий. Кривые связывания анализировали методом нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Из фиг. 35 видно, что антитела IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G проявляли дозо-зависимое связывание с DR5 человека и макаки-крабоведа, экспрессированным на клетках CHO. Значения EC_{50} для связывания с DR5 человека и DR5 макаки-крабоведа у IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G были в одном и том же диапазоне, исходя из 4 повторных экспериментов (табл. 10).

Таблица 10. Значения EC_{50} для связывания IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G с DR5 человека и макаки-крабоведа. На основе 4 экспериментов.

	Клетки CHO, трансфицированные DR5 человека		Клетки CHO, трансфицированные DR5 макаки-крабоведа	
	EC_{50} (мкг/мл)	SD	EC_{50} (мкг/мл)	SD
IgG1-hDR5-01-G56T-E430G	0,13	0,034	0,27	0,175
IgG1-hDR5-05-E430G	0,12	0,027	0,17	0,084

Пример 38. Введение мутации E430G улучшает эффективность индуцирования клеточной смерти комбинацией перекрестных антител IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05

Для изучения влияния усиливающей гексамеризацию мутации E430G в IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-05 на способность антител вызывать гибель раковых клеток COLO 205 толстой кишки человека проводили анализ жизнеспособности. Антитела с мутацией E430G и без неё тестировали в виде отдельных антител и в виде комбинации двух перекрестных антител. Клетки COLO 205 собирали, как описано в примере 8. По 100 мкл одноклеточных суспензий (5000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты из полистирола (Greiner Bio-One, кат. № 655182) и оставляли адгезироваться в течение ночи при 37°C. После этого добавляли 50 мкл образца серийных разведений антител (диапазон конечных концентраций 0,3-20000 нг/мл в 4-кратных разведениях) и инкубировали 3 дня при 37°C. В качестве положительного контроля клетки инкубировали с 5 мкМ стауроспорина (Sigma Aldrich, кат. № S6942). Жизнеспособность культивируемых клеток определяли с помощью набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в примере 8.

Из фиг. 36 видно, что комбинация IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G была более эффективной, чем каждое антитело само по себе, и более эффективной, чем комбинация антител без мутации E430G. Эти данные показывают, что введение усиливающей гексамеризацию мутации E430G приводит к усилению гибели клеток при связывании комбинации перекрестных антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G с адгезированными раковыми клетками COLO 205 толстой кишки. В отличие от такой постановки опытов, когда антитела добавляли прямо при посеве клеток (пример 8), одиночные антитела IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G не проявляли действия на клетки COLO 205 в этом эксперименте, когда клеткам сначала давали прикрепиться к 96-луночным плоскодонным планшетам, а затем добавляли образцы.

Пример 39. Введение усиливающей гексамеризацию мутации S440Y повышает эффективность индуцирования клеточной смерти антителами против DR5 на раковых клетках толстой кишки человека

Изучали влияние усиливающей гексамеризацию мутации S440Y на способность отдельных антител и комбинации IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 вызывать гибель раковых клеток COLO 205 толстой кишки человека по анализу жизнеспособности. Клетки собирали и проводили люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в примере 8. Вкратце, по 100 мкл одноклеточных суспензий (5000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные планшеты и в то же время добавляли 50 мкл серийных разведений препаратов антител (диапазон конечных концентраций от 0,0003 до 20 мкг/мл в 4-кратных разведениях) и инкубировали 3 дня при 37°C.

Из фиг. 37А видно, что при такой постановке опытов, когда антитела добавляли прямо при посеве клеток, введение усиливающей гексамеризацию мутации S440Y вызывает дозозависимое уничтожение клеток одиночными антителами IgG1-hDR5-01-G56T-S440Y и IgG1-hDR5-05-S440Y, тогда как исходные антитела дикого типа IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-05 не вызывают гибели раковых клеток COLO 205 толстой кишки. Также эффективность комбинации IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 улучшалась при введении мутации S440Y в оба антитела, о чем свидетельствует снижение EC₅₀ (фиг. 37В).

Пример 40. Введение усиливающей гексамеризацию мутации E430G повышает эффективность индуцирования клеточной смерти комбинацией антител против DR5 IgG1-DR5-CONA + IgG1-DR5-chTRA8

Проводили перекрестное блокирование по ELISA для антител IgG1-DR5-CONA-K409R и IgG1-DR5-chTRA8-F405L, как описано в примере 7. Мутации K409R и F405L не имеют значения и ранее было показано, что они не влияют на эффективность антител с

мутацией E430G (пример 22). На фиг. 38А представлена конкуренция за связывание, выраженная в виде степени ингибирования связывания DR5ECD-FcHistag с фиксированным антителом в присутствии конкурирующего антитела относительно связывания DR5ECD-FcHistag в отсутствие конкурирующего антитела ($\% \text{ ингибирования} = 100 - [(\text{связывание в присутствии конкурирующего антитела} / \text{связывание в отсутствие конкурирующего антитела}) \times 100]$). Связывание DR5ECD-FcHistag с фиксированным IgG1-DR5-CONA-K409R не ингибировалось в присутствии растворимого IgG1-DR5-chTRA8-F405L. И наоборот, связывание DR5ECD-FcHistag с фиксированным IgG1-DR5-chTRA8-F405L тоже не ингибировалось в присутствии растворимого IgG1-DR5-CONA-K409R. Эти данные означают, что IgG1-DR5-CONA-K409R и IgG1-DR5-chTRA8-F405L не конкурируют друг с другом за связывание DR5ECD-FcHistag.

Затем изучали влияние усиливающей гексамеризацию мутации E430G на способность комбинации перекрестных антител против DR5 IgG1-DR5-CONA-C49W + IgG1-DR5-chTRA8-8 вызывать гибель прикрепленных раковых клеток ВхРС-3 поджелудочной железы человека по анализу жизнеспособности, как описано в примере 11. Из фиг. 38В видно, что комбинация антител IgG1-DR5-CONA-C49W-E430G + IgG1-DR5-chTRA8-E430G с усиливающими гексамеризацию мутациями проявляет усиление дозо-зависимой гибели клеток ВхРС-3 по сравнению с комбинацией исходных антител без усиливающей гексамеризацию мутации E430G.

Пример 41. Способность комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G вызывать гибель клеток мишени в различных линиях раковых клеток

Анализировали способность комбинации перекрестных антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G вызывать гибель клеток у различных линий раковых клеток человека и сравнивали с комбинацией исходных антител без мутации E430G и с TRAIL. Проводили анализ жизнеспособности на раковых клетках НСТ-15, НСТ 116, НТ-29 и SW480 толстой кишки, ВхРС-3, НРАФ-II и PANC-1 поджелудочной железы, SNU-5 желудка, A549 и SK-MES-1 легких и A375 кожи, в основном как описано в примере 11. Вкратце, по 100 мкл одноклеточных суспензий (5000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37°C. Добавляли 50 мкл образца антител (конечная концентрация 133 нМ) или рекомбинантного TRAIL/APO-2L человека (eBioscience, кат. № BMS356; конечная концентрация 133 нМ) и инкубировали 3 дня при 37°C.

Как TRAIL, так и комбинация перекрестных антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G вызывали гибель клеток мишени в линиях раковых клеток чело-

века различного происхождения (фиг. 39). Комбинация антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G вызывала значительную гибель клеток по сравнению с контрольным антителом IgG1-b12 у 6 из 11 исследованных клеточных линий. У этих восприимчивых линий клеток процент жизнеспособных клеток был значительно ниже после инкубации с комбинацией антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G, чем после инкубации с комбинацией антител без мутации E430G. Не наблюдалось корреляции между эффективностью уничтожения у IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G и уровнем экспрессии DR5 в мишенях (описаны в примере 2).

Пример 42. Скрининг комплекта линий раковых клеток человека на цитотоксическое действие комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G

Проверяли активность комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G и сравнивали с активностью TRAIL на комплекте из 235 линий клеток, представляющих 14 линий происхождения опухолей: рак почек, нервной ткани, колоректальный рак, рак желудка, рак молочной железы (преимущественно троекратно отрицательный рак молочной железы (TNBC)), немелкоклеточный рак легких (NSCLC), рак мочевого пузыря, поджелудочной железы, яичников, меланома, рак печени, эндометрия, головы и шеи и мелкоклеточный рак легких (SCLC). Проводили 72-часовой анализ ATPlite (за исключением клеточных линий DLD-1 и HCT116, для которых проводили 120-часовой анализ) с анализом ингибирования роста в двух частях на фирме Horizon Discovery Ltd, UK. Образцы тестировали в четырех повторах в 384-луночных планшетах для анализа. Для всех исследуемых клеточных линий делали серийные разведения антител, начиная с конечной концентрации в 0,072 мкМ. Для TRAIL (Invitrogen; кат. № PHC1634) серийные разведения начинались с конечной концентрации в 0,01 мкМ для клеточных линий, тестируемых в первой части, и конечной концентрации в 0,17 мкМ для клеточных линий, тестируемых во второй части скрининга. Рассчитывали процент ингибирования по формуле: если $T \geq V(0)$, то процент ингибирования = $100 \times [1 - (T - V(0)) / (V - V(0))]$; если $T < V(0)$, то процент ингибирования = 100%, где T = люминесценция исследуемого образца, V(0) = люминесценция контрольного образца среды в день 0 и V = люминесценция контрольного образца среды в день 3. Линии клеток подразделяли на группы восприимчивых и невосприимчивых по пороговому значению максимального ответа, классифицирующему клеточные линии, проявляющие ингибирование $\geq 70\%$, как восприимчивые, а клеточные линии, проявляющие ингибирование $< 69\%$, как невосприимчивые (фиг. 40; табл. 11). Восприимчивые линии клеток как для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G), так и для обработки TRAIL

оказались у всех исследуемых линий происхождения опухолей, кроме мелкоклеточного рака легких (SCLC).

Таблица 11. Результаты для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для монотерапии TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon Discovery Ltd, UK, в отношении комплекта клеточных линий, представляющих различные раковые заболевания человека: рак почек (A), нервной ткани (B), колоректальный рак (C), рак желудка, (D), трехкратно отрицательный рак молочной железы (TNBC) (E), немелкоклеточный рак легких (NSCLC) (F), рак мочевого пузыря (G), поджелудочной железы (H), яичников (I), меланому (J), рак печени (K), эндометрия (L), головы и шеи (M) и мелкоклеточный рак легких (SCLC) (N). В таблицах приведены значения IC₅₀ и максимального ингибирования в процентах.

Таблица 11А. Результаты скрининга клеточных линий рака почек для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для обработки TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon, UK

Линия клеток	№ скрининга	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)
A704	1	0,475	99,7	3,443	77,1
A498	2	1,223	98,9	0,079	96,1
G-401	2	0,509	94,1	0,068	76,6
CAL-54	1	1,533	91,7	0,268	71,6
ACHN	2	0,843	89,9	0,356	32,4
SAKI-2	1	1,565	87,3		5,7
769-P	2	0,957	57,7	1,941	39,4
G-402	2	0,605	50,4	0,173	15,0
786-0	2	0,005	7,7	287,593	2,6

Таблица 11В. Результаты скрининга клеточных линий рака нервной ткани для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для обработки TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon, UK

Линия клеток	№ скрининга	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)
A172	2	0,888	100,0	0,029	98,2
SF295	2	0,764	99,2	0,023	87,5
SF126	2	0,713	98,9	0,013	85,6
H4	2	0,459	98,8	0,007	98,9
YH-13	2	1,248	94,4	0,317	39,5
U-87 MG	2	1,784	87,8	0,053	8,0
DBTRG-05MG	2	0,971	46,8	0,087	36,0

KNS-81	2	13,008	30,6	0,013	-6,6
SNB-75	2	3,225	14,2	105,178	9,6
NMC-G1	2	0,005	13,8	17,591	15,2

Таблица 11С. Результаты скрининга клеточных линий колоректального рака для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для обработки TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon, UK

Линия клеток	№ скрининга	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)
CL-11	1	0,620	100,0	1,318	85,9
GP2D	1	0,738	100,0	0,003	100,0
HT-115	1	2,101	100,0	0,107	99,7
SNU-1197	1	1,076	100,0	0,053	100,0
COLO-205	1	0,360	99,9	2,269	83,5
COLO-206F	1	0,200	99,9	0,146	99,2
CL-34	1	0,380	99,8	0,024	98,8
HRT-186	1	0,433	99,3	9,240	52,5
HCT-15	1	0,813	98,8	0,129	98,6
SNU-407	1	0,836	98,5	0,098	96,1
MDST8	1	1,035	93,6	1,190	58,3
COLO-201	1	0,568	93,6	0,168	89,1
HT55	1	1,025	91,0	0,110	76,4
SNU-175	1	1,813	90,1	0,122	96,2
HCT-116_ARID1A (Q456*/Q456*)	1	0,235	86,2	10,502	50,2
DLD-1	1	0,938	83,1	3,954	55,1
SNU283	1	5,628	81,9		40,3
CL-40	1	1,555	79,9	1,975	57,3
HCT-116_KRAS (+/-)	1	0,855	77,7	0,253	88,7
SW837	1	1,399	76,6	0,940	83,8
LOVO	1	4,512	75,7		44,5
LS-411N	1	3,549	73,1		26,9
HT-29	1	2,966	65,5		12,2
SNU1033	1	4,446	60,9	10,057	51,7
SW480	1	1,093	60,2	2,037	55,2
COLO-678	1	3,670	58,6		10,1
DLD-1_BRCA2 (-/-)	1	1,826	58,3	0,516	60,0
HCT-116_PIK3A (+/-)KO mt H1047R	1	0,756	57,8	1,251	59,8
C2BBE1	1		49,5		8,8
SNU-C2B	1		43,0	0,713	71,3
SW1116	1		42,4		23,1
HCT-116_PAR-007	1		29,0		14,2
HCT-116_TP53 (-/-)	1		19,6		17,2
SW1417	1		19,1		12,2
RKO	1		14,5		10,5
HCT-116_PTEN (-/-)	1		11,9		38,0
COLO320DM	1		10,1		8,0
COLO-320	1		9,9		3,9

Таблица 11D. Результаты скрининга клеточных линий рака желудка для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для обработки TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon, UK

Линия клеток	№ скрининга	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)
SNU-620	1	0,809	100,0	0,045	99,9
SNU-668	1	0,370	99,9	0,041	99,6
SNU-719	1	1,483	98,9	1,132	85,4
SNU-601	1	0,520	98,6	0,284	85,2
NUGC-3	1	0,671	96,7		38,7
GSU	1	0,169	96,4	0,454	81,6
SNU5	1	0,729	95,9	0,109	91,2
SNU-216	1	5,484	84,0		49,6
NCC-StC-K140	1	1,059	77,8		9,8
KE-97	1	1,175	57,2		23,4
LMSU	1	3,563	56,6		9,0
RERF-GC-1B	1		45,1		14,0
MKN1	1		36,8		10,5
SH-10-TC	1		31,6		34,9
ECC12	1		22,7		27,4
GSS	1		11,8		15,4
ECC10	1		8,3		14,0

Таблица 11E. Результаты скрининга клеточных линий рака молочной железы для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для обработки TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon, UK

Линия клеток	№ скрининга	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)
SUM159PT*	2	0,569	99,2	0,033	98,6
DU-4475*	2	1,102	94,5	0,079	87,0
HCC1806*	2	2,678	92,5	0,050	97,8
BT-549*	2	1,021	83,3	0,285	44,0
BT-20*	2	2,843	82,8	0,089	48,9
HCC1187*	2	1,521	82,8	0,066	99,4
MDA-MB-436*	2	0,762	77,7	0,053	76,3
HCC38*	2	0,903	70,6	0,080	96,9
HCC70*	2	18,703	69,3	346,839	3,6
HMC-1-8*	2	0,714	67,7	0,232	70,0
MDA-MB-231*	1	1,409	60,2	0,110	53,3
SK-BR-3	2	1,757	40,4	0,518	38,1
MDA-MB-468*	2	3,772	33,3	0,647	89,4
HCC1937*	2	8,548	28,0	0,647	28,5
T47D	2	2,557	17,1	346,732	8,4
MDA-MB-453*	2	0,723	13,0	34,643	20,7
MCF7	2	19,492	10,2	0,055	21,7

* TNBC

Таблица 11F. Результаты скрининга клеточных линий немелкоклеточного рака легких (NSCLC) для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для обработки TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon, UK

Линия клеток	№ скрининга	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)
DV-90	1	0,215	100,0	1,189	96,1
NCI-H820	1	0,857	99,7	0,023	100,0
LCLC-97TM1	1	1,202	96,6		4,6
COR-L23-CPR	1	0,707	96,0	5,482	58,4
LOU-NH91	1	0,529	94,8	5,382	63,0
LCLC-103H	1	0,548	92,2	8,018	54,2
T3M-10	1	1,058	90,1	0,495	83,7
LU-99	1	1,879	81,9		6,3
HOP-62	1	0,899	81,7		55,6
EPLC-272H	1	1,233	79,7		51,7
LUDLU-1	1	2,196	77,9	0,475	91,1
RERF-LC-KJ	1	2,771	71,4	0,633	68,9
LXF-289	1	3,582	62,7		12,7
COR-L105	1	2,990	57,5		35,7
LC-1sq	1	7,710	56,6	0,781	70,1
NCI-H460	1	15,034	53,3	0,853	86,1
LC1F	1		50,3	0,451	74,3
SW1573	1		46,1		13,9
LU-65	1		38,9		32,4
HLC-1	1		36,8		32,6
VMRC-LCD	1		21,6		19,2
LK-2	1		19,0		5,6
Calu-1	1		13,0		22,0
CAL-12T	1		10,4		11,9
COLO-699	1		7,7		2,8
BEN	1		7,5		8,1

Таблица 11G. Результаты скрининга клеточных линий рака мочевого пузыря для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для обработки TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon, UK

Линия клеток	№ скрининга	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)
5637	2	0,828	99,3	0,060	99,1
SW780	1	0,421	98,5	0,016	97,9
RT-112	2	3,520	96,1	0,325	50,9
RT4	2	4,638	95,5	0,244	91,5
UM-UC-3	1	0,906	94,4	0,005	99,4
TCCSUP	2	1,367	69,6	0,048	51,5
T-24	2	1,300	63,0	0,166	20,5
HT-1197	2	0,782	40,9	0,167	31,8
SCaBER	1	3,768	29,6	0,082	25,8
J82	1	68,272	15,9	33,567	11,5
HT-1376	2	67,114	15,3	159,873	10,6

Таблица 11Н. Результаты скрининга клеточных линий рака поджелудочной железы для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для обработки TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon, UK

Линия клеток	№ скрининга	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)
HuP-T3	1	0,728	91,8	0,223	88,4
PSN1	1	0,655	91,6	0,205	86,9
Panc 02,13	1	2,288	85,9	1,905	60,5
BxPC-3	1	0,448	83,9		46,5
KP-4	1	1,853	80,0		23,6
CFPAC-1	1	13,635	57,2		13,2
HPAF-II	1	9,896	56,9		13,3
KP-2	1	10,251	54,2		3,9
KLM-1	1		41,0		12,7
KP-3	1		37,3		23,5
SAPAN-2	1		20,6		4,8
PK-1	1		6,4	0,548	88,3

Таблица 11И. Результаты скрининга клеточных линий рака яичников для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для обработки TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon, UK

Линия клеток	№ скрининга	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)
SNU119	1	0,681	99,3	0,082	83,7
59M	1	0,846	98,6	0,049	98,5
JHOM-2B	1	8,294	82,0		21,7
COV434	1	1,093	80,4	0,395	73,1
OVCAR-5	1	2,731	79,0	1,120	70,6
OVK18	1	0,865	73,2	0,230	80,0
JHOM-1	1	1,835	68,8	0,596	58,1
COV644	1	3,375	68,2	0,271	74,9
MCAS	1	13,877	57,2	56,779	48,4
JHOS-4	1	73,734	49,6		12,5
OV7	1		48,3		20,4
COV504	1		19,0		11,7
OVTOKO	1		18,9		28,0
OVISE	1		13,5		4,0
KURAMOCHI	1		10,1		13,4
JHOC-5	1		8,5		18,4

Таблица 11Ж. Результаты скрининга клеточных линий меланомы для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для обработки TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon, UK

Линия клеток	№ скрининга	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)
COLO-679	1	0,524	99,5		24,9
COLO-783	1	0,503	98,2	0,224	80,9
COLO-800	1	0,365	95,7		33,5
Hs 294T	1	0,595	94,1	0,019	91,1
RVH-421	1	0,577	91,3		22,5
MEL-HO	1	0,760	89,2		16,7
WM-266-4	1	1,257	80,3		42,5
COLO858	1	0,567	68,1		12,6

MEL-JUSO	1	1,349	67,6	7,6
COLO-818	1	1,061	64,8	7,8
IGR-39	1	0,813	63,9	20,1
IGR-1	1	1,066	60,1	23,3
IGR-37	1	9,359	54,7	18,0
COLO-849	1		51,9	17,6
A375	1		51,2	47,1
Hs 936,T	1		41,0	20,7
SK-MEL-30	1		12,5	6,1
IPC-298	1		11,2	5,7
HMCB	1		7,0	1,0

Таблица 11К. Результаты скрининга клеточных линий рака печени для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для обработки TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon, UK

Линия клеток	№ скрининга	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)
SNU-878	1	0,709	99,5		36,2
SNU-308	1	1,521	98,8	0,937	72,4
HuH-28	1	0,903	96,7		17,5
SNU-478	1	2,097	82,2	0,516	83,3
HLE	1	0,315	81,9	8,360	56,0
SNU-869	1	1,842	68,8	2,951	58,6
Li-7	1	1,614	65,9		20,4
HuCC1	1	8,034	55,6		7,5
SNU-1196	1		44,8		44,3
HUH-6-clone5	1		42,3		20,2
SNU-1079	1		40,3		24,9
HuH-1	1		30,7		47,7
RH-41	1		10,1		3,0
SNU-761	1		9,1		7,1

Таблица 11Л. Результаты скрининга клеточных линий рака эндометрия для антител(IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для обработки TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon, UK

Линия клеток	№ скрининга	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)
HEC-265	1	0,399	100,0	0,021	100,0
MES-SA	1	0,510	100,0	0,107	92,6
JHUEM-2	1	0,613	89,6	0,165	66,4
RL95-2	1	1,649	88,0	0,155	97,7
SNG-II	1	1,049	79,3	1,028	77,2
JHUEM-3	1		46,2		18,4
TEN	1		43,2	1,205	70,0
HEC-1-A	1		39,6		22,8
HEC-108	1		32,8	1,479	64,9
MFE-296	1		22,7		8,7
COLO-684	1		14,3		16,6
SK-UT-1	1		13,4		10,9
HEC-1	1		13,2		8,1
MFE-280	1		11,4		11,0
HEC-50B	1		5,5		16,6

Таблица 11М. Результаты скрининга клеточных линий рака головы и шеи для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для обработки TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon, UK

Линия клеток	№ скрининга	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)
YD-15	1	1,369	100,0	0,114	100,0
TE-4	1	0,879	99,9	0,107	81,0
KYM-1	1	0,438	99,4		30,2
FTC-238	1	0,426	93,8	3,922	86,7
KYSE-70	1	1,346	79,2		46,0
TE-10	1	3,602	68,0		24,4
TE-6	1	7,502	61,9	3,923	55,3
TE-9	1	1,139	60,3	0,300	73,6
TE-1	1	3,051	58,3		23,0
BICR 31	1	4,670	52,6		38,9
KYSE-410	1		51,0		10,6
CJM	1		48,8		12,8
BICR 22	1		42,0		13,6
KYSE-30	1		38,0		8,0
SCC-15	1		34,8		19,4
TE-8	1		33,4		39,6
PE-CA-PJ34-cl C12	1		28,9		4,7
EC-GI-10	1		25,0		29,6
TE-5	1		23,0		11,6
HSC-4	1		12,8		0,5
YD-8	1		10,8		3,4
KYSE-270	1		7,1		5,4
BICR 18	1		-0,1		3,4

Таблица 11N. Результаты скрининга клеточных линий мелкоклеточного рака легких (SCLC) для антител (IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G) и для обработки TRAIL при определении по 3-дневному анализу жизнеспособности при скрининге на фирме Horizon, UK

Линия клеток	№ скрининга	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G		TRAIL	
		IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)	IC ₅₀ (нМ)	Макс. ингибирование (%)
LU-134-A	1		47,7		28,0
IST-SL2	1		24,4		21,0
NCI-H69	1		23,2		14,5
NCI-H345	1		19,2		16,4
LU-139	1		18,7		10,0
SHP-77	1		9,2		9,1
NCI-H446	1		7,3		11,7
LU-135	1		6,0		9,7

Пример 43. Способность комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G вызывать гибель раковых клеток при различных соотношениях в комбинации

Для изучения способности комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G вызывать гибель раковых клеток ВхРС-3 поджелудочной железы и раковых клеток НСТ-15 толстой кишки при различных соотношениях IgG1-hDR5-01-

G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G в комбинации проводили анализ жизнеспособности. Антитела тестировали при соотношениях 1:0, 9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:9 и 0:1 в серийных разведениях (конечные концентрации от 0,006 до 20 мкг/мл в 5-кратных разведениях) методом люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в примере 16.

При общей концентрации антител в 20 мкг/мл, 4 мкг/мл и 0,8 мкг/мл они одинаково эффективно вызывали гибель клеток ВхРС-3 (фиг. 41А) и НСТ-15 (фиг. 41В) при всех исследуемых соотношениях антител, содержащих оба антитела IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G. Напротив, одиночные антитела (соотношения 1:0 и 0:1) не вызывали гибели. При общей концентрации антител в 0,16 мкг/мл исследуемые комбинации IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G вызывали гибель клеток, хотя и в меньшей степени, чем при более высоких концентрациях антител, причем эффективность зависела от использования различных соотношений.

Пример 44. Комбинация антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G индуцирует зависимую от каспаз запрограммированную клеточную смерть

Для того, чтобы сравнить цитотоксичность комбинации вариантов антител IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-05 с усиливающей гексамеризацию мутацией E430G и без нее, проводили анализ жизнеспособности в присутствии и в отсутствие ингибитора каспаз. Проводили люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo с серийными разведениями антител или образцов TRAIL (конечные концентрации от 0,002 до 133 нМ в 4-кратных разведениях), как описано в примере 18.

Гибель клеток ВхРС-3 ингибировалась в присутствии пан-каспазного ингибитора Z-VAD-FMK для TRAIL и комбинаций антител IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 и IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G (фиг. 42). Эти данные показывают, что, как и TRAIL, комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 и IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G индуцируют зависимую от каспаз запрограммированную клеточную смерть.

Пример 45. Активация каспазы-3 и -7 при связывании комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G на раковых клетках человека

Измеряли активацию каспазы-3/7 по времени с помощью набора Caspase-Glo 3/7, в основном как описано в примере 20. Вкратце, клетки собирали посредством трипсинизации, пропускали через сетчатый фильтр, осаждали центрифугированием 5 минут при 1200 об/мин и ресуспендировали в культуральной среде при концентрации $1,6 \times 10^5$ клеток/мл. По 25 мкл одноклеточных суспензий (4000 клеток на лунку) высевали в 384-луночные культуральные планшеты (Perkin Elmer, кат. № 6007680) и инкубировали в течение

ние ночи при 37°C. Добавляли 25 мкл образца (конечная концентрация 26,6 нМ) и инкубировали в течение 1, 2, 4 и 6 часов при 37°C. Планшеты вынимали из инкубатора, чтобы температура понизилась до комнатной. Клетки осаждали центрифугированием 3 мин при 300×g. Удаляли 25 мкл супернатанта и заменяли на 25 мкл субстрата Caspase-Glo 3/7. После перемешивания встряхиванием в течение 1 мин при 500 об/мин планшеты инкубировали 1 час при комнатной температуре. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве Envision Multilabel Reader (PerkinElmer).

На протяжении 1, 2, 4 и 6 часов как TRAIL, так и комбинация антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G вызывала более быструю и более сильную активацию каспазы-3/7 в клетках ВхРС-3, чем комбинация антител дикого типа IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 без усиливающей гексамеризацию мутации (фиг. 43).

Пример 46. Эффективность *in vitro* комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G не требует присутствия вторичного сшивающего Fc средства

Для того, чтобы сравнить способность комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G вызывать гибель раковых клеток НСТ-15 толстой кишки человека и раковых клеток ВХРС-3 поджелудочной железы, проводили анализ жизнеспособности в отсутствие и в присутствии вторичного сшивающего антитела средства. Для сравнения в том же опыте тестировали IgG1-DR5-CONA, который обычно проявляет усиление гибели клеток в присутствии вторичного сшивающего антитела средства. Анализ жизнеспособности в отсутствие и в присутствии вторичного сшивающего антитела средства в основном проводили, как описано в примере 21. Вкратце, по 100 мкл одноклеточных суспензий (5000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37°C. Добавляли 50 мкл образца антител (конечная концентрация 4 мкг/мл) в отсутствие или в присутствии F(ab')₂-фрагментов козьего антитела против IgG человека и инкубировали 3 дня при 37°C. В качестве положительного контроля на гибель клеток инкубировали клетки с 5 мкМ стауроспорина. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли с помощью набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в примере 8.

Комбинация IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G вызывала сильную гибель клеток ВхРС-3 и НСТ15, причем цитотоксичность больше не усиливалась в присутствии вторичного сшивающего средства (фиг. 44). Напротив, эффективность IgG1-DR5-CONA и комбинации антител дикого типа IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 на клетках ВхРС-3 и НСТ15 повышалась в присутствии вторичного сшивающего средства. Эти данные показывают, что уничтожение раковых клеток ВхРС-3 и НСТ15 комбинацией

антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G не зависит от присутствия вторичного сшивающего Fc средства.

Пример 47. Активация комплемента при связывании IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G с клетками CHO, краткосрочно трансфицированными DR5 человека или макаки-крабоеда

Для изучения способности антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G к активации комплемента проводили анализ *in vitro* зависимой от комплемента цитотоксичности (CDC) и измеряли отложение компонента C3c комплемента на клетках CHO, подвергавшихся краткосрочной трансфекции короткой изоформой DR5 человека или макаки. Конструкции DR5 содержали мутацию K386N (человека) или K420N (макаки-крабоеда) в своих доменах смерти, чтобы предотвратить гибель при индукции апоптоза при связывании агонистических антител. Краткосрочную трансфекцию клеток CHO с DR5 человека или макаки (*Macaca fascicularis*) проводили, как описано в примере 1.

Для анализа CDC $0,1 \times 10^6$ клеток преинкубировали в круглодонных 96-луночных планшетах из полистирола (Greiner Bio-One, кат. № 650101) с серийными разведениями очищенных антител в общем объеме 80 мкл в течение 15 мин на качалке при комнатной температуре. Затем добавляли 20 мкл нормальной сыворотки человека (NHS; кат. № M0008, Sanquin, Amsterdam, Нидерланды) в качестве источника комплемента и инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 45 мин (конечная концентрация NHS 20%, конечные концентрации антител 0,003-10,0 мкг/мл в 3-кратных разведениях). Реакцию останавливали, помещая планшеты на лед, а затем осаждали клетки центрифугированием и заменяли супернатант на 30 мкл раствора 2 мкг/мл пропидия-иодида (PI; Sigma Aldrich, Zwijnaarde, Нидерланды). Содержание PI-положительных клеток определяли методом проточной цитометрии на приборе Intellicyt iQue™ (Westburg). Данные анализировали по наилучшим значениям аппроксимации нелинейной зависимости доза-эффект с лог-трансформацией концентраций в GraphPad PRISM 5.

Для анализа отложения C3b $0,1 \times 10^6$ клеток преинкубировали в круглодонных 96-луночных планшетах с серийными разведениями очищенных антител (конечные концентрации антител 0,003-10,0 мкг/мл в 3-кратных разведениях) в общем объеме 80 мкл в течение 15 мин на качалке при комнатной температуре. Затем добавляли 20 мкл C5-обедненной сыворотки (Quidel; кат. № A501) в качестве источника комплемента и инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 45 мин (конечная концентрация NHS 20%). Клетки осаждали, а затем инкубировали с 50 мкл меченого FITC поликлонального кроличьего антитела против компонента C3c человека (Dako; кат. № F0201; 2 мкг/мл) в буфере FACS в течение 30 мин при 4°C. Клетки дважды отмывали буфером FACS и

ресуспендировали в 30 мкл буфера FACS. Отложение C3b на клетках определяли методом проточной цитометрии на приборе Intellicyt iQue™ (Westburg). Данные анализировали по наилучшим значениям аппроксимации нелинейной зависимости доза-эффект с лог-трансформацией концентраций в GraphPad PRISM 5.

Для IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G наблюдалась зависимость от комплемента гибель клеток (фиг. 45A-B) и отложение C3b (фиг. 45C-D) на трансфицированных DR5 клетках CHO с кривыми доза-эффект как для одиночных антител, так и для комбинации. Эти данные показывают, что присущая IgG1-антителам IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G способность вызывать активацию комплемента при связывании с мишенью на поверхности клетки сохранялась как у одиночных антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G, так и у комбинации IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G.

Пример 48. Скрининг комбинаций лекарств на повышение эффективности комбинации антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G с помощью панели соединений на раковых линиях клеток толстой кишки человека

Для того, чтобы идентифицировать клинически значимые соединения, которые проявляют синергические ингибиторные эффекты в сочетании с комбинацией антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G, проводили скрининг 100 соединений, представляющих различные терапевтические классы, на потенциальную синергичность в раковых линиях клеток толстой кишки. Проводили 72-часовой (для LS-411N, SNU-C2B и SW480) или 120-часовой (для DLD-1 и HCT 116) анализ ATPlite с анализом ингибирования роста в виде оптимизированной матрицы комбинаций 6×6 в 384-луночных планшетах для анализа на фирме Horizon Discovery Ltd, UK. Все образцы тестировали в четырех повторах. Рассчитывали процент ингибирования роста по формулам: если $T \geq V(0)$, то процент ингибирования роста = $100 \times [1 - (T - V(0)) / (V - V(0))]$; если $T < V(0)$, то процент ингибирования роста = $100 \times [1 - (T - V(0)) / V(0)]$; где T = люминесценция исследуемого образца, $V(0)$ = люминесценция контрольного образца среды в день 0 и V = люминесценция контрольного образца среды в день 3. Для того, чтобы идентифицировать синергические эффекты, определяли среднее самопересечение активности для каждого терапевтического класса по репрезентативным соединениям. Для измерения комбинированных эффектов, превышающих аддитивность Loewe, фирма Horizon Discovery Ltd. разработала скалярную меру для характеристики силы синергического взаимодействия, именуемую “синергическим показателем”. Уравнение Synergy Score объединяет экспериментально наблюдаемый объем активности в каждой точке матрицы, превышающий модельную поверхность, численно полученную из активности компонентных агентов с использованием модели Loewe для

аддитивности. Дополнительные термины в уравнении Synergy Score используются для нормирования по различным коэффициентам разбавления, используемым для индивидуальных агентов, и для сравнения синергических показателей по всему эксперименту. Включение вентилля положительного торможения или множителя I_{data} устраняет шумы вблизи уровня нулевого эффекта и смещает результаты в сторону синергических взаимодействий, происходящих при высоких уровнях активности. Синергический показатель (S) рассчитывали по формуле: $S = \log f_x \log f_y \sum \max(0, I_{data}) (I_{data} - I_{Loewe})$, где $f_{x,y}$ = коэффициенты разбавления, используемые для каждого отдельного агента. Синергические показатели, превышающие среднее самопересечение плюс 3σ , рассматривались как кандидаты на синергию на уровне достоверности 99%.

В табл. 12 представлены синергические показатели для всех 100 исследуемых соединений. Синергия с комбинацией антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G наблюдалась для одной или нескольких клеточных линий с соединениями из разных терапевтических классов, включая химиотерапевтические средства (в том числе регуляторы цитоскелета и повреждающие ДНК/РНК средства), ингибиторы киназ, ингибиторы пути PI3K, ингибиторы RAS, модулирующие апоптоз средства, протеасомные ингибиторы, эпигенетические модуляторы (включая ингибиторы HDAC) и др. На фиг. 46 представлено 5 примеров эффекта ингибирования роста у исследуемых соединений в сочетании с комбинацией антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G. Примерами тех, которые усиливают действие IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G, являются бинапант (фиг. 46C), оксалиплатин (фиг. 46A), иринотекан (фиг. 46B) и паклитаксель (фиг. 46E), тогда как барициниб (фиг. 46D) является примером тех, что не оказывают влияния на активность IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G.

Таблица 12. Серым цветом выделены синергические показатели > среднего самопересечения плюс 3σ

Терапевтический класс	Соединение	Мишень	DLD-1	HCT-116	LS-411N	SNU-C2B	SW480
Регуляторы цитоскелета	винбластин	TUBB2	17,7	14,6	36,0	12,6	16,8
Регуляторы цитоскелета	доцетаксель	TUBB1	17,6	7,9	36,2	15,8	19,5
Регуляторы цитоскелета	паклитаксель	TUBB1	11,4	11,8	40,8	15,6	14,7
Регуляторы цитоскелета	винкристин	TUBB2	17,3	13,9	33,0	17,2	12,1
Регуляторы цитоскелета	винорелбин	TUBB2	5,9	8,1	21,5	11,0	7,7
Повреждающие ДНК/РНК средства	гемцитабин	антиметаболит	20,3	12,2	5,7	18,5	31,1
Повреждающие ДНК/РНК средства	цитарабин	антиметаболит	20,8	10,7	11,4	24,6	19,6
Повреждающие ДНК/РНК средства	даунорубин	ДНК-интеркалятор	13,8	5,5	10,4	17,5	16,7
Повреждающие ДНК/РНК средства	цисплатин	ДНК-алкилирующее средство	8,8	6,7	15,4	12,9	18,9
Повреждающие ДНК/РНК средства	карбоплатин	ДНК-алкилирующее средство	11,3	5,8	12,0	11,6	19,5
Повреждающие ДНК/РНК средства	оксалиплатин	ДНК-алкилирующее средство	2,8	3,1	10,0	13,1	5,8
Повреждающие ДНК/РНК средства	хлорамбуцил	ДНК-алкилирующее средство	4,6	1,0	3,8	11,4	7,9
Повреждающие ДНК/РНК средства	мелфалан	ДНК-алкилирующее средство	6,0	1,1	3,4	9,0	7,6
Повреждающие ДНК/РНК средства	метотрексат	антиметаболит	0,1	0,5	6,6	1,7	2,5
Повреждающие ДНК/РНК средства	дакарбазин	ДНК-алкилирующее средство	0,8	1,5	0,3	2,0	2,5
Повреждающие ДНК/РНК средства	флударабин	антиметаболит	0,5	0,9	0,1	3,1	0,3
Повреждающие ДНК/РНК средства	фторурацил	антиметаболит	1,2	1,0	1,1	0,4	0,8
Повреждающие ДНК/РНК средства	бендамустин	ДНК-алкилирующее средство	0,1	0	0,3	3,0	0,6
Повреждающие ДНК/РНК средства	темозоломид	ДНК-алкилирующее средство	0,1	0	0,1	0,6	0,8
Повреждающие ДНК/РНК средства	изофосфамид	ДНК-алкилирующее средство	0,1	0	0,2	0,3	0,1
Эпигенетические модуляторы	белинонат	HDAC	8,6	4,1	4,5	16,4	10,2
Эпигенетические модуляторы	(+)-JQ1	бромодомен BET	8,2	2,6	13,4	10,7	5,8
Эпигенетические модуляторы	децитабин	ДНК-метилтрансфераза	1,1	2,8	0	4,8	3,4
Ингибиторы пути PI3K	TIC10	Akt, ERK	15,5	2,2	23,3	13,1	3,4
Ингибиторы пути PI3K	GDC-0941	PI3K	4,9	2,0	12,4	7,1	12,9
Ингибиторы пути PI3K	AZD 8055	mTOR	3,0	1,7	10,0	12,2	3,9
Ингибиторы пути PI3K	PIK-93	PI4K, PI3K	1,0	1,2	5,2	5,1	4,1
Ингибиторы пути PI3K	BEZ235	mTOR, PI3K	2,4	1,4	1,1	5,4	3,2
Ингибиторы пути PI3K	темсиролимус	mTOR	0,7	0,6	0,6	4,5	1,6
Ингибиторы пути PI3K	эверолимус	mTOR	0,4	0,4	0,3	3,2	1,6
Ингибиторы пути PI3K	GSK1059615	mTOR, PI3K	0,4	0,6	0,4	0,8	1,7
Ингибиторы пути PI3K	IPI-145	PI3K	0	0	0,2	1,0	0,1
Ингибиторы пути PI3K	IC-87114	PI3K	0	0,1	0,2	0,1	0
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	кризотиниб	c-Met, Alk	13,4	7,7	16,1	5,4	8,9
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	RAF265	ингибитор RAF/VEGFR	5,6	2,5	10,5	13,7	4,5
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	дасатиниб	семейство киназ Abl и Src	11,4	1,9	7,8	1,0	10,2

Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	BMS-754807	IGFR, InsR, c-Met, TrkB	11,3	2,1	10,8	1,3	5,9
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	сунитиниб	VEGFR, PDGFR	9,2	0,7	7,2	1,4	5,2
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	XL184	VEGFR, c-Met, Ret, c-Kit, Flt, Tie, AXL	4,1	1,0	5,8	1,5	6,0
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	лапатиниб	EGFR, HER2	1,0	0,4	7,3	2,6	6,4
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	AP24534	семейство киназ Abl and Src	4,3	1,4	2,6	1,8	3,7
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	GSK1904529A	IGF-1R	1,4	0,2	6,0	2,7	2,2
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	эрлотиниб	EGFR	4,3	0,2	1,9	1,2	1,0
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	гефитиниб	EGFR	4,9	0,2	1,0	1,1	1,3
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	OSI-906	IGFR, InsR	0,5	0,1	1,7	1,0	3,5
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	маситиниб	c-Kit, PDGFR	0,6	0,3	1,4	1,7	1,9
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	BGJ398	FGFR	1,0	0,1	1,4	0,8	1,6
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	MGCD-265	c-Met, VEGFR	0,2	0,1	0,7	3,1	0,5
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	AST-1306	EGFR, HER2, HER4	0,3	0,1	1,8	0,7	0,9
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	нилотиниб	семейство киназ Abl и Src	0,1	0	0,2	1,7	0,4
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	PCI-32765	BTK	0,5	0	0,3	0,6	0,4
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	иматиниб	семейство киназ Abl и Src	0,2	0,1	0,3	0,3	0,3
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	INCB28060	c-Met	0,2	0,1	0	0,4	0
Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ	JNJ-38877605	c-Met	0,1	0	0,1	0,1	0
Регуляторы апоптоза	биринапант	XIAP, cIAP	5,8	16,4	61,2	37,0	54,5
Регуляторы апоптоза	TW-37	семейство Bcl	13,8	5,4	29,9	11,1	10,5
Регуляторы апоптоза	обатоклакс	семейство Bcl	6,1	1,6	22,8	4,7	11,8
Регуляторы апоптоза	YM155	сурвивин	5,2	0,5	9,0	11,5	12,1
Регуляторы апоптоза	PAC 1	каспаза	10,6	4,2	2,9	6,0	3,9
Регуляторы апоптоза	ABT-263	семейство Bcl	3,4	0	7,6	1,0	8,0
Регуляторы апоптоза	ABT-737	семейство Bcl	1,5	0	4,2	1,1	7,5
Регуляторы апоптоза	SB 415286	GSK3	0,4	0,8	2,1	0,7	3,8
Регуляторы апоптоза	SB-216763	GSK3	0,5	0,1	1,1	0,3	1,4
Регуляторы апоптоза	родственный TNF индуцирующий апоптоз лиганд	TRAIL	0	0	0,1	0,2	0,9
Регуляторы апоптоза	ABT-199	семейство Bcl	0	0	0,1	0	0
Ингибиторы топоизомераз	топотекан	Top1	20,3	5,0	29,0	21,2	30,5
Ингибиторы топоизомераз	тенипозид	Top2	18,8	6,2	29,3	19,8	25,1
Ингибиторы топоизомераз	10-гидроксикамптотецин	Top1	21,9	9,6	16,9	12,4	30,1
Ингибиторы топоизомераз	доксорубицин	Top2	16,2	4,6	9,4	18,0	20,5
Ингибиторы топоизомераз	иринотекан	Top1	15,0	4,4	6,8	13,4	24,7
Ингибиторы топоизомераз	этопозид	Top2	17,0	2,0	11,1	14,2	19,4
Ингибиторы топоизомераз	эпирубицин	Top2	15,6	4,9	5,8	15,1	17,7
	типифарниб	FTаза	3,1	3,3	24,3	7,2	5,0
	идасанутлин	MDM2	6,3	3,2	16,3	10,4	6,1

субероиланилид гидроксамовой кислоты		4,4	2,5	4,4	11,0	7,3
бортезомиб	протеасомы	3,0	2,6	7,2	7,5	8,9
GSK429286A		4,9	2,6	9,8	5,3	5,3
GF 109203X		4,3	3,0	5,3	1,6	6,2
AZD6244		1,5	2,7	0,7	0,6	11,7
траметиниб		4,1	4,0	0,9	0,6	7,2
сорафениб		2,6	0,5	6,0	2,9	3,9
энзастаурин		0,9	0,6	5,6	0,5	6,3
тамоксифен цитрат		0,3	0,3	8,0	0,7	2,9
Go 6976		2,9	0,9	1,9	1,7	3,1
олапариб		0,7	1,8	2,7	2,5	1,0
SP 600125		3,3	0,6	0,5	2,0	0,9
дабрафениб		2,2	0,7	0,5	0,5	3,1
GDC-0879		0,1	0,2	0,4	0,7	1,6
PLX-4032		0,6	0,1	0,6	0,5	1,0
барицитиниб	ингибитор JAK	0,1	0,1	1,1	0,6	0,1
JNK-IN-8	ингибитор JNK	0,2	0	0,1	1,1	0,4
дексаметазон		0,1	0	0,4	0,8	0
ABT-888		0,2	0,2	0,7	0,1	0
салирасиб		0,1	0,1	0	0,4	0,4
CP-690550	ингибитор JAK	0,1	0	0,6	0,1	0
GDC-0449		0,1	0	0,2	0,3	0,1
метилпреднизолон		0	0	0	0,6	0
помалидомид		0,1	0	0	0,5	0
преднизон		0,1	0	0,1	0,2	0
леналидомид		0	0	0,1	0,2	0

Таблица 12. Синергические показатели для 100 соединений из различных терапевтических классов, которые тестировали в сочетании с IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G методом анализа жизнеспособности на линиях раковых клеток толстой кишки LS-411N, SNU-C2B, SW480, DLD-1 и HCT 116. Синергические эффекты (показатели синергии > среднего самопересечения + 3σ) выделены серым цветом.

Пример 49. Эффективность *in vivo* антител против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G на модели подкожных ксенотрансплантатов COLO 205 рака толстой кишки

Оценивали противоопухолевое действие *in vivo* антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G для отдельных антител и комбинации обоих антител и сравнивали с исходными антителами без мутации E430G на модели подкожных ксенотрансплантатов COLO 205 рака толстой кишки. Инокуляцию раковых клеток, обработку мышей, измерение роста опухолей и определение конечной точки в основном выполняли, как описано в примере 26. Вводили 3×10^6 клеток в объеме 100 мкл PBS в бока 5–8-недельных самок мышей SCID (C.B-17/ICrHan[®] Hsd-Prkdc^{scid}; Harlan). Через 9 дней измеряли средний объем опухолей и мышей разбивали на группы с одинаковой дисперсией размера опухолей. Мышам вводили внутривенно (*i.v.*) 10 мкг (0,5 мг/кг) антитела в 200 мкл PBS на 9-й день. Мыши в контрольной группе получали 10 мкг (0,5 мг/кг) IgG1-b12.

Таблица 13. Опытные группы и дозировка

Кол-во мышей	Прошли анализ	Антитело	Общая доза антител	День введения после прививки опухоли
8	8	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G	0,5 мг/кг	9
8	8	IgG1-hDR5-05-E430G	0,5 мг/кг	9
8	8	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G IgG1-hDR5-05-E430G	0,5 мг/кг	9
8	8	IgG1-hDR5-01-G56T	0,5 мг/кг	9
8	8	IgG1-hDR5-05	0,5 мг/кг	9
8	8	IgG1-hDR5-01-G56T IgG1-hDR5-05	0,5 мг/кг	9
8	8	IgG1-b12 (100 мкг)	0,5 мг/кг	9

На фиг. 47А представлены средние объемы опухолей в каждой опытной группе по времени. Введение мутации E430G в одиночные антитела IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G приводило к усилению ингибирования роста опухолей по сравнению с исходными антителами без мутации E430G. Обработка комбинациями антител вызывала полную регрессию опухолей как для IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G, так и для комбинации исходных антител без мутации E430G. На 19-й день средний размер опухолей во всех группах, получавших антитела к DR5, был значительно меньше, чем у животных, получавших антитело отрицательного контроля IgG1-b12 (критерий Манна-Уитни ($p < 0,001$)) (данные не приводятся). На фиг. 47В представлен график развития опухолей Каплана-Мейера с порогом отсечения при объеме опухолей $> 500 \text{ мм}^3$. По сравнению с мышами, получавшими антитело отрицательного контроля IgG1-b12, рост

опухолей значительно замедлялся во всех группах, получавших антитела против DR5 (анализ Мантеля-Кокса с порогом отсечения при размерах опухолей в 500 мм³: $p < 0,0001$). Мыши, получавшие одиночные антитела IgG1-hDR5-01-G56T и IgG1-hDR5-05 без усиливающих гексамеризацию мутаций E430G, проявляли рост опухолей значительно раньше, чем мыши, получавшие другие исследуемые антитела против DR5 (анализ Мантеля-Кокса с порогом отсечения при размерах опухолей в 500 мм³: $p < 0,0001$).

Пример 50. Эффект усиливающей гексамеризацию мутации на эффективность *in vivo* комбинации антител против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 на модели подкожных ксенотрансплантатов HCT15 рака толстой кишки

Сравнивали противоопухолевое действие *in vivo* комбинации антител против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G с таковой у IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 без E430G усиливающей гексамеризацию мутации на модели подкожных ксенотрансплантатов HCT15 рака толстой кишки на фирме CrownBiosciences, Taicang, Китай. Клетки поддерживали *in vitro* в виде монослойной культуры в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Собирали адгезированные клетки в экспоненциальной фазе роста путем обработки трипсином-ЭДТА. Вводили 5×10⁶ клеток в объеме 100 мкл PBS в бока 7–9-недельных самок мышей BALB/c nude. Содержание и использование животных во время исследования проводилось в соответствии с правилами Ассоциации по оценке и аккредитации содержания лабораторных животных (AAALAC). Измеряли объемы опухолей два раза в неделю в двух измерениях с помощью кронциркуля и выражали объем в мм³ по формуле: $V = 0,5a \times b^2$, где a и b – длинный и короткий диаметр опухоли, соответственно. Мышей разбивали на группы по схеме рандомизованных блоков и начинали обработку, когда средний размер опухолей достигал 161 мм³ (по 8 мышей на группу). Мышам трижды по схеме Q7D вводили внутривенно (*i.v.*) 0,5 мг/кг антитела (по 0,25 мг/кг каждого антитела в комбинации). Мышам в контрольной группе параллельно вводили 0,5 мг/кг IgG1-b12.

На фиг. 48А представлены средние объемы опухолей по опытным группам. Комбинация антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G проявляла лучшее ингибирование роста опухолей, чем IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05. На 21-й день средний размер опухолей у мышей, получавших комбинацию IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G, был значительно меньше, чем у мышей, получавших эквивалентную дозу IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05 (критерий Манна-Уитни: $p < 0,0011$) (фиг. 48В). На фиг. 48С представлен график развития опухолей Каплана-Мейера с порогом отсечения при объеме опухолей > 750 мм³. Рост опухолей у мышей, получавших комбинацию IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G, наступал значительно позже,

чем у мышей, получавших эквивалентную дозу IgG1-hDR5-01-G56T + IgG1-hDR5-05.

Эти данные показывают, что введение усиливающей гексамеризацию мутации E430G в комбинацию антител против DR5 IgG1-DR5-01-K409R-E430G + IgG1-DR5-05-F405L-E430G приводило к усилению ингибирования роста опухолей на модели ксенотрансплантатов *in vivo* с раковыми клетками HCT15 толстой кишки человека.

Пример 51. Эффективность *in vivo* антител против DR5 IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G в сочетании с паклитакселем на модели подкожных ксенотрансплантатов SK-MES-1 рака легких человека

Оценивали противоопухолевое действие *in vivo* IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G в комбинации с паклитакселем на модели подкожных ксенотрансплантатов SK-MES-1 рака легких человека на фирме CrownBiosciences, Taicang, Китай. Культивирование клеток, инокуляцию опухолевых клеток, обработку мышей, измерение роста опухолей и определение конечной точки проводили, как описано в примере 33. Через 21 день после инокуляции опухолей их средний размер достигал 167 мм³, мышей разбивали на группы по схеме рандомизированных блоков и начинали обработку. Мышам дважды по схеме Q7D вводили внутривенно (*i.v.*) 2 мг/кг антитела и 15 мг/кг паклитакселя, и то, и другое в 10 мкл PBS на 1 г массы тела, как указано в табл. 14.

Таблица 14. Опытные группы и дозировка, пример 53

Кол-во мышей	Соединение	Общая доза	День введения после рандомизации
8	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G IgG1-hDR5-05-E430G	2 мг/кг	0, 7
8	Паклитаксель	15 мг/кг	0, 7
8	IgG1-hDR5-01-G56T-E430G IgG1-hDR5-05-E430G Паклитаксель	2 мг/кг антител + 15 мг/кг паклитакселя	0, 7
8	IgG1-b12	2 мг/кг	0, 7

На фиг. 49А представлены средние объемы опухолей по опытным группам. Введение одних лишь антител (2 мг/кг IgG1-hDR5-01-G56T-E430G+IgG1-hDR5-05-E430G) или введение 2 мг/кг антител в комбинации с 15 мг/кг паклитакселя или 15 мг/кг одного лишь паклитакселя – все проявляли противоопухолевое действие по сравнению с IgG1-b12. На фиг. 49В представлен объем опухолей по опытным группам в день 16. Во всех опытных группах опухолевая нагрузка была значительно ниже по сравнению с IgG1-b12 (критерий Манна-Уитни, $p < 0,01$). На фиг. 49С представлен график развития опухолей Каплана-Мейера с порогом отсечения при объеме опухолей > 500 мм³. Комбинация 15

мг/кг паклитакселя с 2 мг/кг антител IgG1-hDR5-01-G56T-E430G + IgG1-hDR5-05-E430G значительно продлевала выживаемость без прогрессирования по сравнению с одним лишь паклитакселем или антителами (критерий Gehan-Breslow-Wilcoxon, порогом отсечения размера опухолей 500 мм³: $p < 0,05$).

Пример 52. Фармакокинетический (PK) анализ IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G

Изучали скорость выведения IgG1-hDR5-01-G56T-E430G и IgG1-hDR5-05-E430G в эксперименте по PK на мышах SCID для отдельных соединений и для комбинации двух антител в сравнении с исходными антителами без мутации E430G.

7-10 недельным самкам мышей SCID (C.B-17/IcrHan[®] Hsd-Prkdc^{scid}; Harlan) (по 3 мыши на группу) вводили внутривенно 20 мкг антитела (1 мг/кг) в объеме инъекции 200 мкл. Брали пробы крови 50-100 мкл из подкожной вены через 10 мин, 4 ч, 1 день, 2 дня, 7 дней, 14 дней и 21 день после введения антител. Кровь собирали в содержащие гепарин флаконы и центрифугировали 5 минут при 10000 g. Образцы плазмы разводили 1:20 для первых четырех точек времени (15 мкл образца в 285 мкл PBSA (PBS с добавлением 0,2% бычьего сывороточного альбумина (BSA))) и 1:10 для последних двух временных точек (образец 30 мкл образца в 270 мкл PBSA) и хранили при -20°C до определения концентрации антител.

Общие концентрации IgG человека определяли методом “сэндвич”-ELISA. В качестве захватного антитела использовали мышинное mAb клона MH16 против IgG-каппа человека (CLB Sanquin, кат. № M1268), которым в 100 мкл покрывали 96-луночные планшеты Microlon ELISA (Greiner, Германия) в течение ночи при 4°C в концентрации 2 мкг/мл в PBS. Планшеты блокировали путем инкубации с PBSA на качалке для планшетов в течение 1 часа при комнатной температуре. После отмывки добавляли 100 мкл образца серийного разведения плазмы (в диапазоне 0,037-1 мкг/мл в 3-кратных разведениях) и инкубировали на качалке для планшетов в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали 300 мкл PBST (PBS с добавлением 0,05% Tween 20), а затем инкубировали на качалке для планшетов в течение 1 ч при комнатной температуре со 100 мкл меченого пероксидазой козьего иммуноглобулина против IgG человека (№ 109-035-098, Jackson, West Grace, PA; 1:10000 в PBST с добавлением 0,2% BSA). Планшеты опять трижды отмывали 300 мкл PBST, а затем инкубировали 15 минут при комнатной температуре со 100 мкл субстрата - 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) [ABTS; Roche, кат. № 11112 422001; 1 таблетка в 50 мл буфера ABTS (Roche, кат. № 11112 597001)], защищая от света. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2% щавелевой кислоты и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Измеряли поглощение на

считывающем устройстве (Biotek, Winooski, VT) при 405 нм. Рассчитывали концентрации, используя инъецируемый материал в качестве контрольной кривой. В качестве контроля включали очищенный IgG1 человека (The binding site, кат. № BP078). Концентрации IgG человека (в мкг/мл) наносили на график (фиг. 50А) и вычисляли площадь под кривой (AUC) с помощью GraphPad Prism 6.0. Определяли клиренс вплоть до последнего дня отбора проб крови (день 21) по формуле $D \times 1000 / AUC$, где D означает вводимую дозу (1 мг/кг) (фиг. 50В).

Не наблюдалось отличий в скорости клиренса из плазмы между IgG1-hDR5-01-G56T-E430G или IgG1-hDR5-05-E430G и их исходными антителами без мутации E430G при введении как по отдельности, так и в комбинации (фиг. 50).

Пример 53. Антитело против DR5 IgG1-DR5-CONA с усиливающей гексамеризацию мутацией E430G способно уничтожать раковые клетки толстой кишки человека

Настоящее исследование иллюстрирует способность антитела против DR5 IgG1-DR5-CONA с усиливающей гексамеризацию мутацией E430G уничтожать прикрепленные раковые клетки COLO 205 толстой кишки. Клетки COLO 205 собирали, как описано в примере 8. По 100 мкл одноклеточных суспензий (5000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37°C. Добавляли 50 мкл образца серийного разведения антитела (конечные концентрации от 0,04 до 10 мкг/мл в 4-кратных разведениях) и инкубировали 3 дня при 37°C. В качестве положительного контроля клетки инкубировали с 5 мкМ стауроспорина. Жизнеспособность культивируемых клеток определяли с помощью набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано в примере 8. Измеряли люминесценцию на считывающем устройстве EnVision Multilabel Reader (Perkin-Elmer). Данные анализировали и строили графики методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Содержание жизнеспособных клеток рассчитывали по следующей формуле: % жизнеспособных клеток = $[(\text{люминесценция образца с антителом} - \text{люминесценция образца со стауроспорином}) / (\text{люминесценция образца без антитела} - \text{люминесценция образца со стауроспорином})] \times 100$.

Из фиг. 51 видно, что введение усиливающей гексамеризацию мутации E430G приводило к дозо-зависимой гибели клеток под действием IgG1-DR5-CONA-E430G, тогда как исходное антитело дикого типа IgG1-DR5-CONA было неспособно уничтожать прикрепленные раковые клетки COLO 205 толстой кишки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, содержащее Fc-область иммуноглобулина IgG человека и антигенсвязывающий участок, связывающийся с DR5 человека, причем Fc-область содержит мутацию в положении аминокислоты, соответствующей E430, E345 или S440 в IgG1 человека по нумерации EU.

2. Антитело по п. 1, при этом Fc-область содержит мутацию, выбранную из числа E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W и S440Y.

3. Антитело по п. 1 или 2, при этом Fc-область содержит мутацию, выбранную из E430G и E345K.

4. Антитело по любому из п.п. 1-3, при этом Fc-область дополнительно содержит мутацию, выбранную из K439E или S440K.

5. Антитело по любому из п.п. 1-4, при этом антигенсвязывающий участок связывается с эпитопом на DR5 человека, включающем или нуждающемся в одном или нескольких аминокислотных остатках, расположенных в пределах аминокислотных остатков 116-138, и одним или несколькими аминокислотными остатками, расположенными в пределах аминокислотных остатков 139-166 по SEQ ID NO: 46.

6. Антитело по любому из п.п. 1-4, при этом антигенсвязывающий участок связывается с эпитопом на DR5 человека, включающем или нуждающемся в одном или нескольких аминокислотных остатках, расположенных в пределах аминокислотных остатков 79-138 по SEQ ID NO: 46.

7. Антитело по любому из п.п. 1-6, при этом антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую домены CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую домены CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности:

a) (V_H) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6;

b) (V_H) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6;

c) (V_H) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14;

d) (V_H) SEQ ID NOs: 16, 17, 18 и (V_L) SEQ ID NOs: 21, GAS, 22 или

e) (V_H) CDR1, CDR2, CDR3 и (V_L) CDR1, CDR2 и CDR3, как определено выше в любом из пунктов a)–d), содержащие от одной до пяти мутаций или замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR.

8. Антитело по любому из п.п. 1-7, при этом антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (V_H) и переменную область легкой цепи (V_L), имеющие аминокислотные последовательности:

a) (V_H) SEQ ID NO:4 и (V_L) SEQ ID NO:7;

- b) (V_H) SEQ ID NO:9 и (V_L) SEQ ID NO:7;
- c) (V_H) SEQ ID NO:12 и (V_L) SEQ ID NO:15;
- d) (V_H) SEQ ID NO:19 и (V_L) SEQ ID NO:23;
- e) (V_H) SEQ ID NO:20 и (V_L) SEQ ID NO:23 или
- f) (V_H) и (V_L), как определено выше в любом из пунктов а)–е), содержащие от одной до 5 мутаций или замен в общей сложности по данным последовательностям (V_H) и (V_L).

9. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD или IgM.

10. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело относится к изотипу IgG1.

11. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело относится к аллотипу IgG1m(f), IgG1m(a), IgG1m(z), IgG1m(x) или смешанному аллотипу.

12. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом Fc-область включает аминокислотную последовательность из следующей группы:

- a) SEQ ID NO:29;
- b) SEQ ID NO:30;
- c) SEQ ID NO:31;
- d) SEQ ID NO:32 или
- e) аминокислотную последовательность, определенную выше в любом из пунктов а)–d), содержащую от одной до 5 мутаций или замен в общей сложности по данной последовательности.

13. Антитело по любому из предыдущих пунктов, содержащее тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем LC включает последовательность SEQ ID NO:39, а HC включает одну из следующих последовательностей:

- a) (HC) SEQ ID NO:33;
- b) (HC) SEQ ID NO:34;
- c) (HC) SEQ ID NO:35;
- d) (HC) SEQ ID NO:36;
- e) (HC) SEQ ID NO:37;
- f) (HC) SEQ ID NO:38; или
- g) (HC), как определено выше в любом из пунктов а)–f), содержащая от одной до 5 мутаций или замен в общей сложности по данной последовательности (HC).

14. Антитело по любому из предыдущих пунктов, содержащее тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем LC включает последовательность SEQ ID NO:43, а HC вклю-

чает одну из следующих последовательностей:

- a) (HC) SEQ ID NO:40;
- b) (HC) SEQ ID NO:41;
- c) (HC) SEQ ID NO:42; или

d) (HC), как определено выше в любом из пунктов а)–с), содержащая от одной до 5 мутаций или замен в общей сложности по данной последовательности (HC).

15. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело представляет собой моноклональное антитело.

16. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело является человеческим, гуманизованным или химерным.

17. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело является агонистическим.

18. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело индуцирует запрограммированную клеточную смерть у клетки-мишени типа зависимой от каспаз клеточной смерти.

19. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело индуцирует апоптоз у клетки-мишени, экспрессирующей DR5.

20. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело снижает жизнеспособность клетки.

21. Композиция, включающая по меньшей мере одно антитело по любому из предыдущих пунктов.

22. Композиция по п. 21, включающая одно или несколько антител по любому из предыдущих пунктов.

23. Композиция по п. 21, которая включает первое антитело и второе антитело, как определено в любом из предыдущих пунктов 1-20.

24. Композиция по п. 23, при этом данное первое антитело и данное второе антитело связываются с разными эпитопами на DR5 человека.

25. Композиция по любому из п.п. 23-24, при этом данное первое антитело, связывающееся с DR5 человека, не блокирует связывание данного второго антитела с DR5 человека.

26. Композиция по любому из п.п. 21-25, при этом первое антитело включает следующие 6 последовательностей CDR:

- a) (V_H) SEQ ID NOs: 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6,

а второе антитело включает следующие 6 последовательностей CDR:

- b) (V_H) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14,

или же первое антитело и второе антитело включает:

с) шесть последовательностей CDR, определенных выше в пункте а) или б), содержащих от одной до 5 мутаций или замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, соответственно.

27. Композиция по любому из п.п. 21-25, при этом первое антитело включает следующие 6 последовательностей CDR:

а) (V_H) SEQ ID NOs: 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs: 5, FAS, 6,

а второе антитело включает следующие 6 последовательностей CDR:

б) (V_H) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14,

или же первое антитело и второе антитело включает:

с) шесть последовательностей CDR, определенных выше в пункте а) или б), содержащих от одной до 5 мутаций или замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, соответственно.

28. Композиция по любому из п.п. 21-25, при этом первое антитело включает следующие 6 последовательностей CDR:

а) (V_H) SEQ ID NOs: 16, 17, 18 и (V_L) SEQ ID NOs: 21, GAS, 6,

а второе антитело включает следующие 6 последовательностей CDR:

б) (V_H) SEQ ID NOs: 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs: 13, RTS, 14,

или же первое антитело и второе антитело включает:

с) шесть последовательностей CDR, определенных выше в пункте а) или б), содержащих от одной до 5 мутаций или замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, соответственно.

29. Композиция по любому из п.п. 23-28, при этом первое антитело и второе антитело присутствуют в композиции в молярном соотношении от 1:49 до 49:1, как-то в молярном соотношении 1:1, молярном соотношении 1:2, молярном соотношении 1:3, молярном соотношении 1:4, молярном соотношении 1:5, молярном соотношении 1:6, молярном соотношении 1:7, молярном соотношении 1:8, молярном соотношении 1:9, молярном соотношении 1:10, молярном соотношении 1:15, молярном соотношении 1:20, молярном соотношении 1:25, молярном соотношении 1:30, молярном соотношении 1:35, молярном соотношении 1:40, молярном соотношении 1:45, молярном соотношении 1:50, молярном соотношении 50:1, молярном соотношении 45:1, молярном соотношении 40:1, молярном соотношении 35:1, молярном соотношении 30:1, молярном соотношении 25:1, молярном соотношении 20:1, молярном соотношении 15:1, молярном соотношении 10:1, молярном соотношении 9:1, молярном соотношении 8:1, молярном соотношении 7:1, молярном соотношении 6:1, молярном соотношении 5:1, молярном соотношении 4:1,

молярном соотношении 3:1, молярном соотношении 2:1.

30. Композиция по любому из предыдущих пунктов, при этом первое антитело и второе антитело присутствуют в композиции в молярном соотношении 1:1.

31. Композиция по любому из п.п. 21-30, при этом композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

32. Биспецифическое антитело, содержащее один или несколько антигенсвязывающих участков по любому из п.п. 1-14 и 16-20.

33. Биспецифическое антитело по п. 32, которое содержит первый антигенсвязывающий участок и второй антигенсвязывающий участок, как определено в любом из п.п. 1-14 и 16-20.

34. Биспецифическое антитело по любому из п.п. 32-33, при этом первый антигенсвязывающий участок и второй антигенсвязывающий участок связывают разные эпитопы на DR5 человека.

35. Биспецифическое антитело по любому из п.п. 32-34, при этом связывание первого антигенсвязывающего участка с DR5 человека не блокирует связывание второго антигенсвязывающего участка с DR5 человека.

36. Биспецифическое антитело по любому из п.п. 32-35, при этом первый антигенсвязывающий участок включает следующие 6 последовательностей CDR:

а) (V_H) SEQ ID NOs 1, 2, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а второй антигенсвязывающий участок включает следующие 6 последовательностей CDR:

б) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

или же первый антигенсвязывающий участок и второй антигенсвязывающий участок включает:

с) шесть последовательностей CDR, определенных выше в пункте а) или б), содержащих от одной до 5 мутаций или замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, соответственно.

37. Биспецифическое антитело по любому из п.п. 32-35, при этом первый антигенсвязывающий участок включает следующие 6 последовательностей CDR:

а) (V_H) SEQ ID NOs 1, 8, 3 и (V_L) SEQ ID NOs 5, FAS, 6,

а второй антигенсвязывающий участок включает следующие 6 последовательностей CDR:

б) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

или же первый антигенсвязывающий участок и второй антигенсвязывающий участок включает:

с) шесть последовательностей CDR, определенных выше в пункте а) или б), содержащих от одной до 5 мутаций или замен в общей сложности по всем 6 последователь-

ностям CDR, соответственно.

38. Биспецифическое антитело по любому из п.п. 32-35, при этом первый антигенсвязывающий участок включает следующие 6 последовательностей CDR:

а) (V_H) SEQ ID NOs 16, 17, 18 и (V_L) SEQ ID NOs 21, GAS, 22,

а второй антигенсвязывающий участок включает следующие 6 последовательностей CDR:

б) (V_H) SEQ ID NOs 10, 2, 11 и (V_L) SEQ ID NOs 13, RTS, 14,

или же первый антигенсвязывающий участок и второй антигенсвязывающий участок включает:

с) шесть последовательностей CDR, определенных выше в пункте а) или б), содержащих от одной до 5 мутаций или замен в общей сложности по всем 6 последовательностям CDR, соответственно.

39. Биспецифическое антитело по любому из п.п. 32-38, при этом биспецифическое антитело включает Fc-область, содержащую первую и вторую тяжелую цепь, причем первая тяжелая цепь содержит мутацию, соответствующую F405L в IgG1 человека, а вторая тяжелая цепь содержит мутацию, соответствующую K409R в IgG1 человека по нумерации EU.

40. Биспецифическое антитело по любому из п.п. 32-38, при этом биспецифическое антитело включает Fc-область, содержащую первую и вторую тяжелую цепь, причем первая тяжелая цепь содержит мутацию, соответствующую K409R в IgG1 человека, а вторая тяжелая цепь содержит мутацию, соответствующую F405L в IgG1 человека по нумерации EU.

41. Биспецифическое антитело по любому из п.п. 32-40, при этом биспецифическое антитело входит в фармацевтическую композицию.

42. Композиция по любому из п.п. 21-31 или 41, при этом композиция дополнительно включает фармацевтический носитель.

43. Композиция по любому из п.п. 21-31 или 41-42 для применения в качестве лекарственного средства.

44. Композиция по любому из п.п. 21-31 или 41-43 для применения при лечении инфекционных заболеваний, аутоиммунных заболеваний или сердечно-сосудистых заболеваний.

45. Композиция по любому из п.п. 21-31 или 41-43 для применения при лечении твердых опухолей и/или гематологических опухолей.

46. Композиция по п. 45 для применения при лечении таких твердых опухолей, как колоректальный рак, включая колоректальную карциному и колоректальную аденокарциному, рак мочевого пузыря, остеосаркома, хондросаркома, рак молочной железы,

включая троекратно отрицательный рак молочной железы, рак центральной нервной системы, включая глиобластому, астроцитому, нейробластому, невриному, саркому, нейроэндокринные опухоли, рак шейки матки, рак эндометрия, рак желудка, включая аденокарциному желудка, рак головы и шеи, рак почек, рак печени, включая гепатоцеллюлярную карциному, рак легких, включая NSCLC и SCLC, рак яичников, рак поджелудочной железы, включая карциному протоков поджелудочной железы и аденокарциному поджелудочной железы, саркома или рак кожи, включая злокачественную меланому и немеланомный рак кожи.

47. Композиция по п. 45 для применения при лечении таких гематологических опухолей, как лейкемия, включая хроническую лимфоцитарную лейкемию и миелоидную лейкемию, включая острую миелоидную лейкемию и хроническую миелоидную лейкемию, лимфома, включая неходжкинскую лимфому, или множественная миелома, включая лимфому Ходжкина, а также миелодиспластические синдромы.

48. Композиция по любому из п.п. 21-31, 42-43 или 45-47 для применения при ингибировании роста экспрессирующих DR5 опухолей.

49. Композиция по любому из п.п. 21-31, 42-43 или 45-47 для применения при индуцировании апоптоза в экспрессирующих DR5 опухолях.

50. Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая одну или несколько последовательностей, приведенных в таблице 1.

51. Конструкция из нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело по любому из п.п. 1-20 и 32-41.

52. Экспрессионный вектор, содержащий одну или несколько конструкций из нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 50 и 51.

53. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по п. 51.

54. Клетка-хозяин по п. 53, при этом клетка-хозяин представляет собой рекомбинантную клетку-хозяин, как-то рекомбинантную прокариотическую клетку, рекомбинантную эукариотическую клетку или рекомбинантную микробную клетку-хозяин.

55. Способ лечения индивида с раком, включающий введение данному индивиду эффективного количества антитела или композиции по любому из предшествующих п.п. 1-42.

56. Способ по п. 55, дополнительно включающий введение дополнительного терапевтического средства.

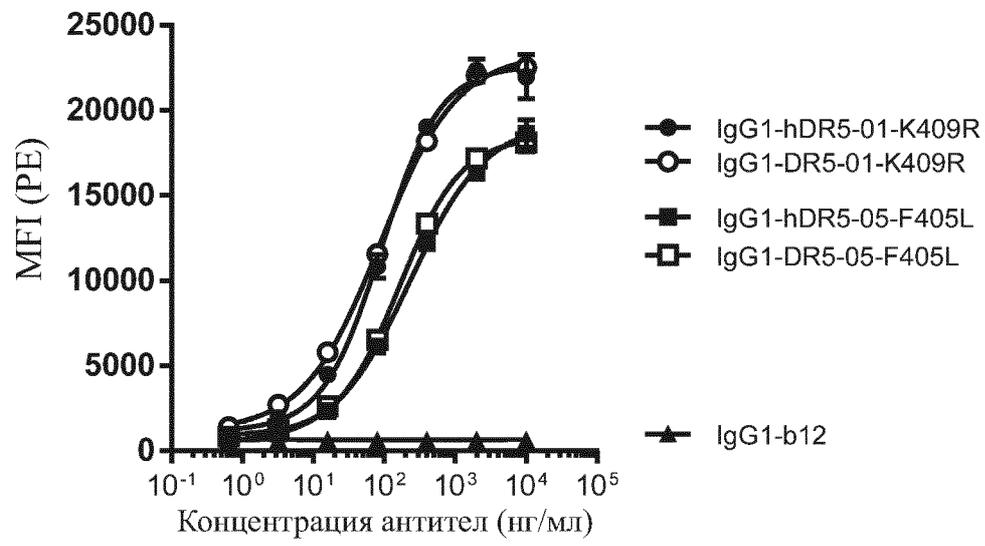
57. Способ по п. 56, при этом дополнительным терапевтическим средством является одно или несколько противораковых средств, выбранных из группы, состоящей из химиотерапевтических средств (включая, без ограничения, паклитаксель, темозоломид,

цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, иринотекан, доксорубин, гемцитабин, 5-фторурацил, пеметрексед), ингибиторов киназ (включая, без ограничения, сорафениб, сунитиниб или эверолимус), средств, модулирующих апоптоз (включая, без ограничения, рекомбинантный TRAIL человека или биринапант), ингибиторов RAS, ингибиторов протеасом (включая, без ограничения, бортезомиб), ингибиторов гистондеацетилаз (включая, без ограничения, вориностат), нутрицевтиков, цитокинов (включая, без ограничения, IFN- γ), антител или миметиков антител (включая, без ограничения, антитела и миметики антител против EGFR, против IGF-1R, против VEGF, против CD20, против CD38, против HER2, против PD-1, против PD-L1, против CTLA4, против CD40, против CD137, против GITR) и конъюгаты типа антитело-препарат.

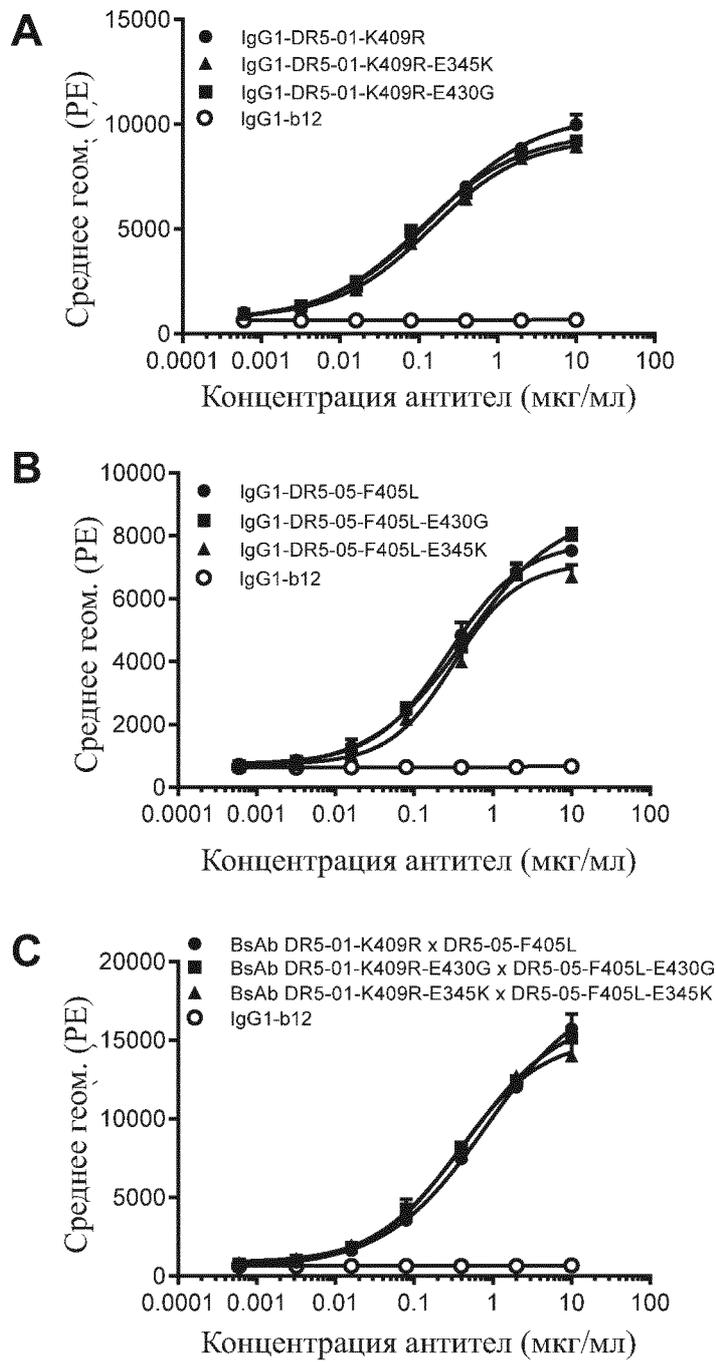
58. Набор компонентов, содержащий антитело или композицию по любому из п.п. 1-42, причем данное антитело или композиция находится в одном или нескольких контейнерах типа флаконов.

59. Набор компонентов по п. 58, при этом антитело или композиция по любому из предыдущих пунктов предназначается для одновременного, отдельного или поочередного применения в терапии.

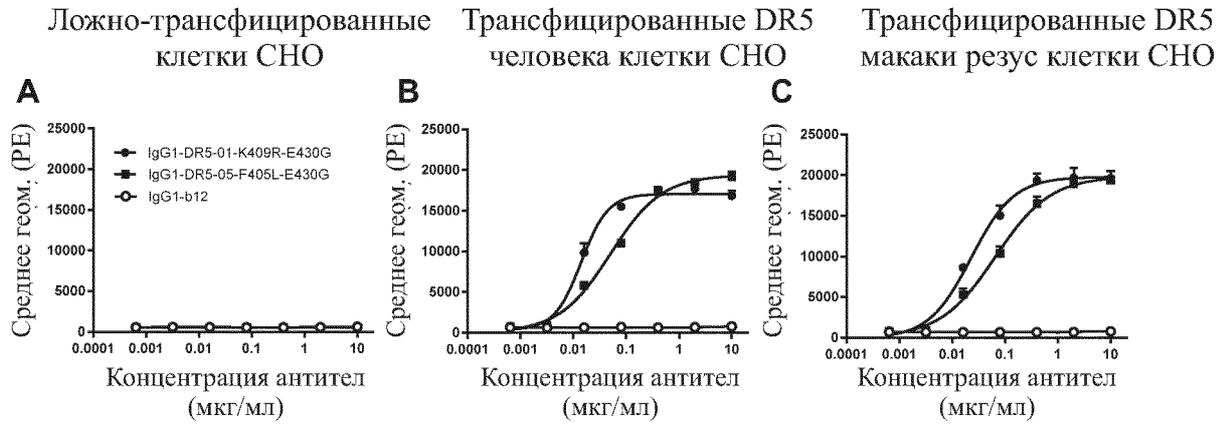
60. Применение антитела или композиции по любому из п.п. 1-42 для изготовления лекарственного средства для лечения рака.



Фиг. 2

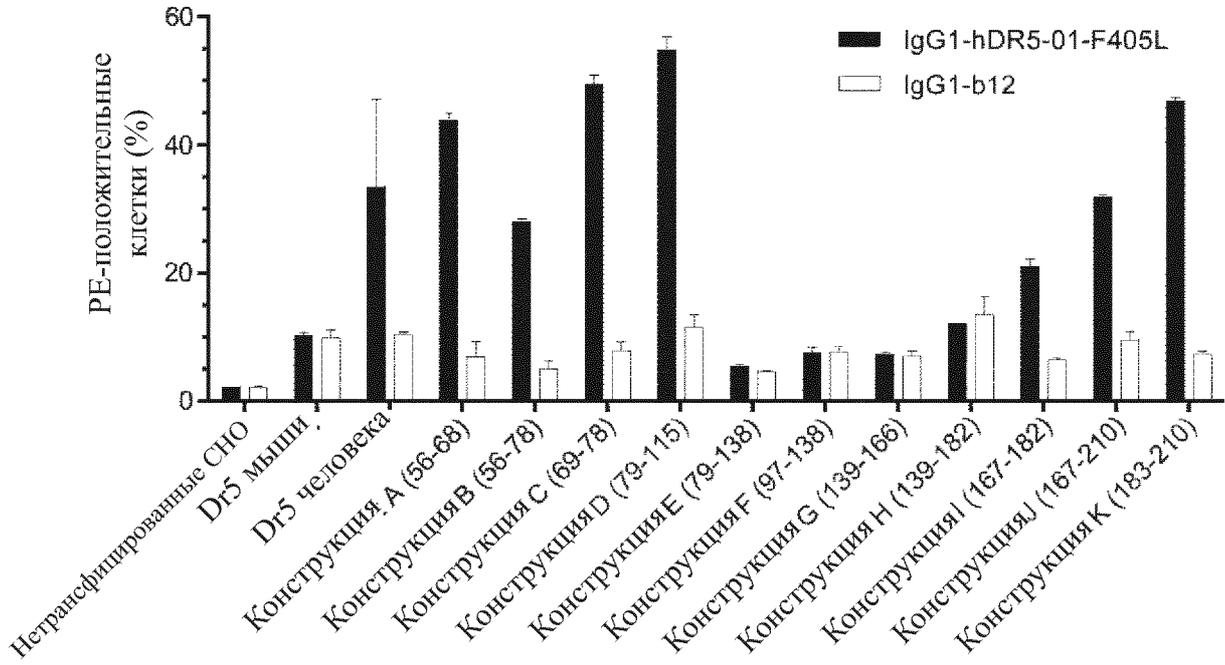


ФИГ. 3

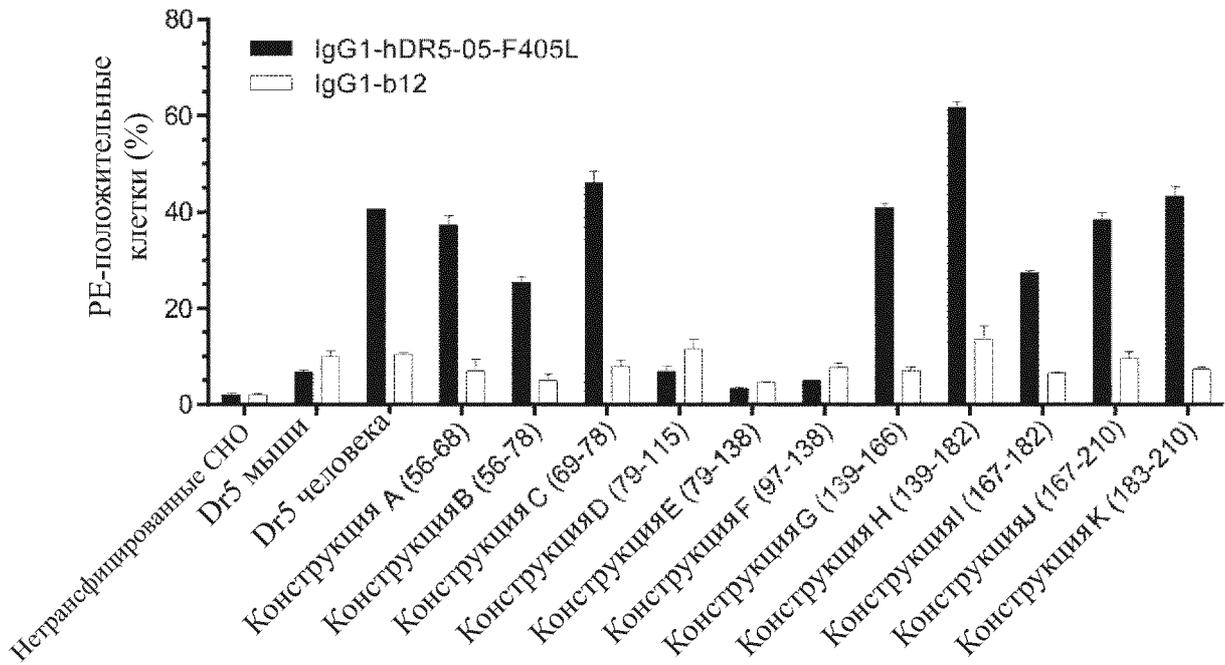


Фиг. 4

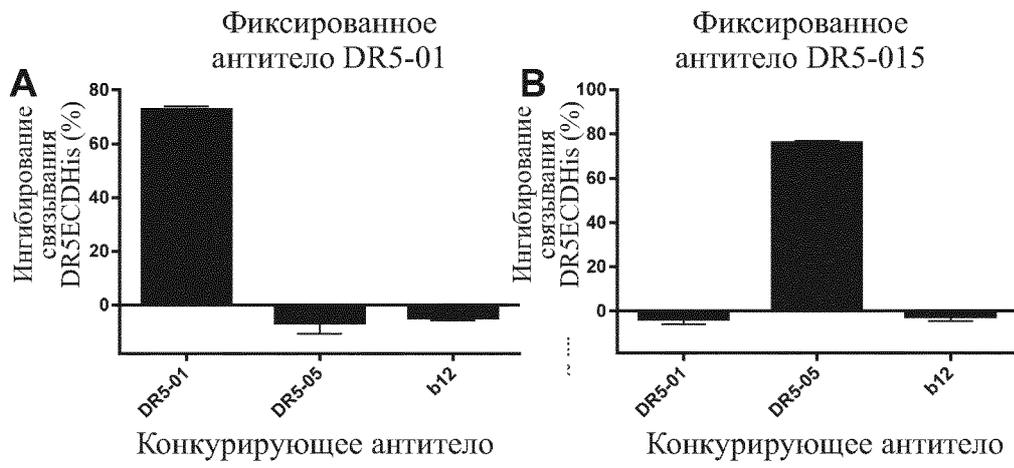
C



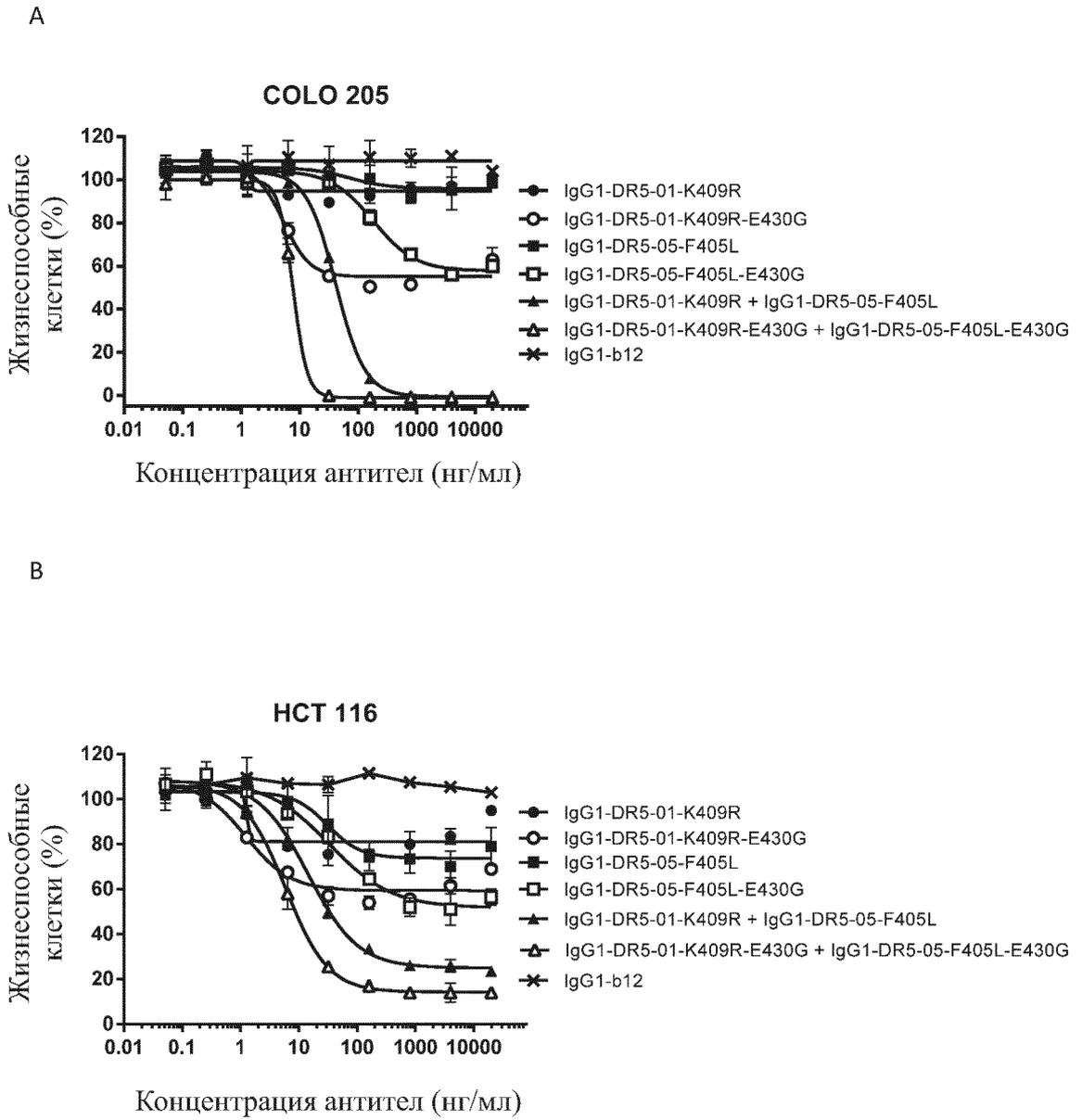
D



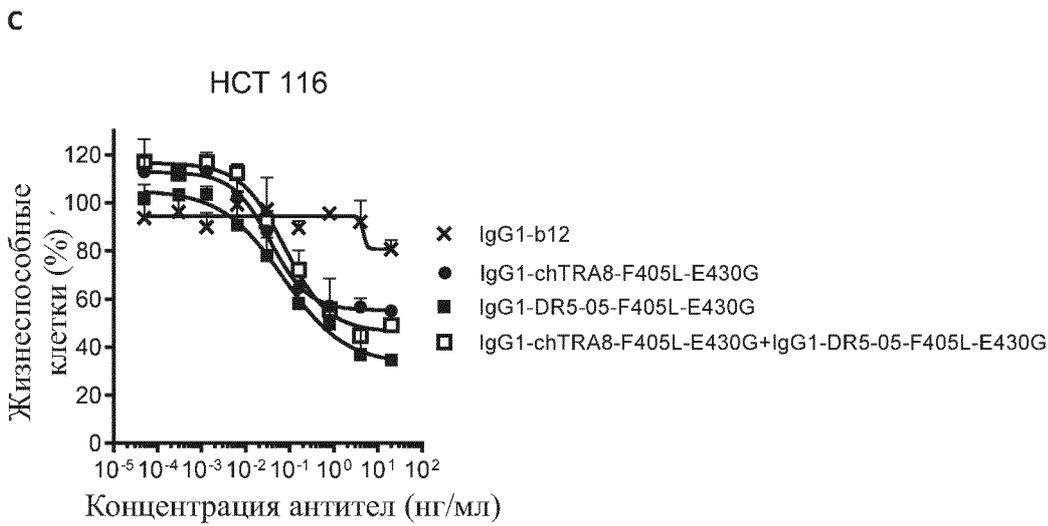
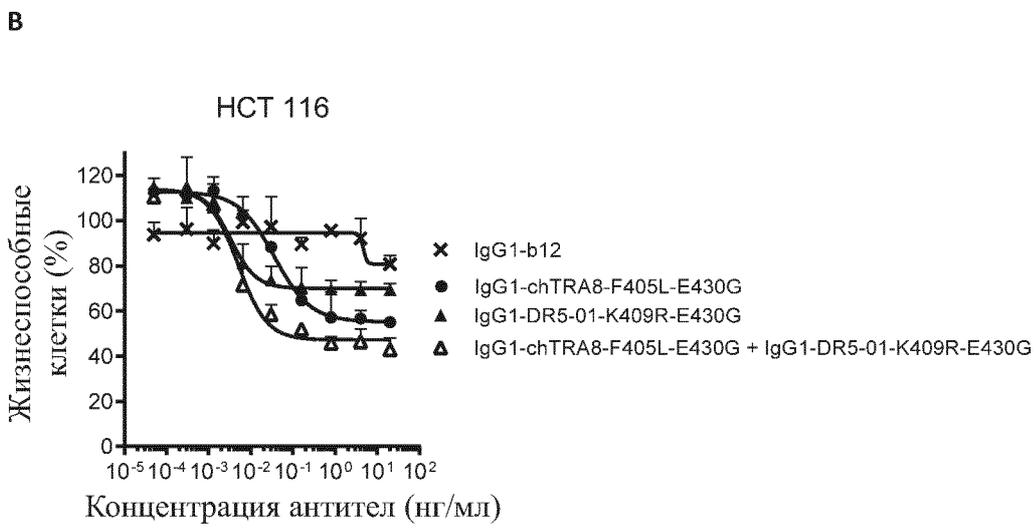
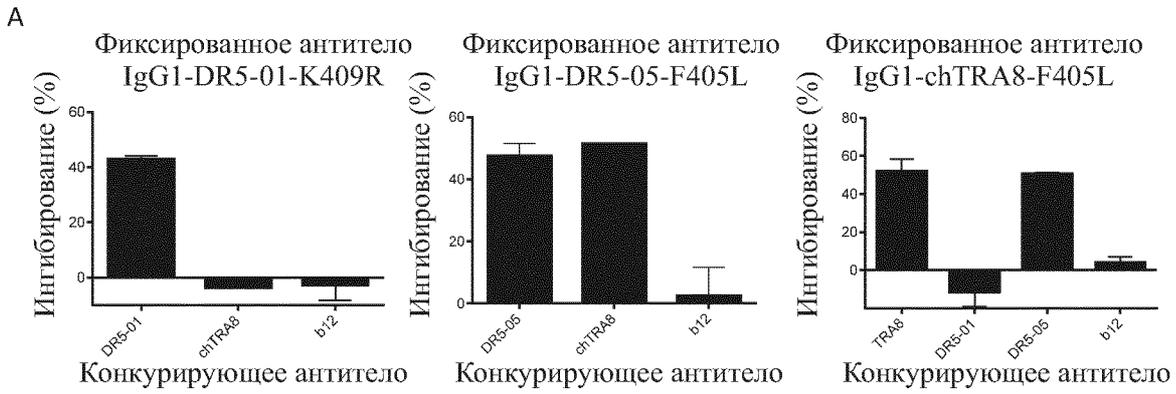
Фиг. 5 продолжение



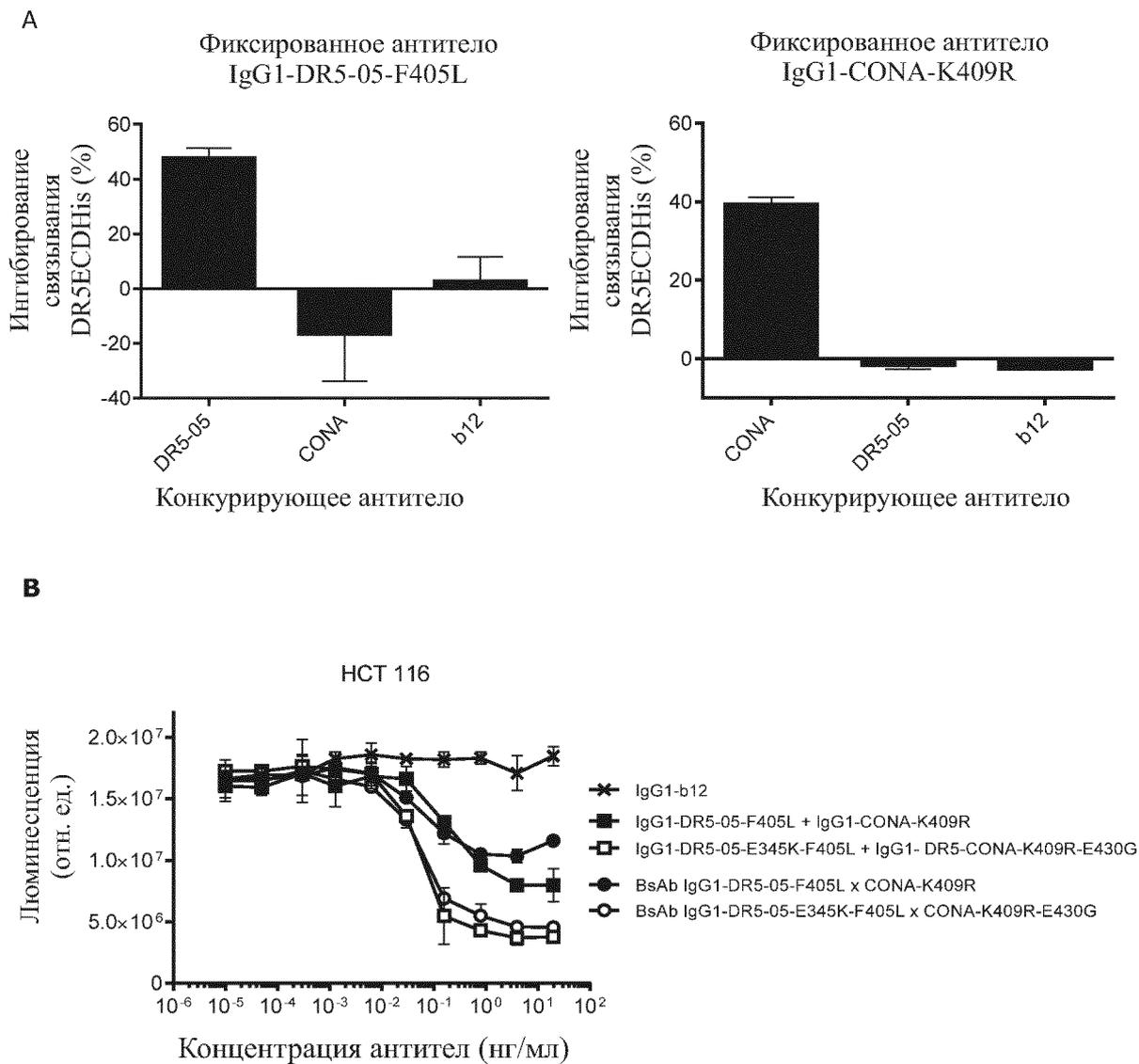
Фиг. 6



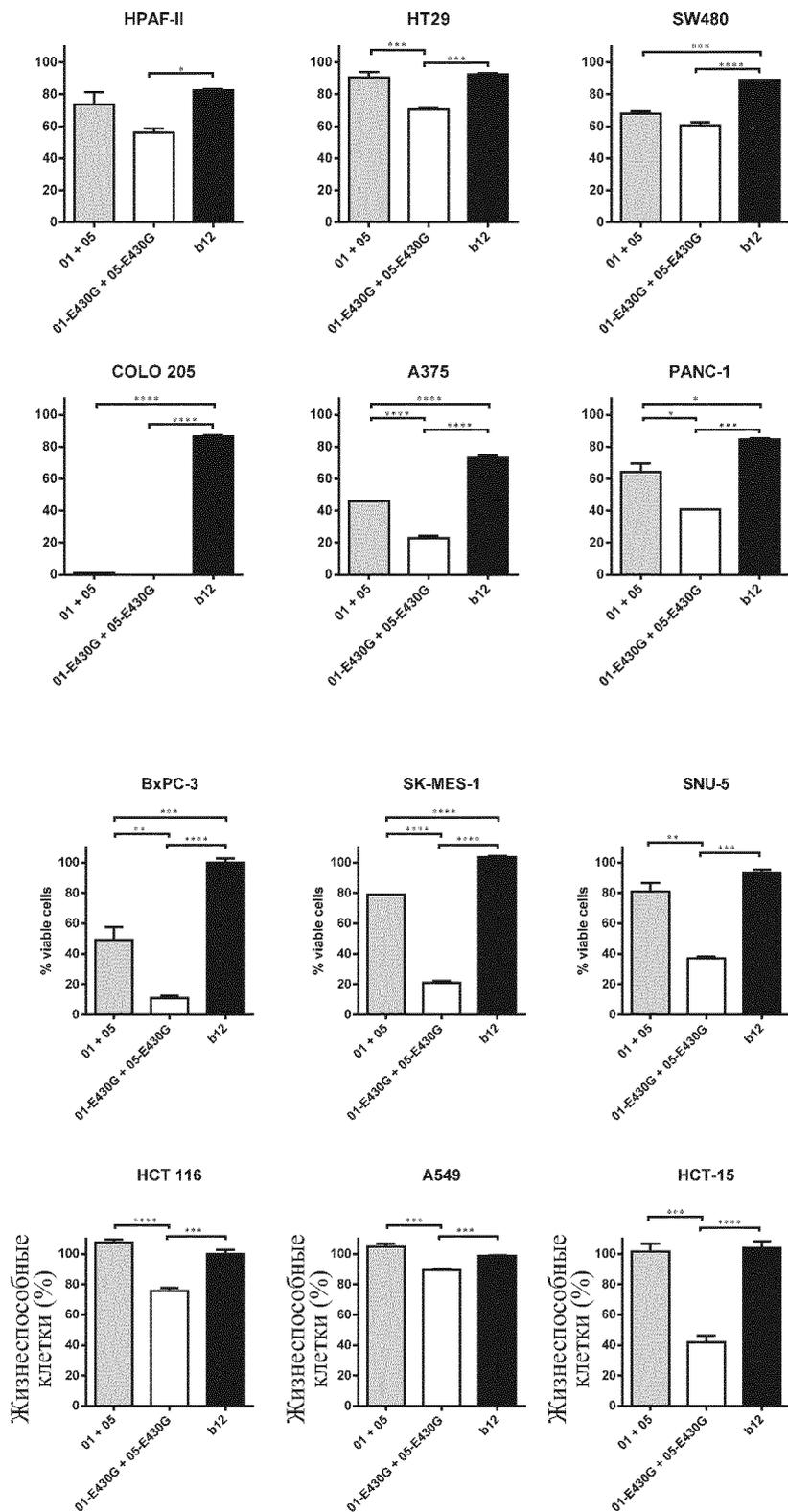
ФИГ. 7



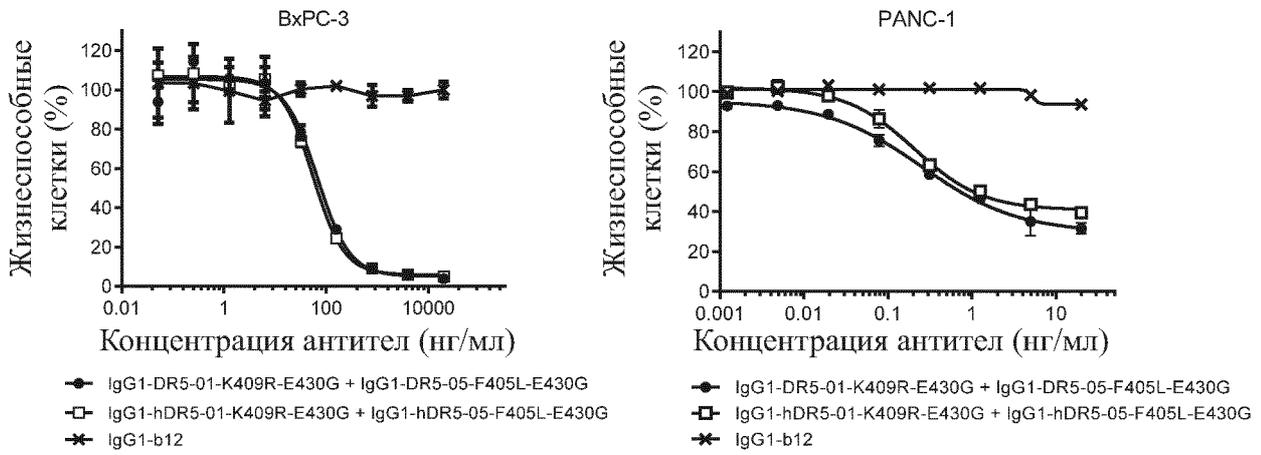
Фиг. 8



Фиг. 9

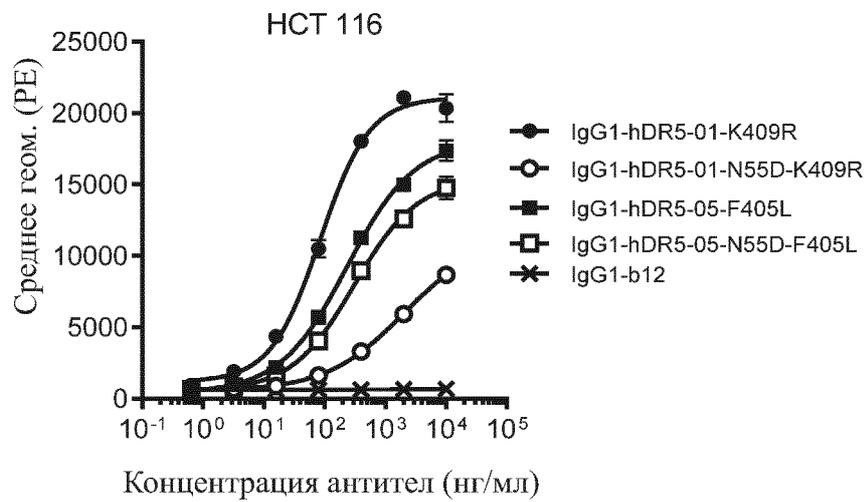


Фиг. 10

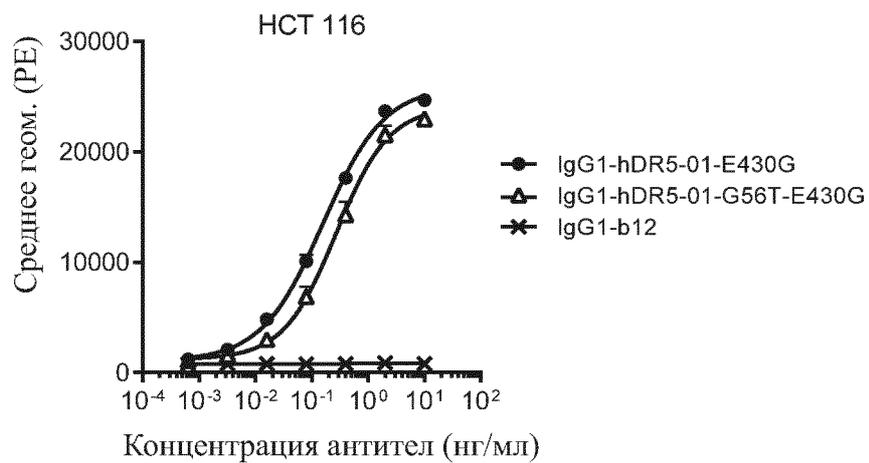


Фиг. 11

A

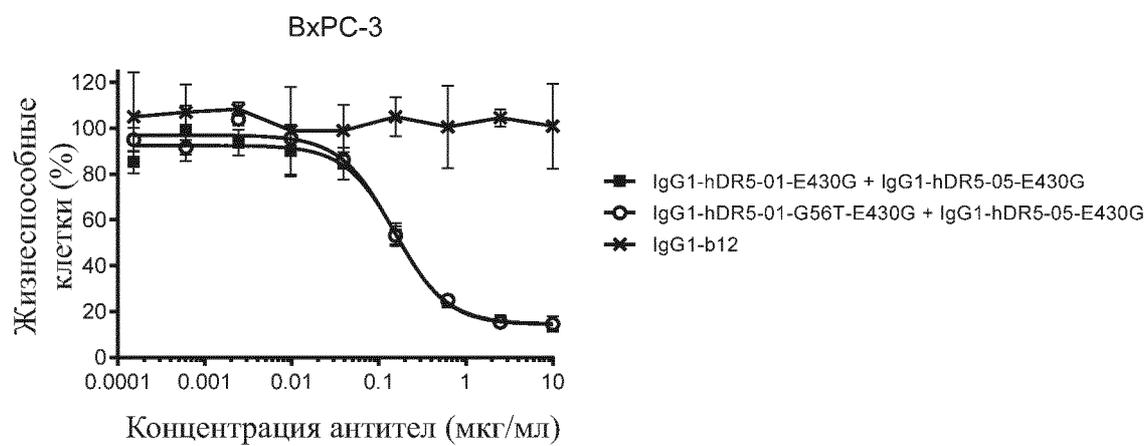


B

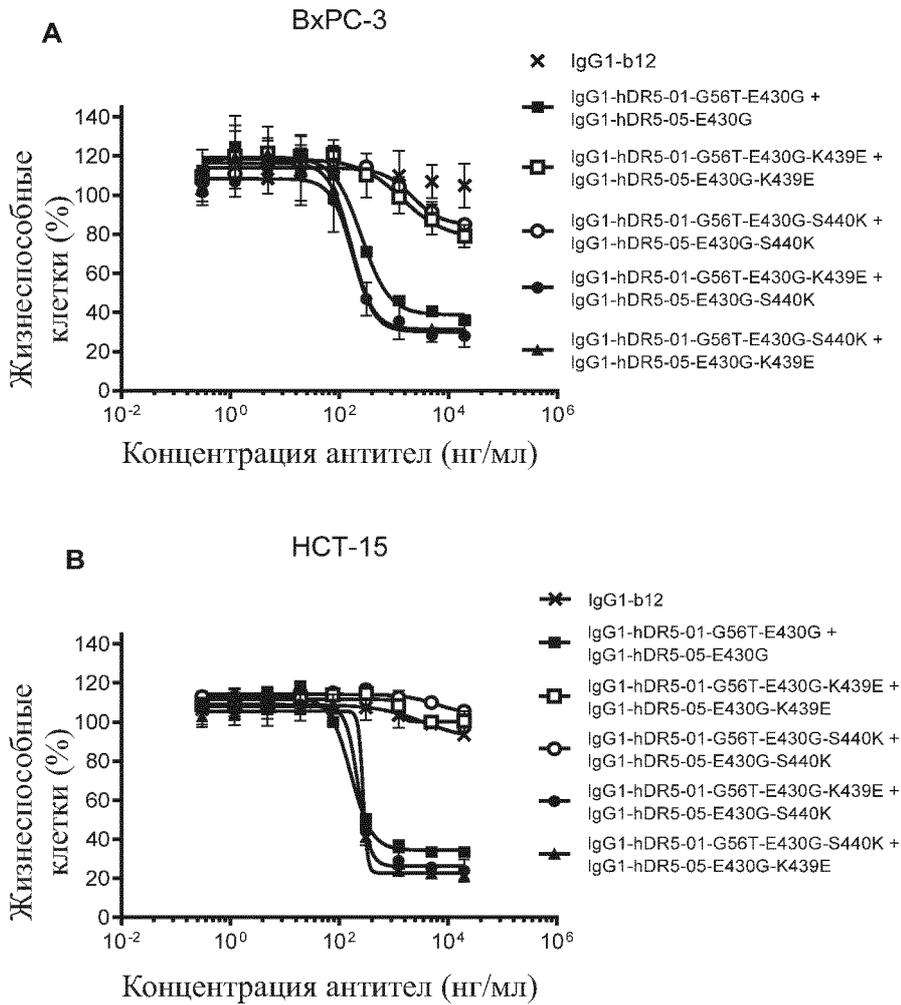


Фиг. 12

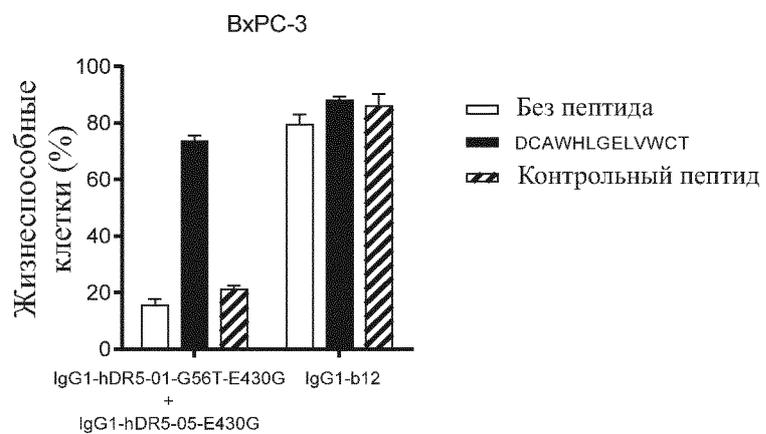
с



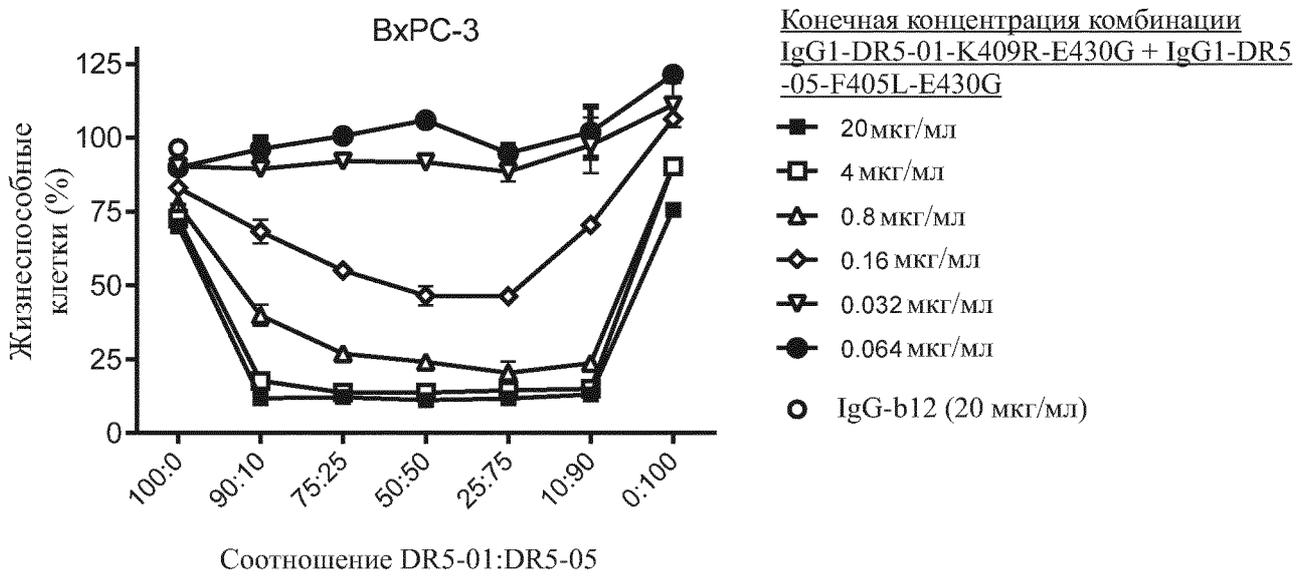
Фиг. 12 продолжение



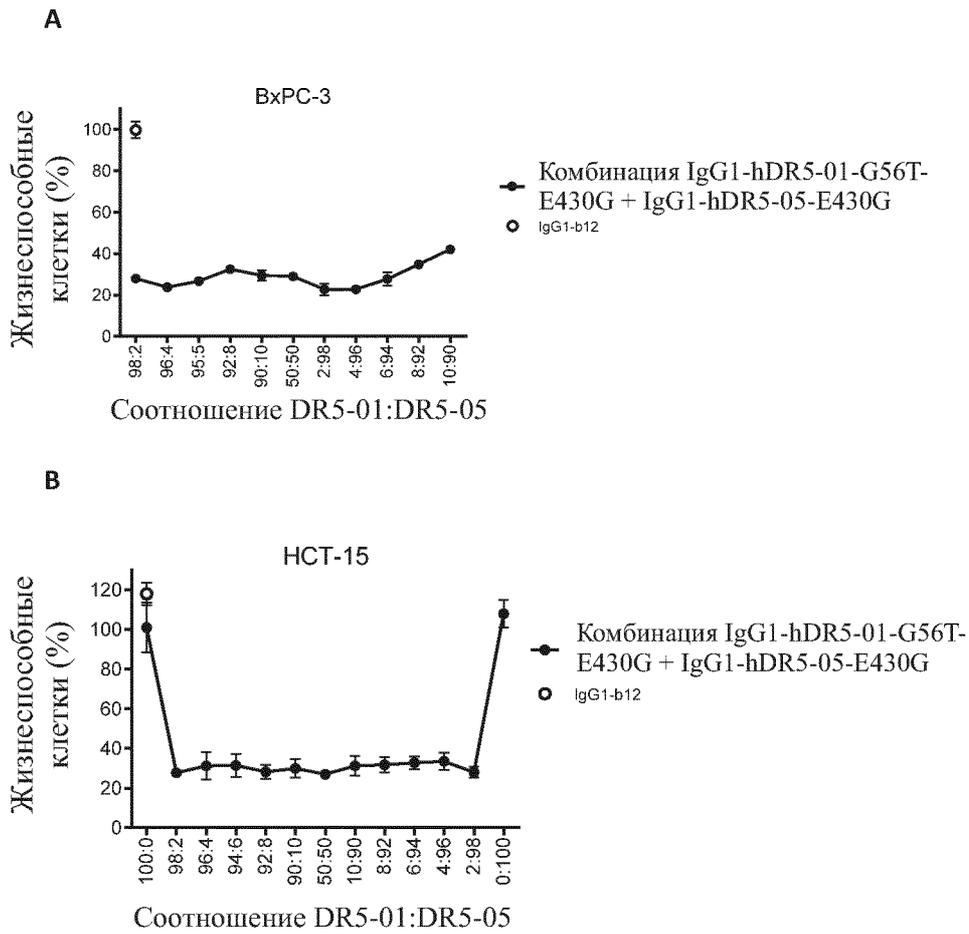
Фиг. 13



Фиг. 14

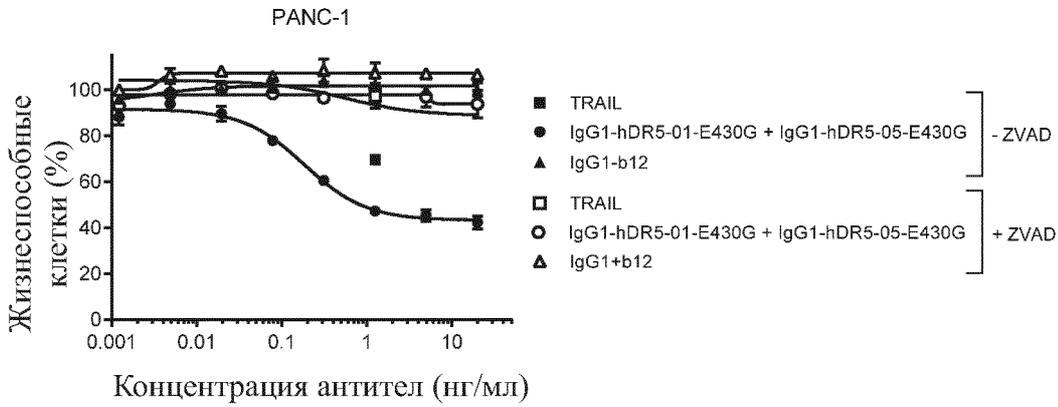


Фиг. 15

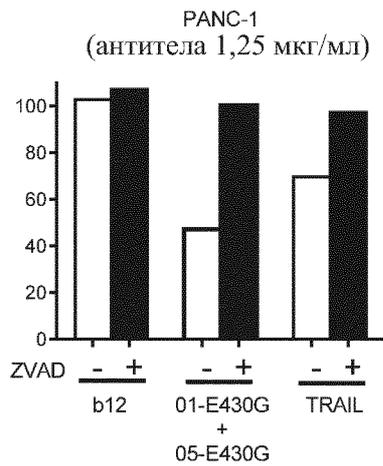


Фиг. 16

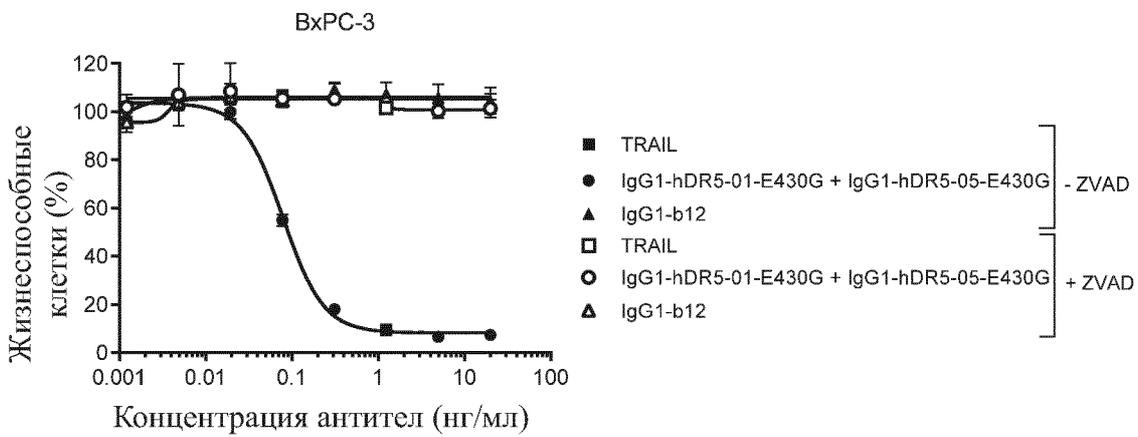
A



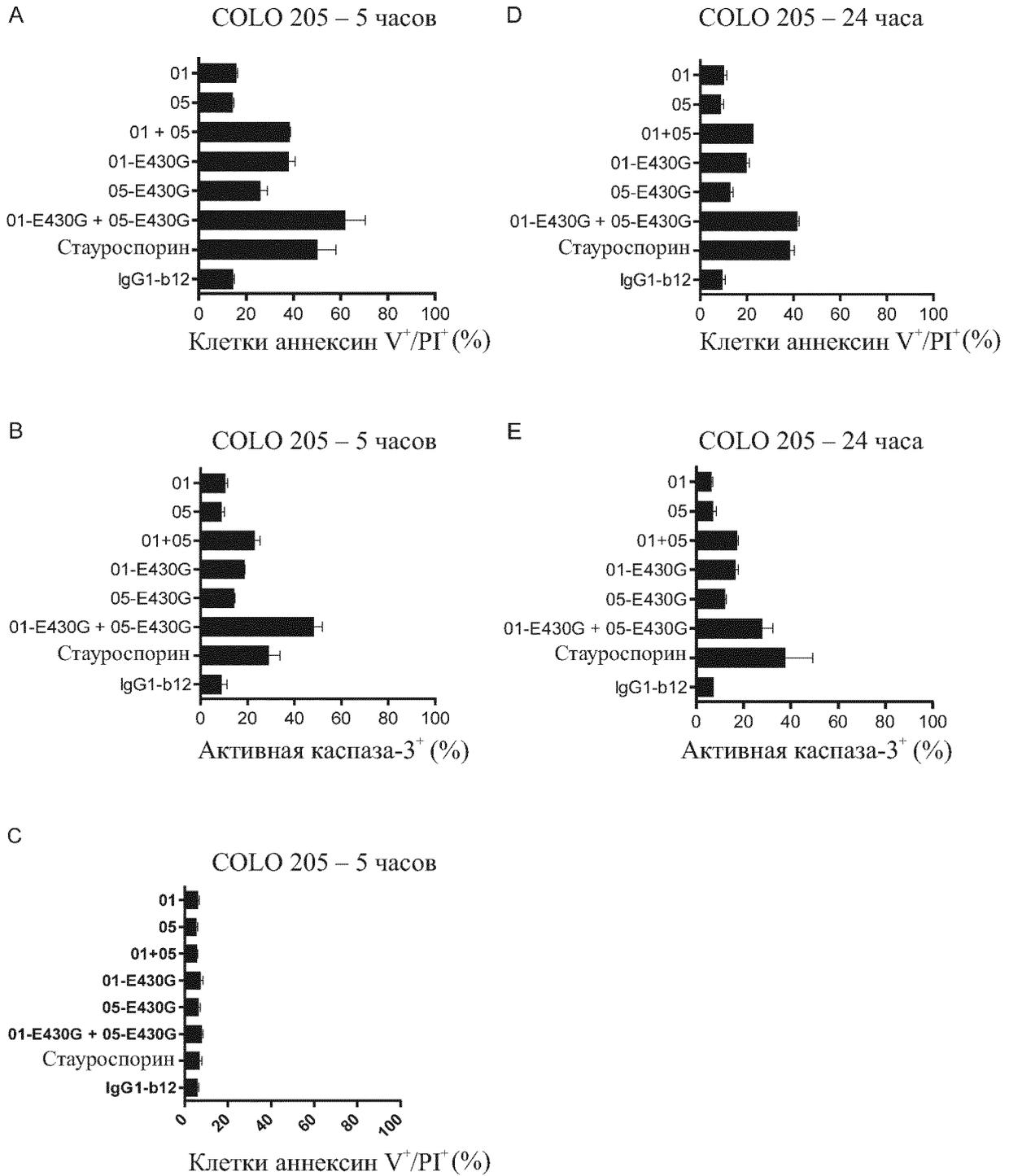
B



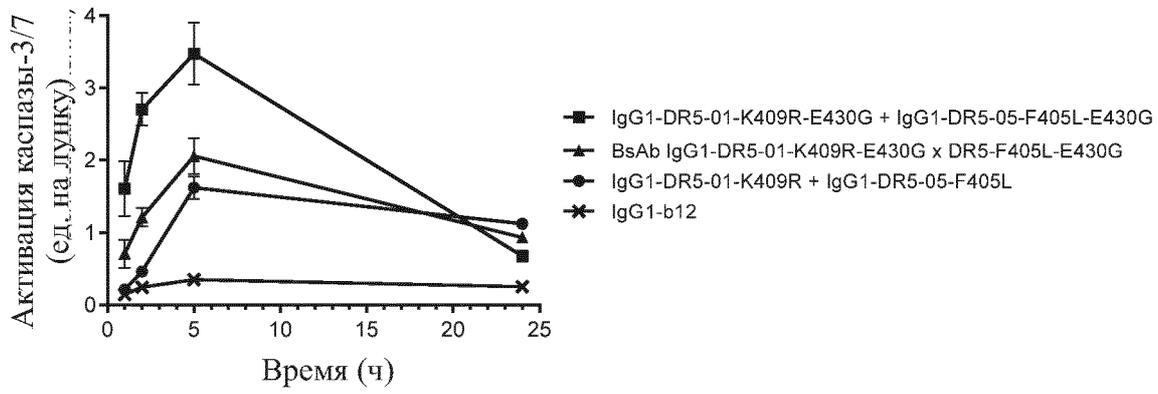
C



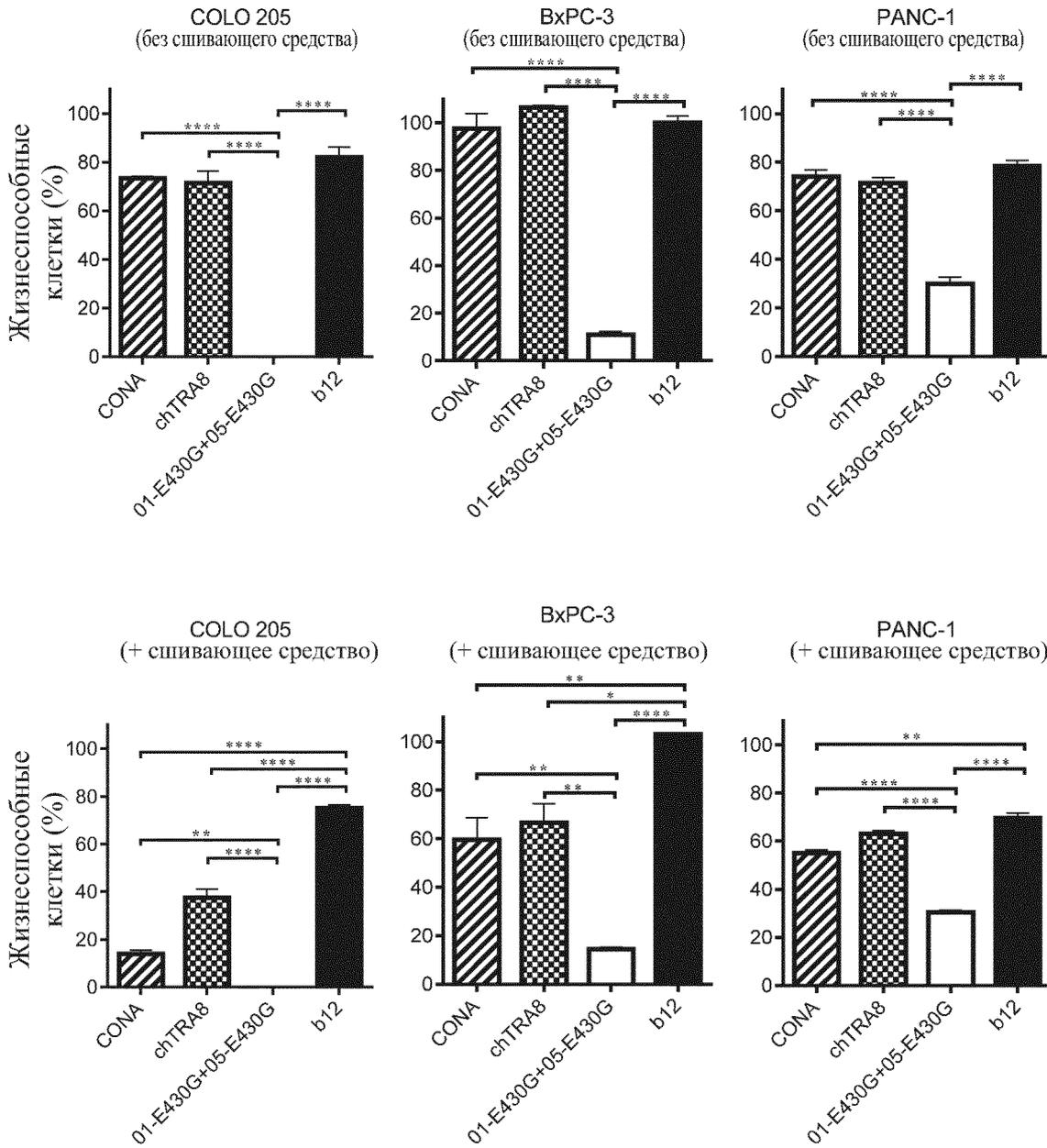
Фиг. 17



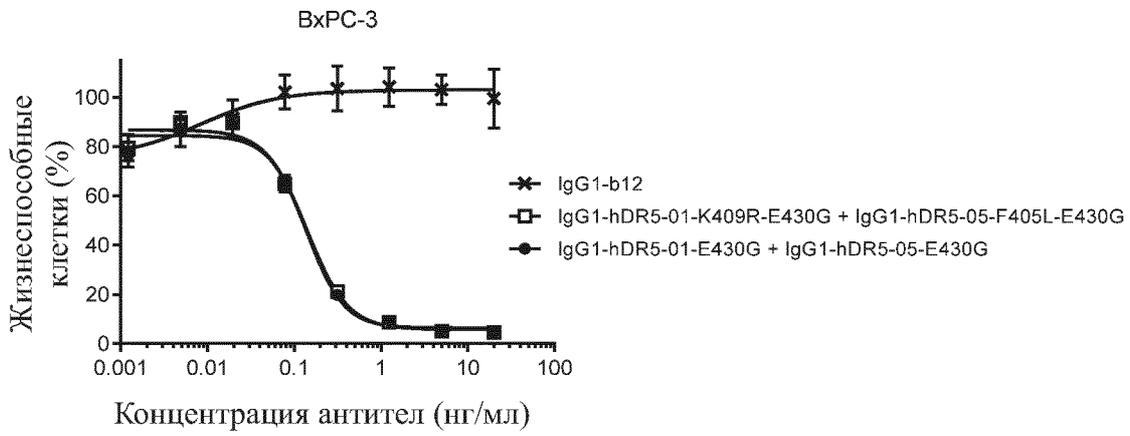
Фиг. 18



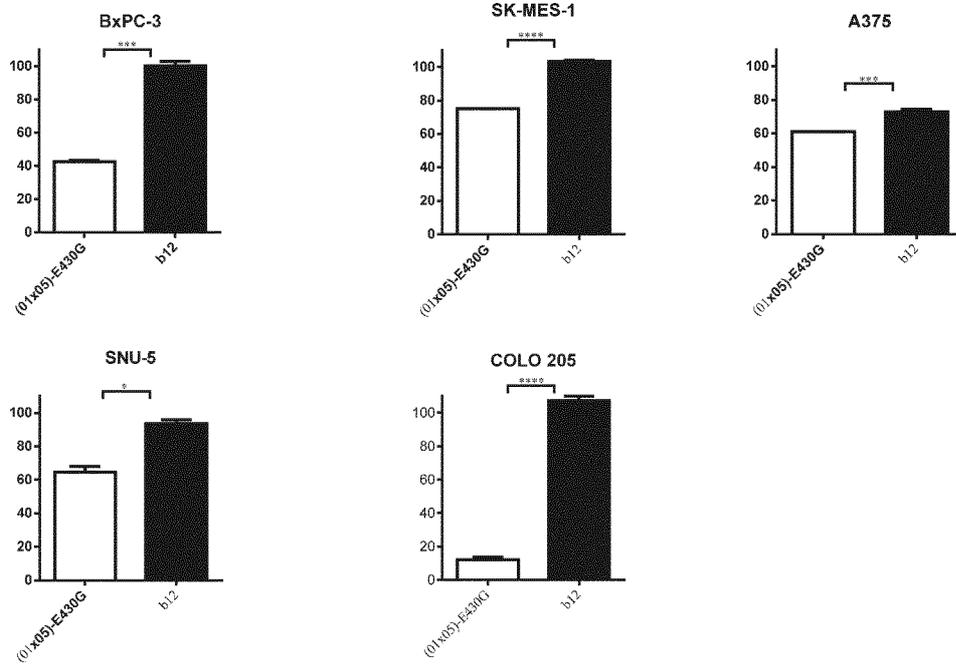
Фиг. 19



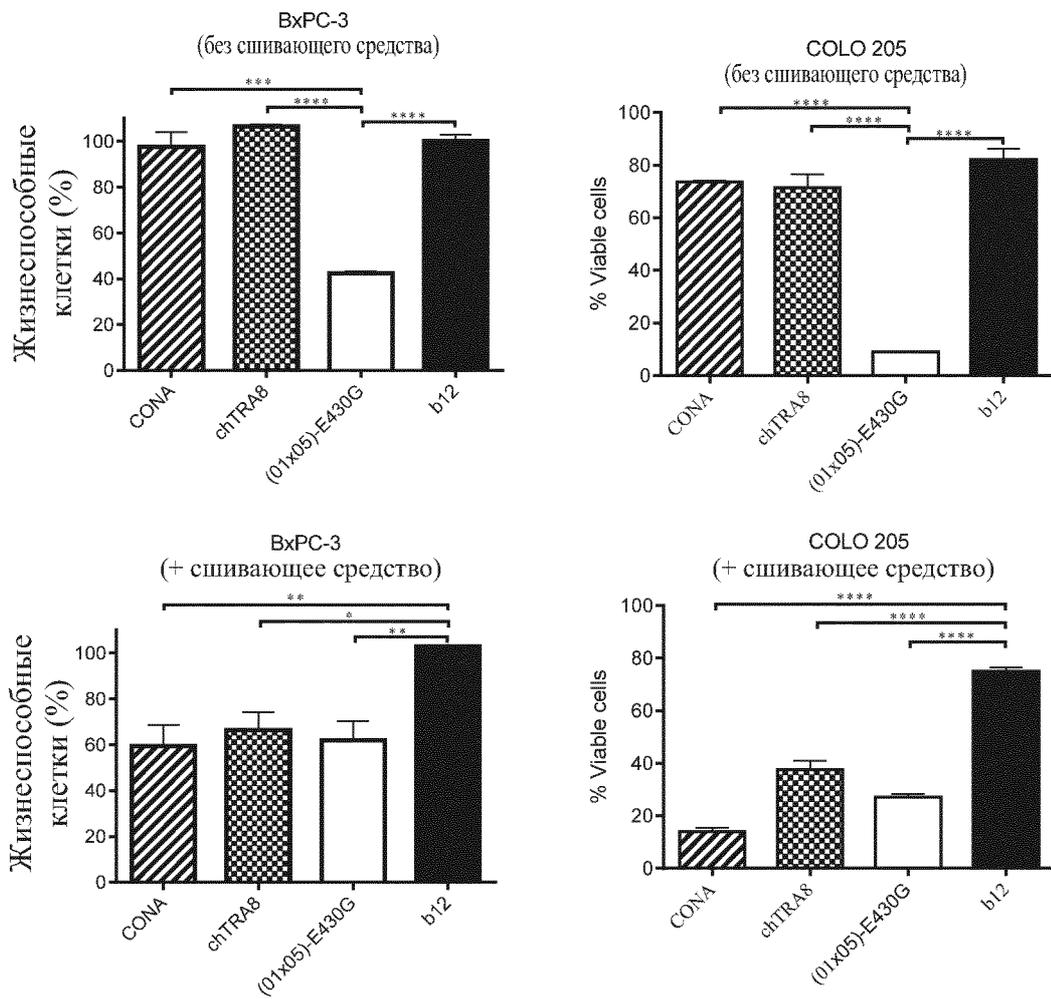
Фиг. 20



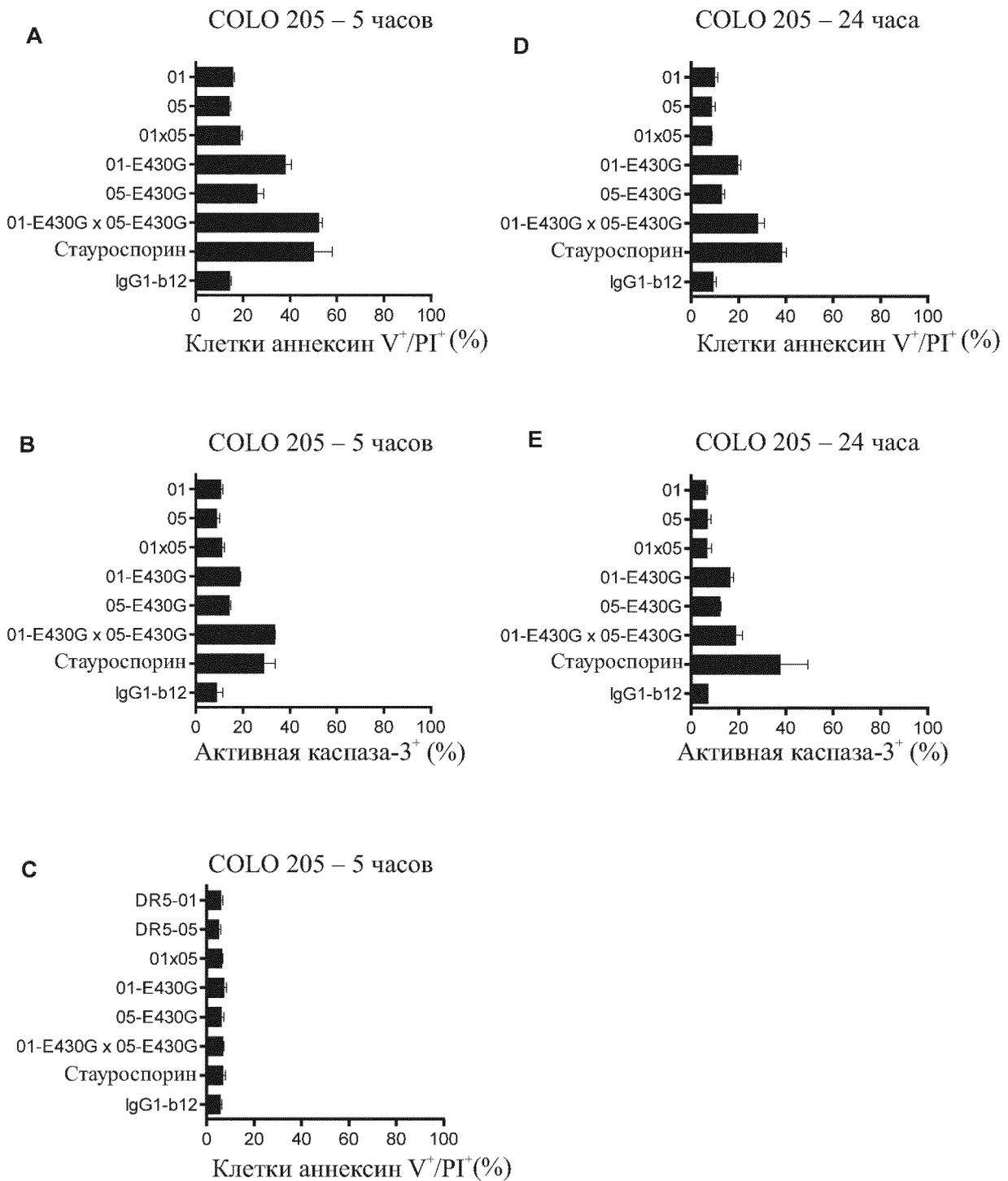
Фиг. 21



Фиг. 22

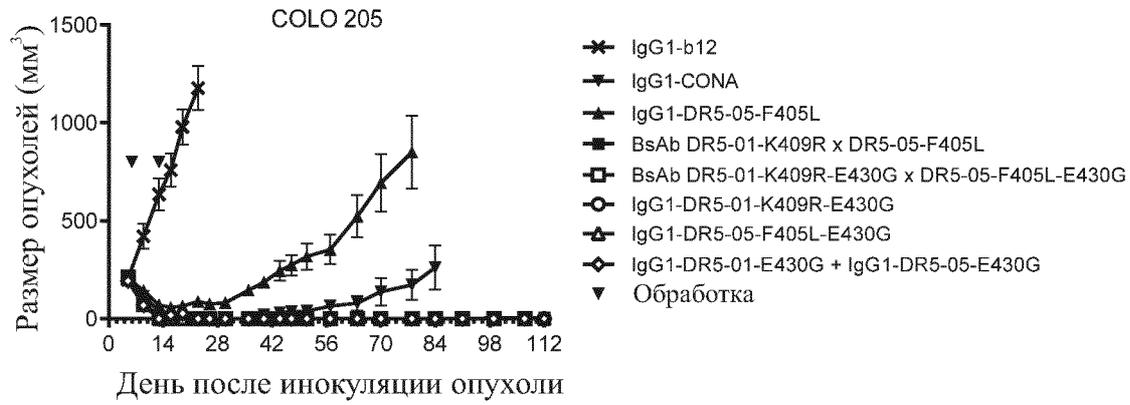


Фиг. 23

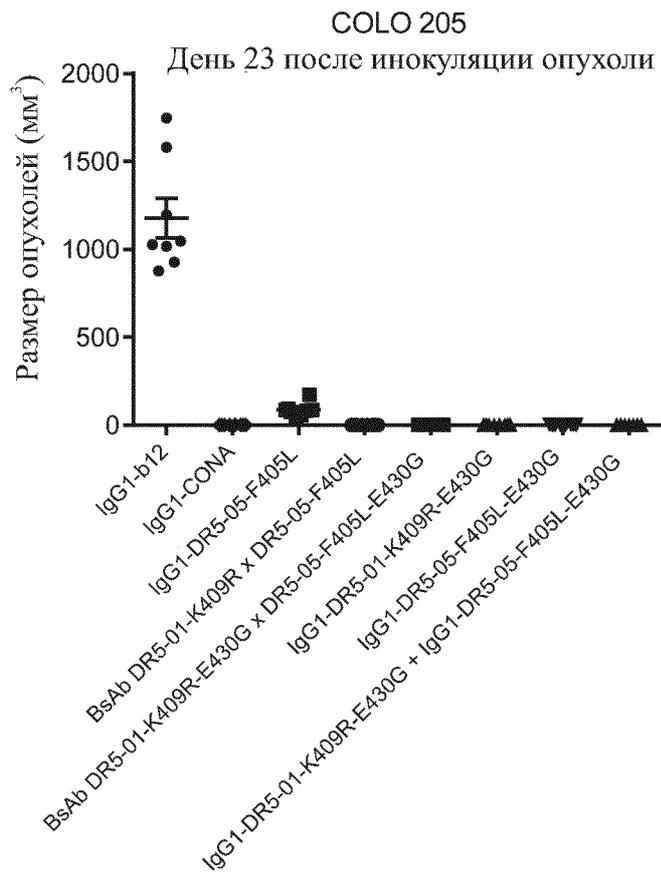


Фиг. 24

A

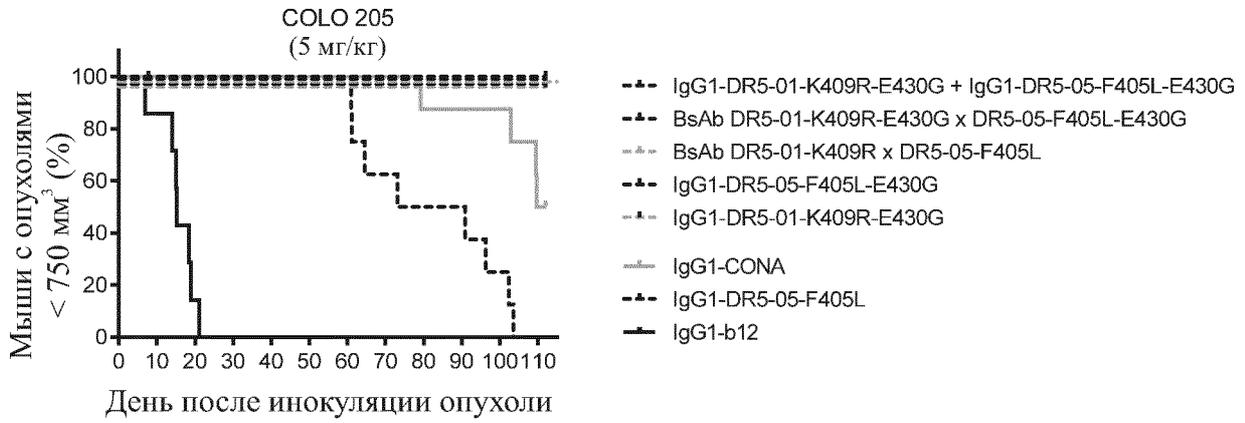


B



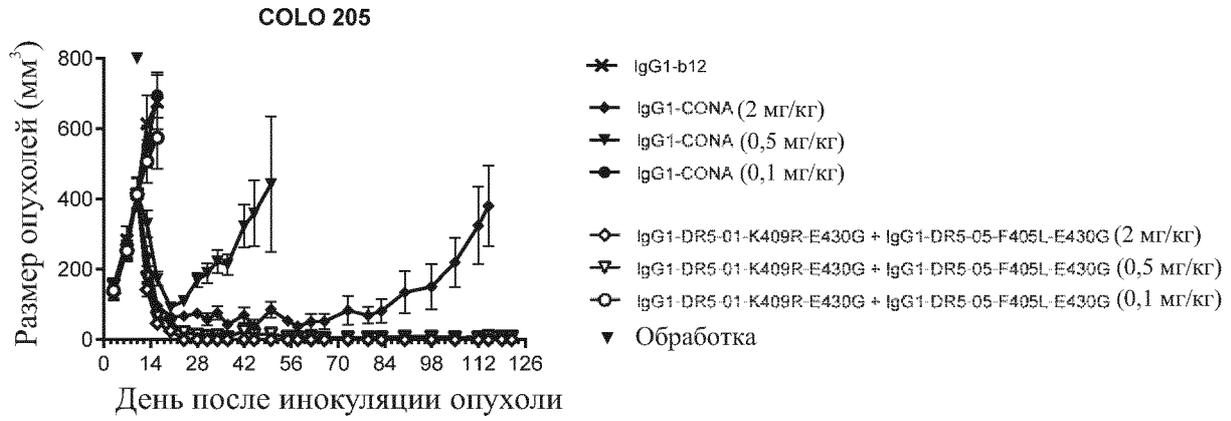
Фиг. 25

с

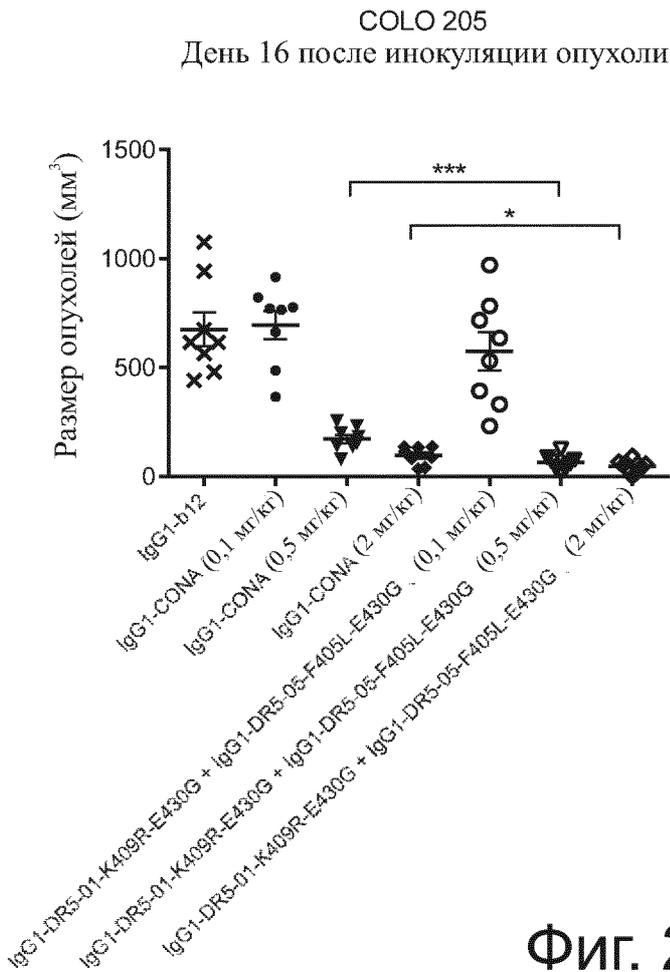


ФИГ. 25 продолжение

A

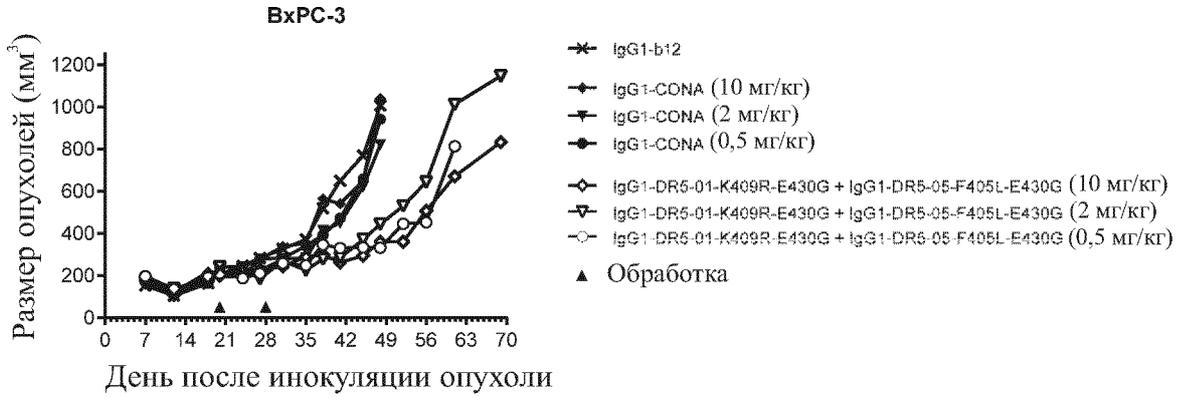


B

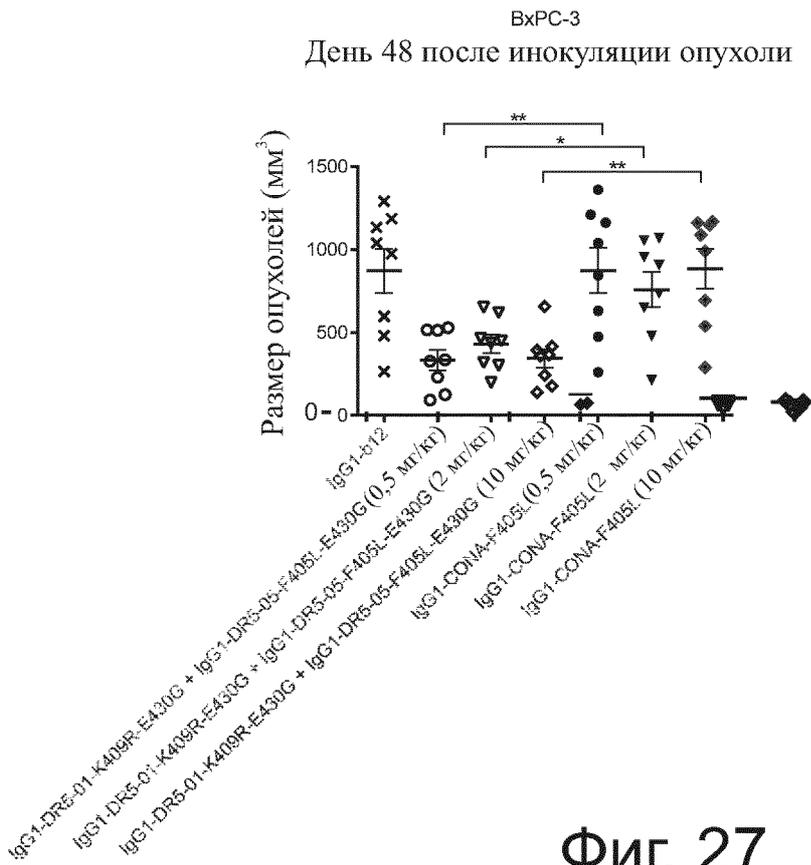


Фиг. 26

A

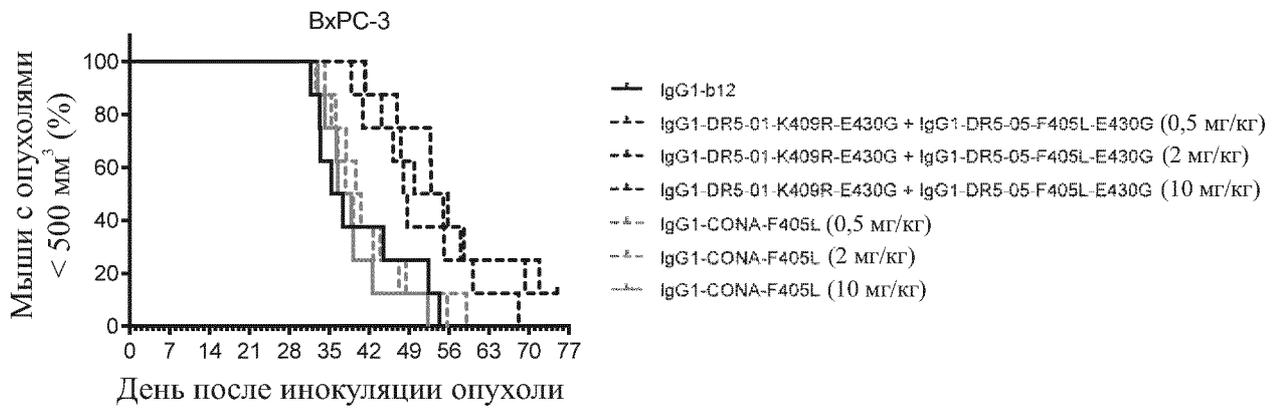


B



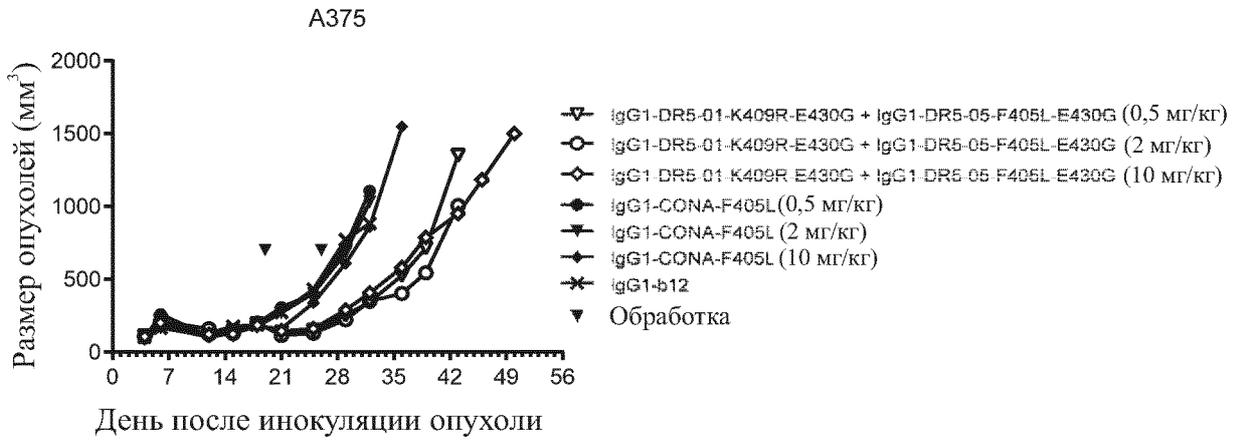
Фиг. 27

с

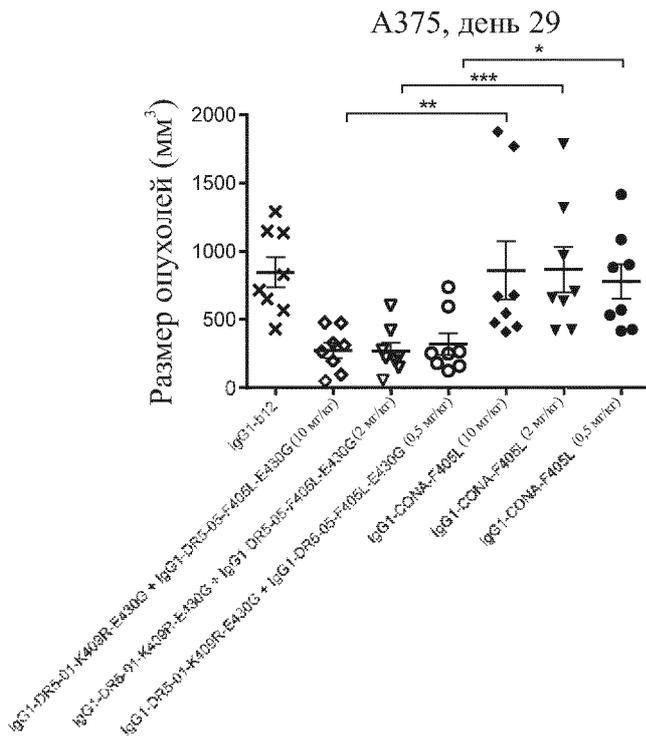


Фиг. 27 продолжение

A

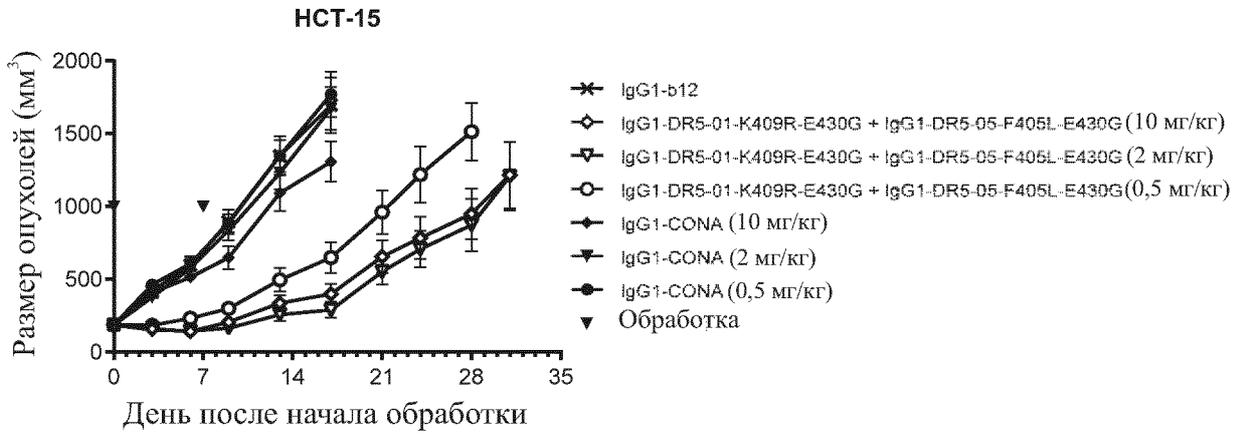


B

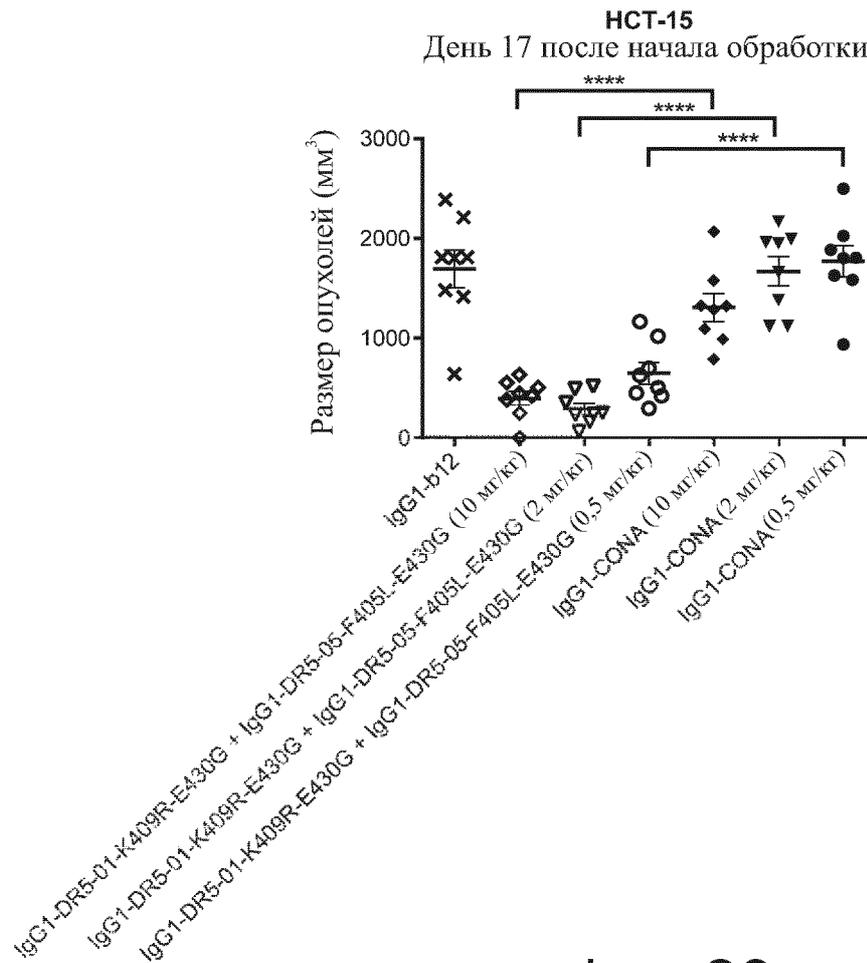


Фиг. 28

A

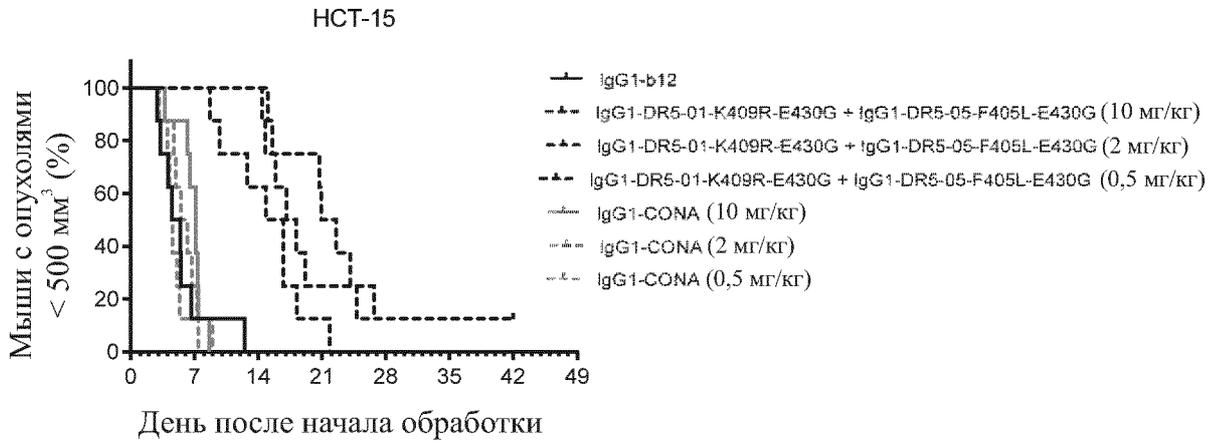


B



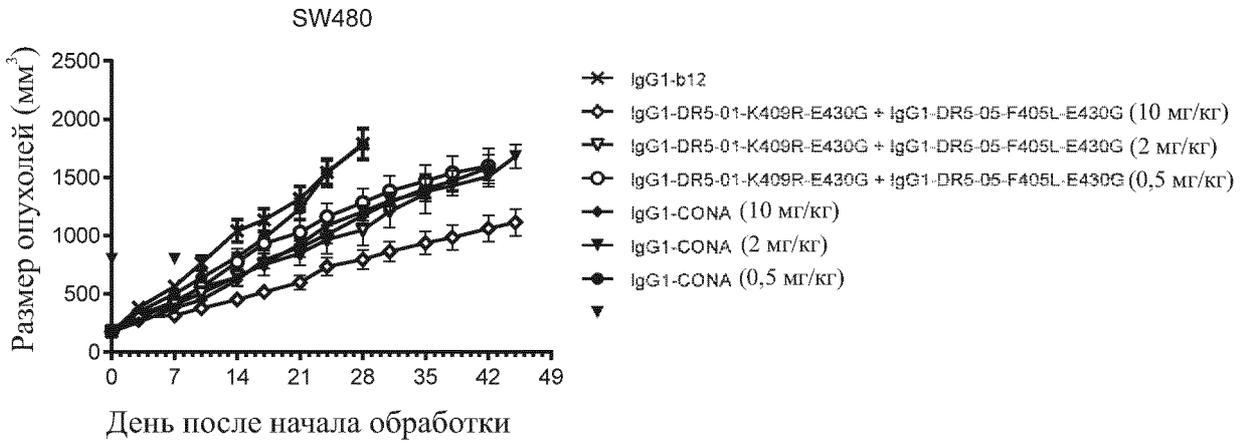
Фиг. 29

C

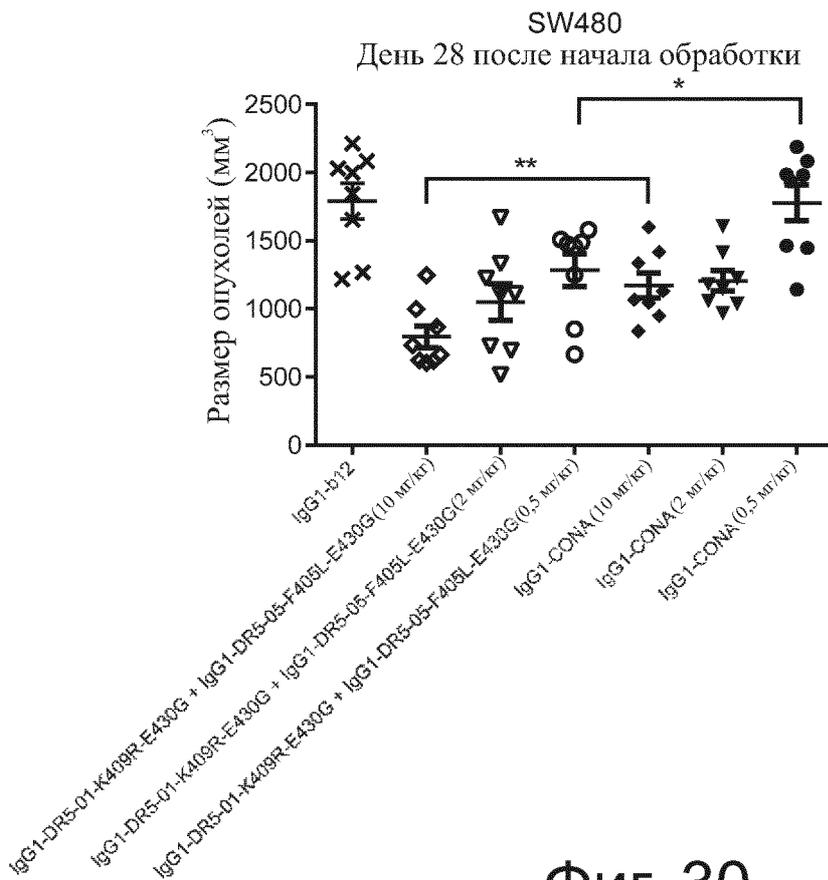


Фиг. 29 продолжение

A

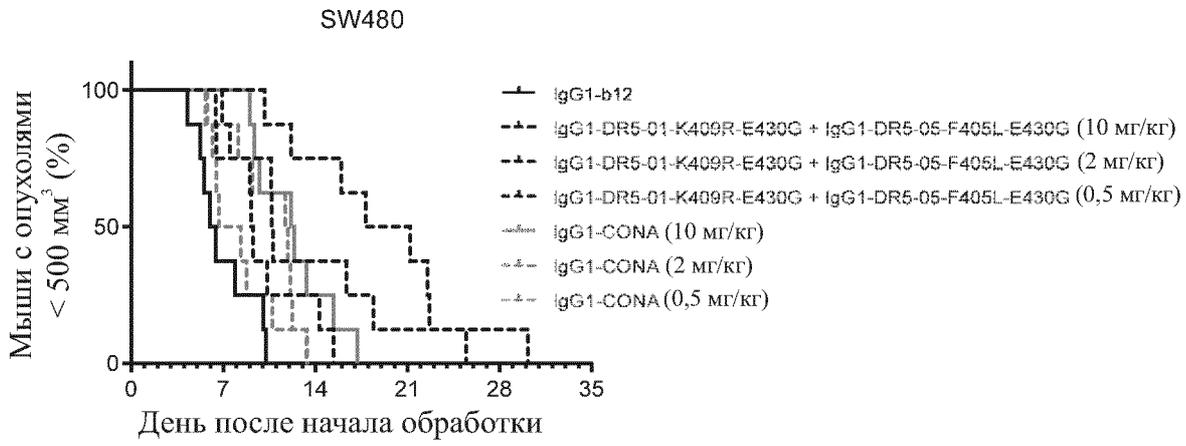


B



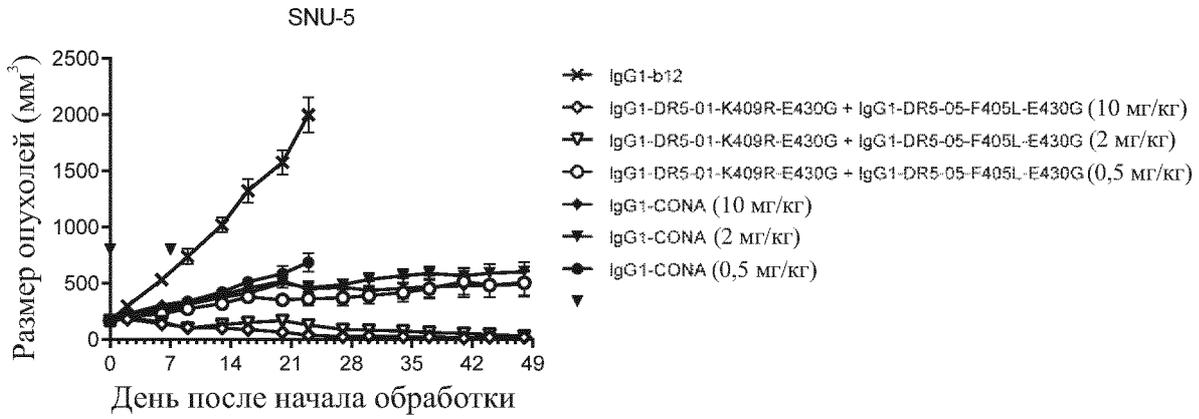
Фиг. 30

С

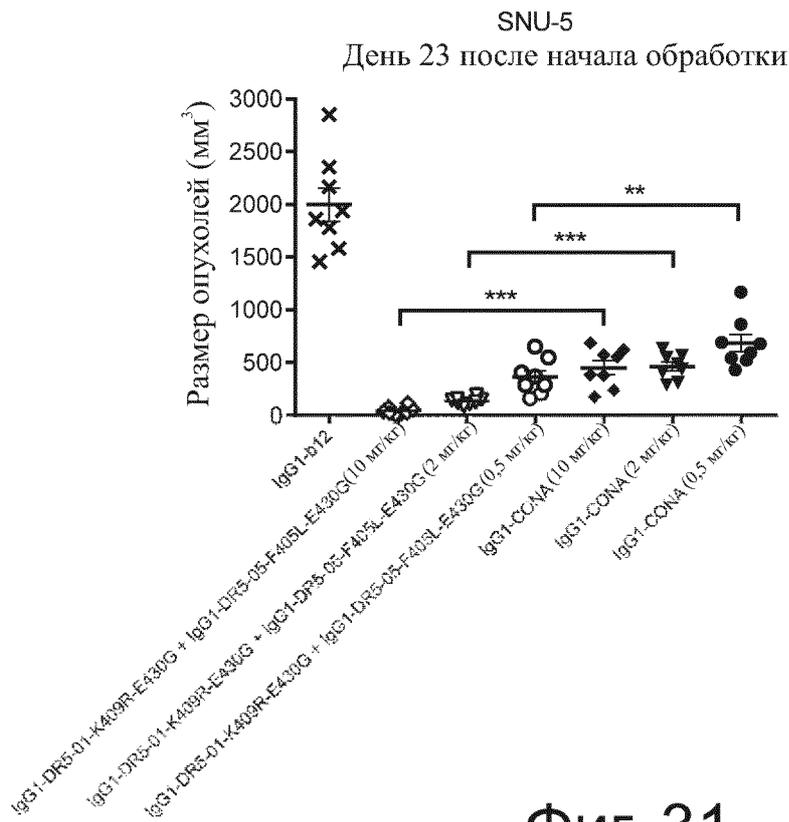


Фиг. 30 продолжение

A

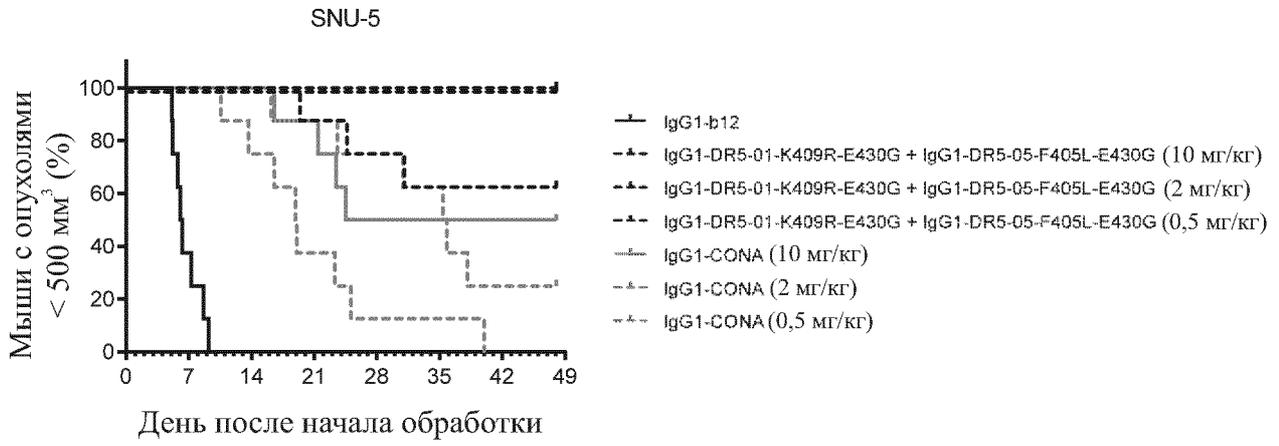


B



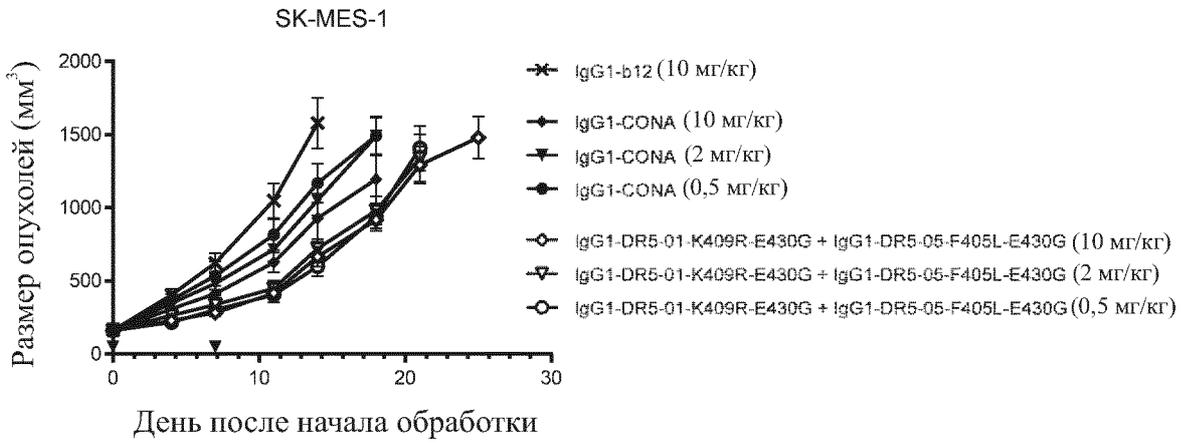
Фиг. 31

C

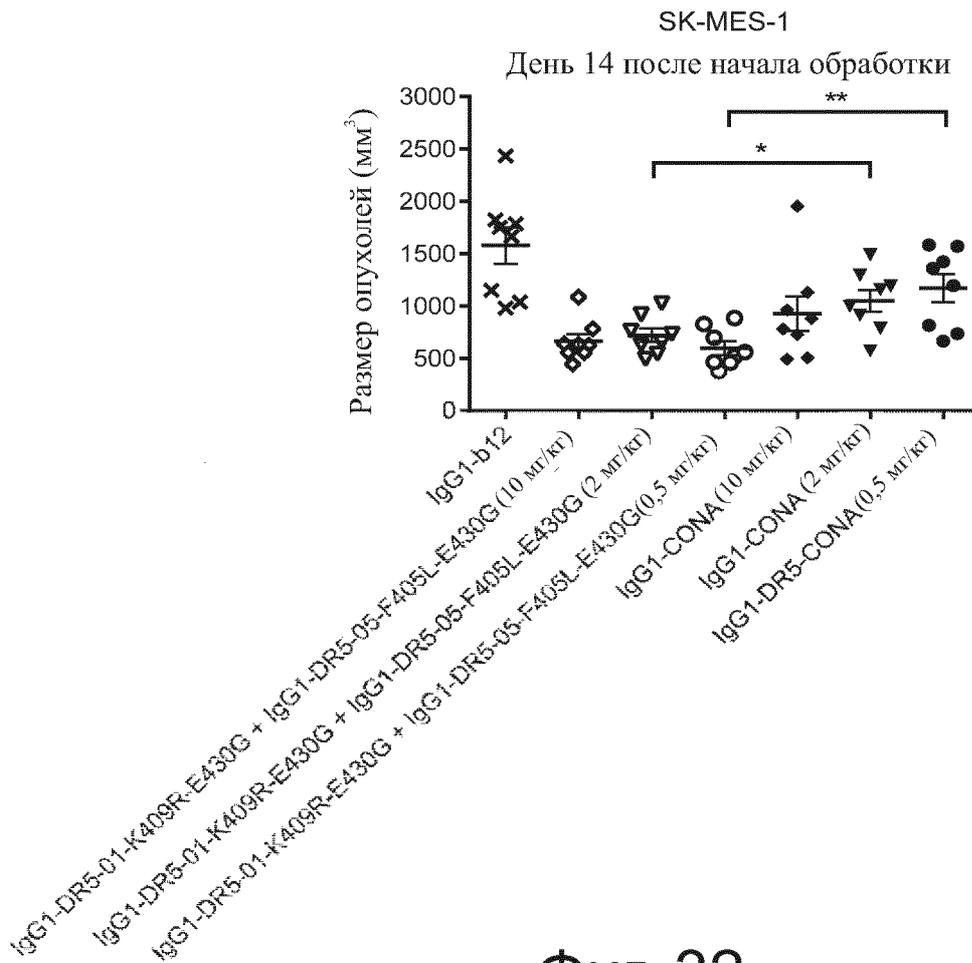


Фиг. 31 продолжение

A

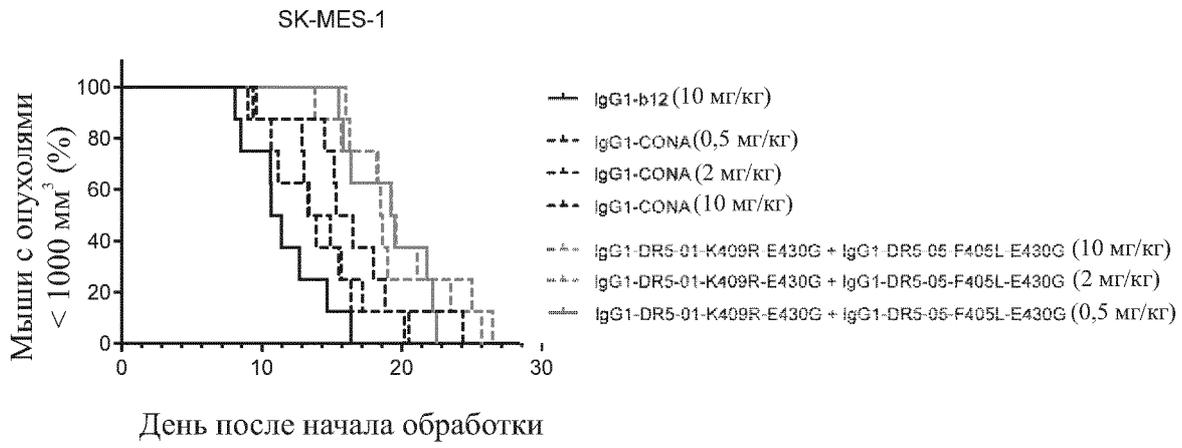


B

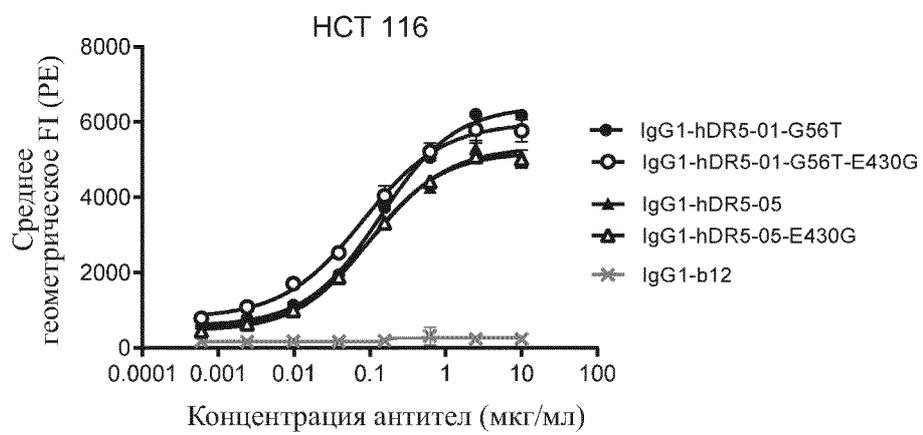


Фиг. 32

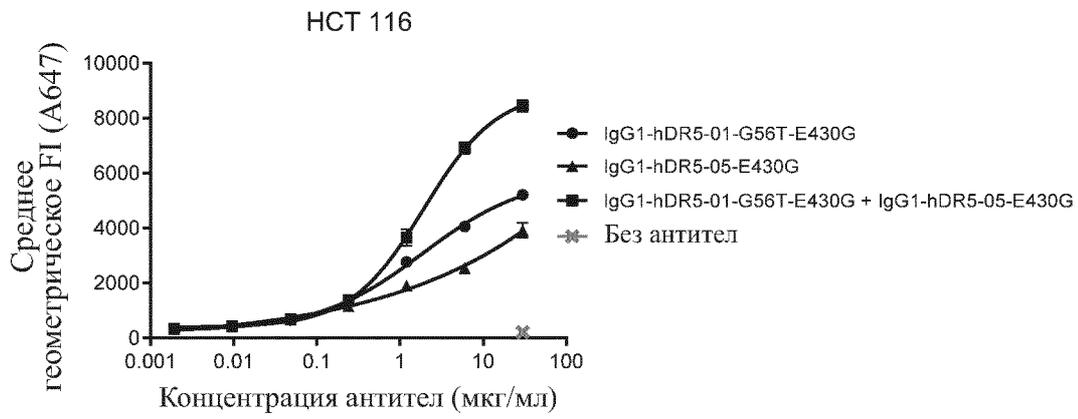
C



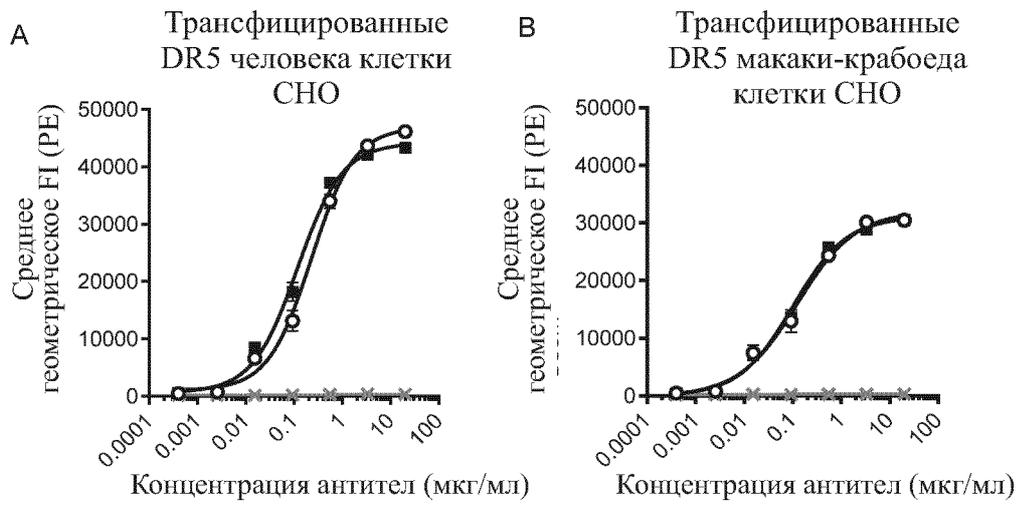
Фиг. 32 продолжение



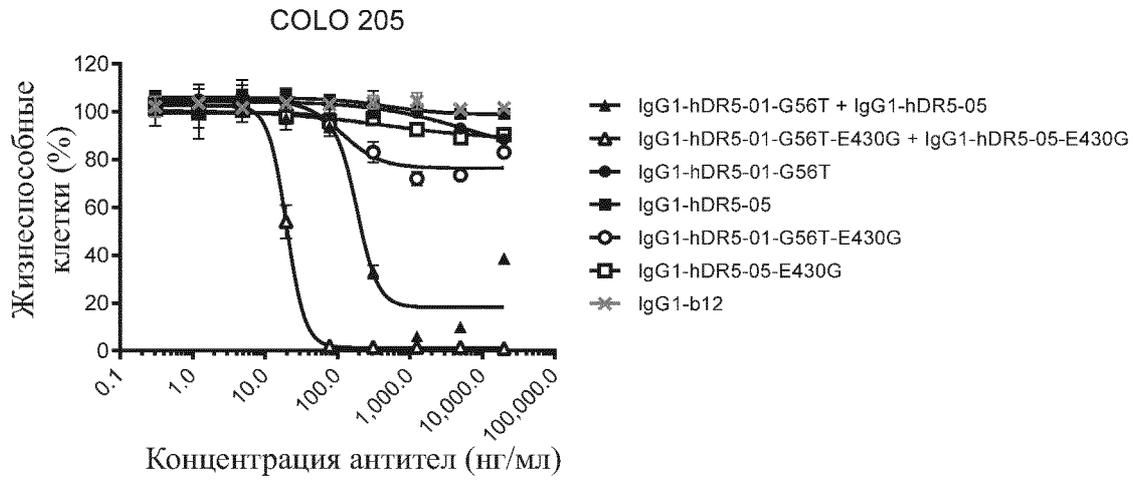
Фиг. 33



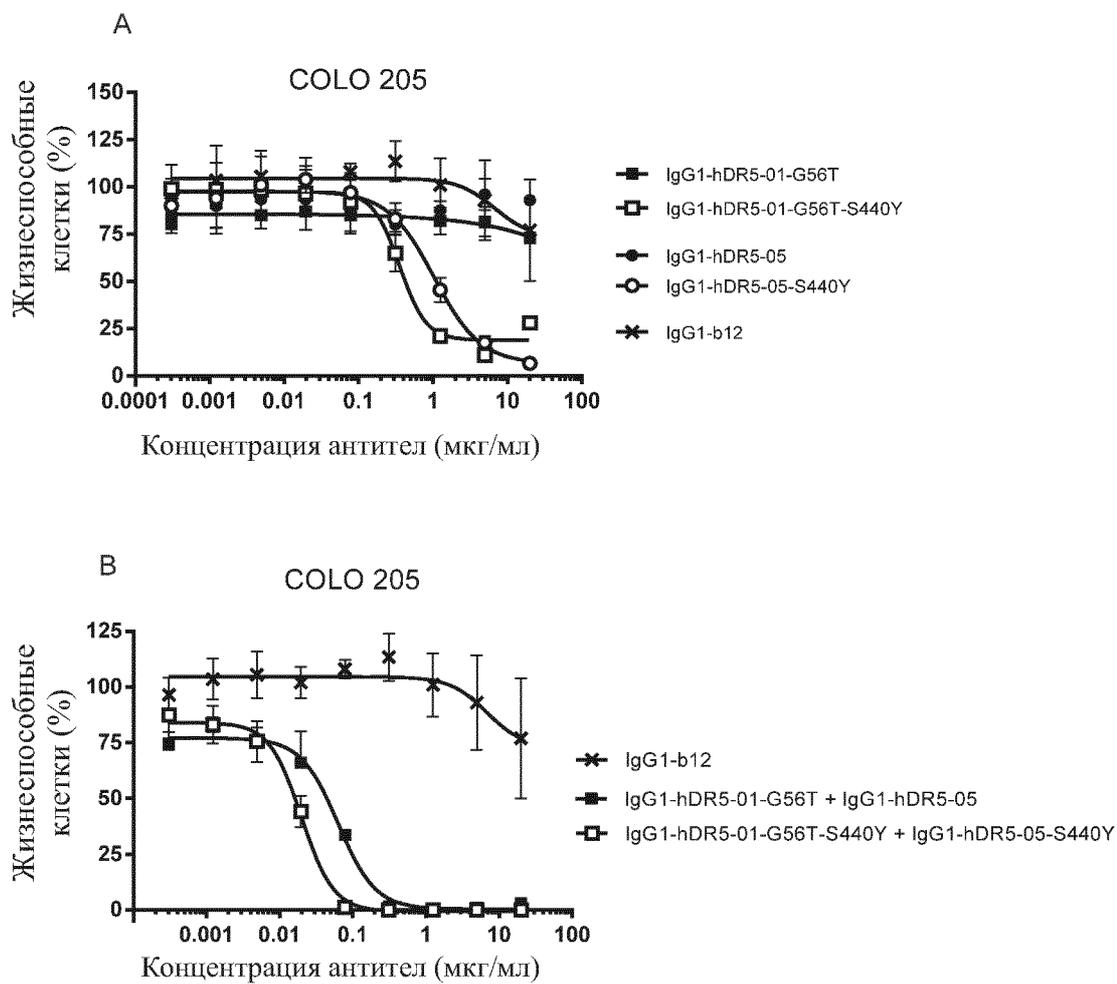
Фиг. 34



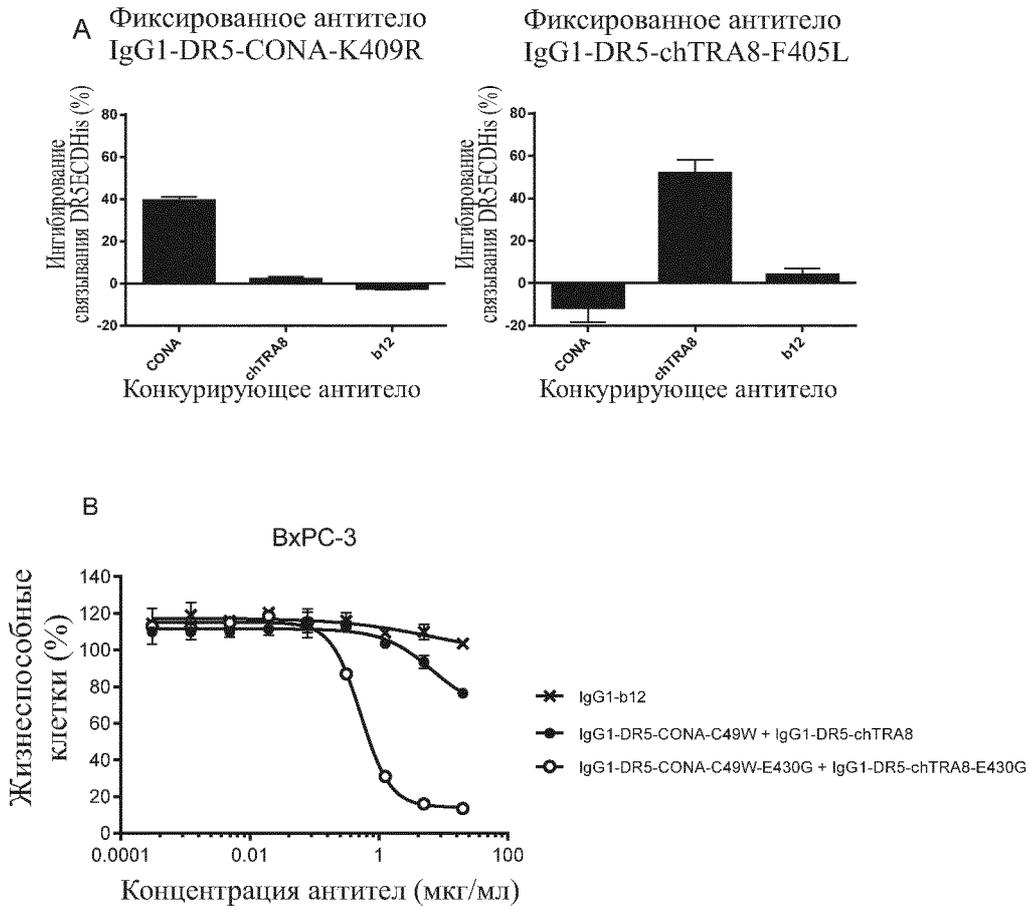
Фиг. 35



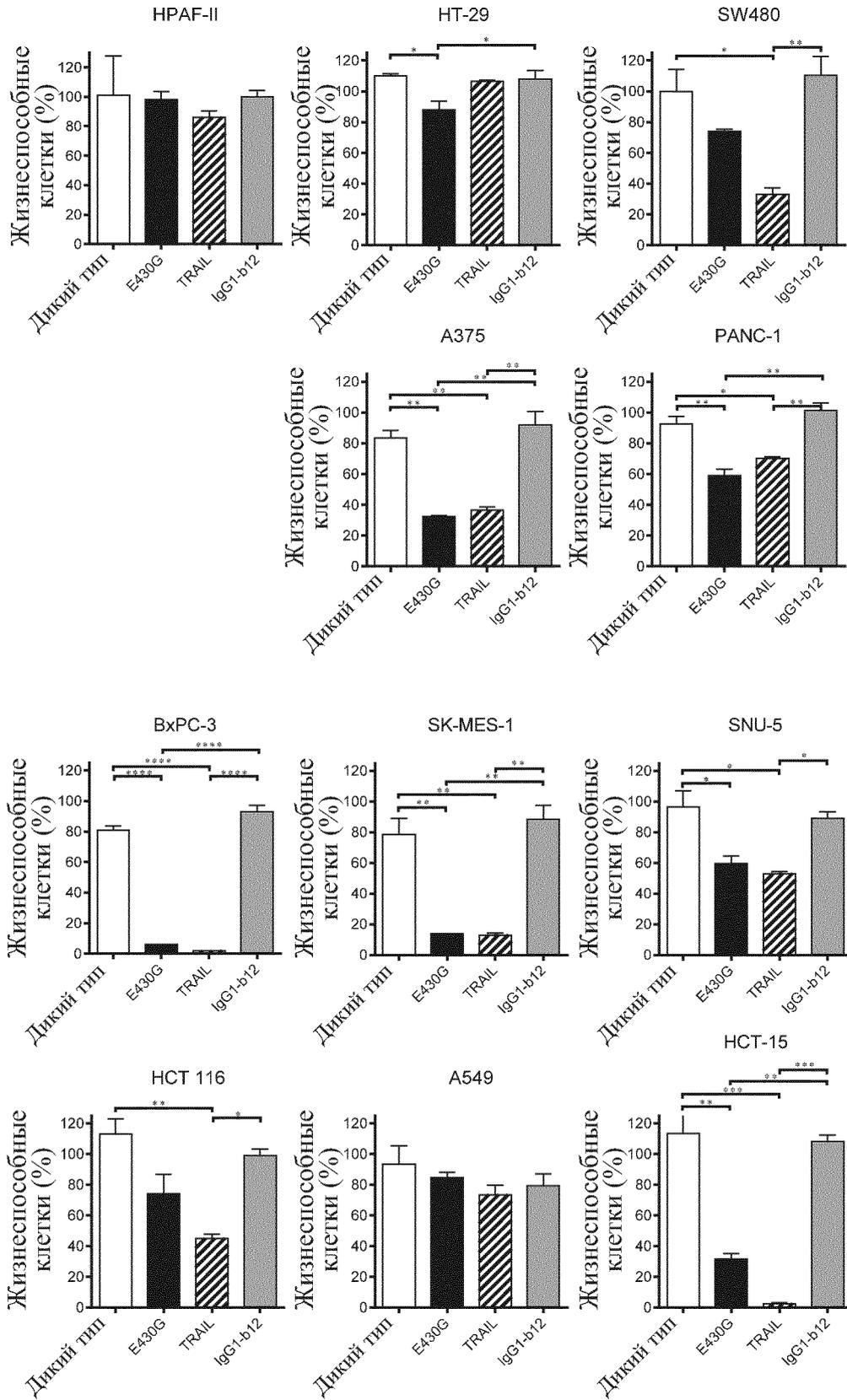
Фиг. 36



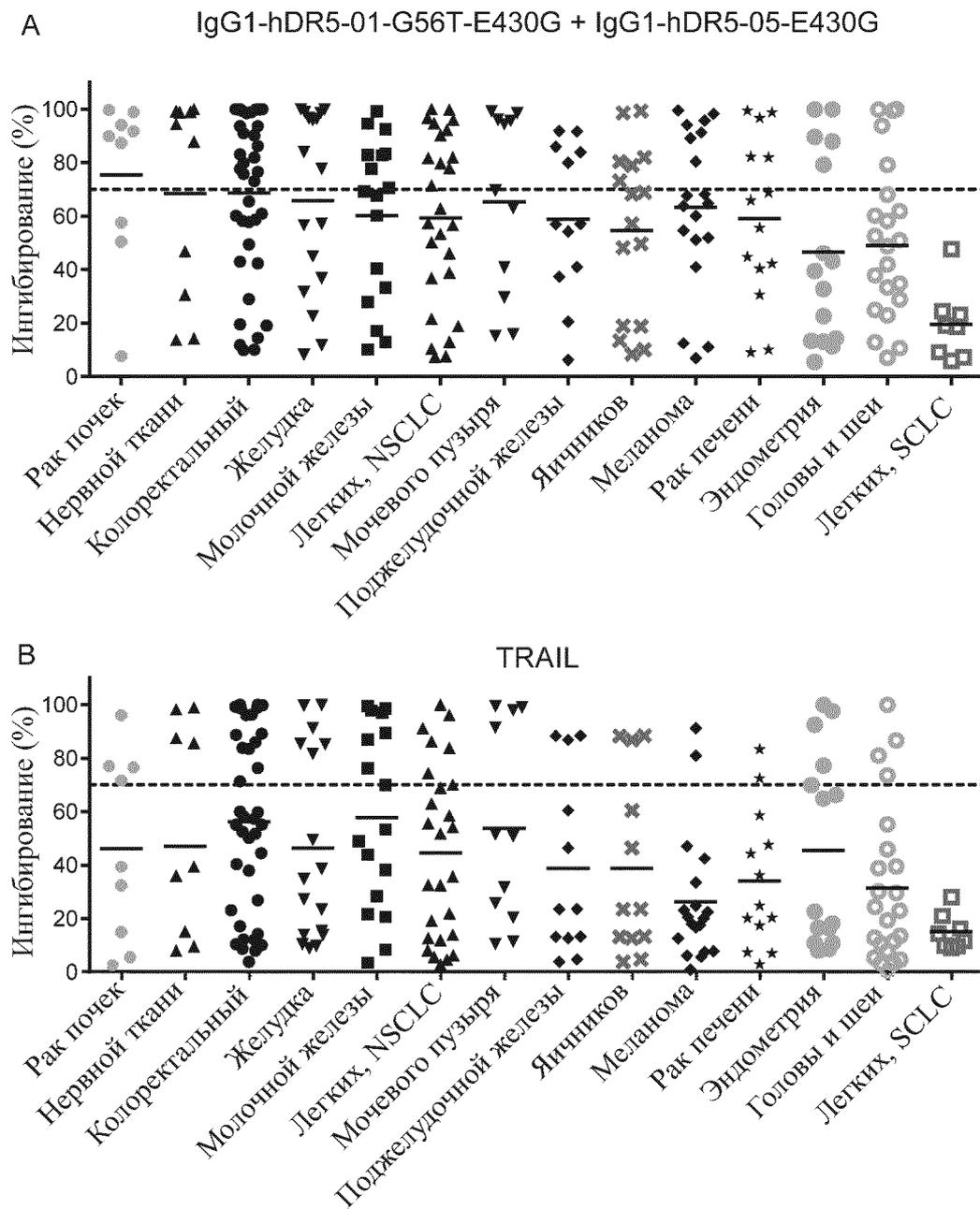
Фиг. 37



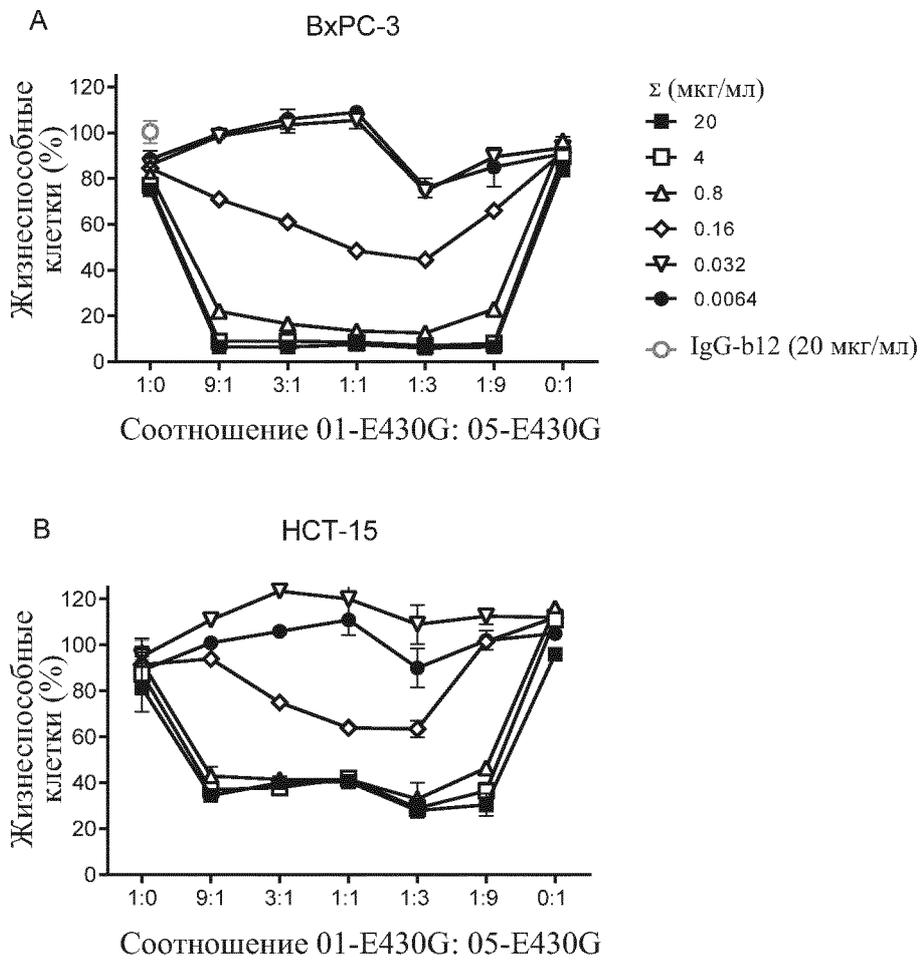
Фиг. 38



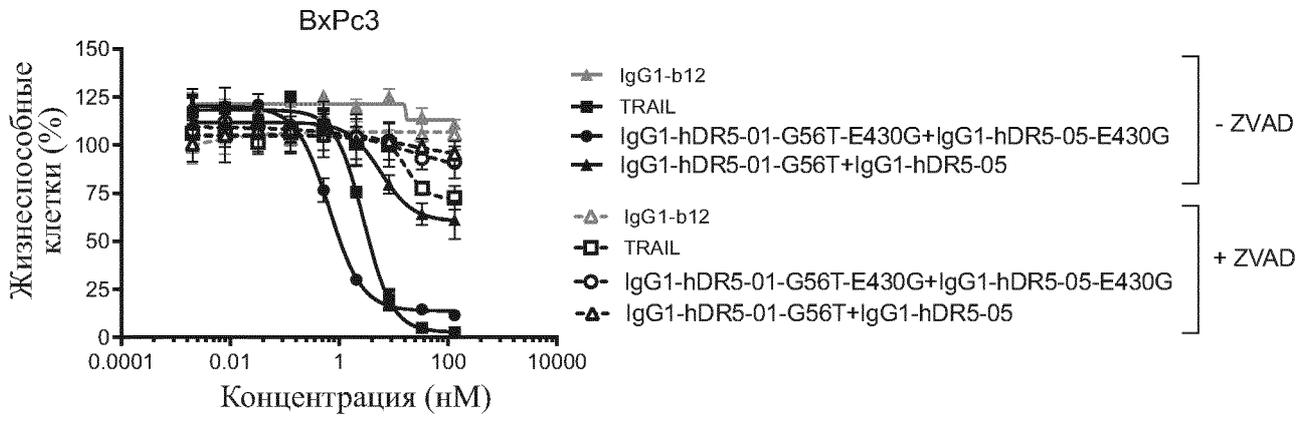
Фиг. 39



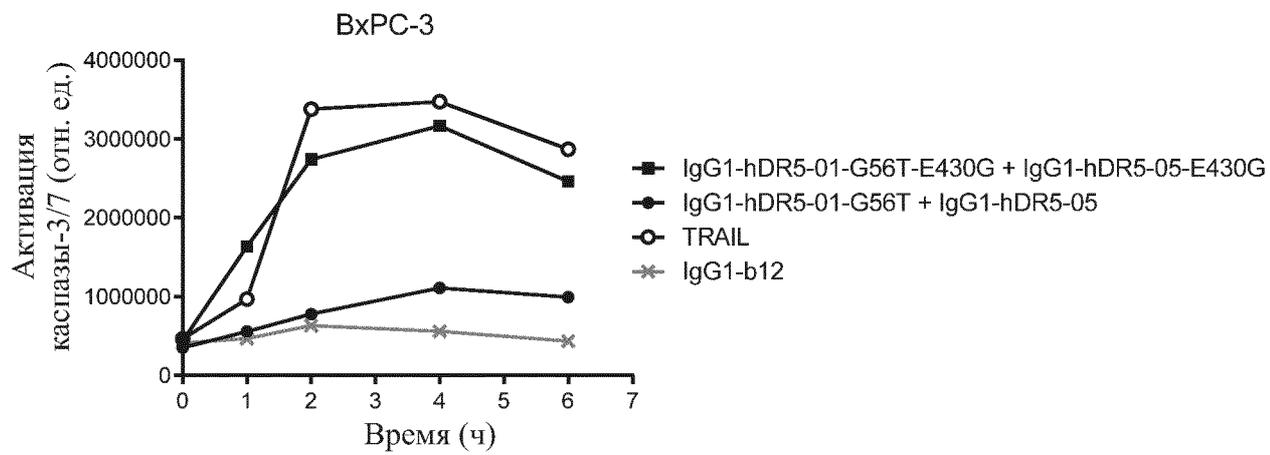
Фиг. 40



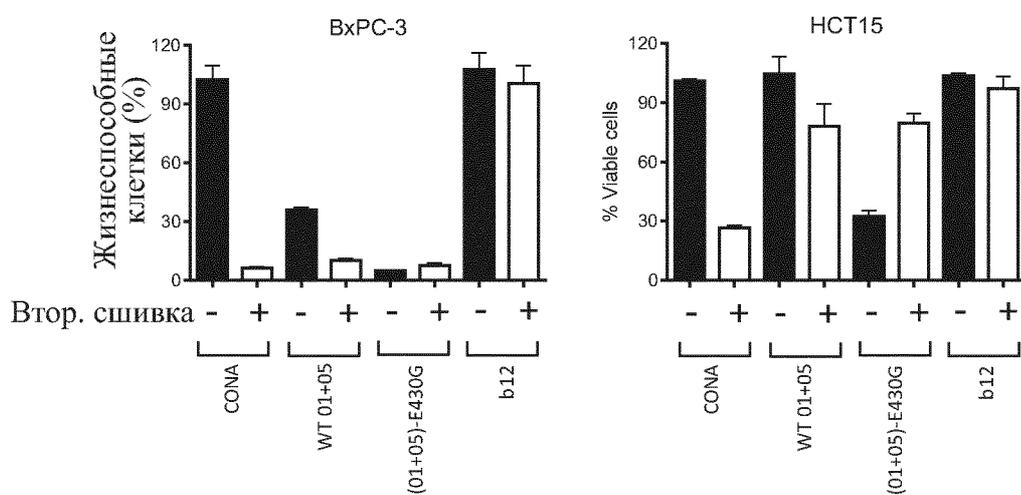
Фиг. 41



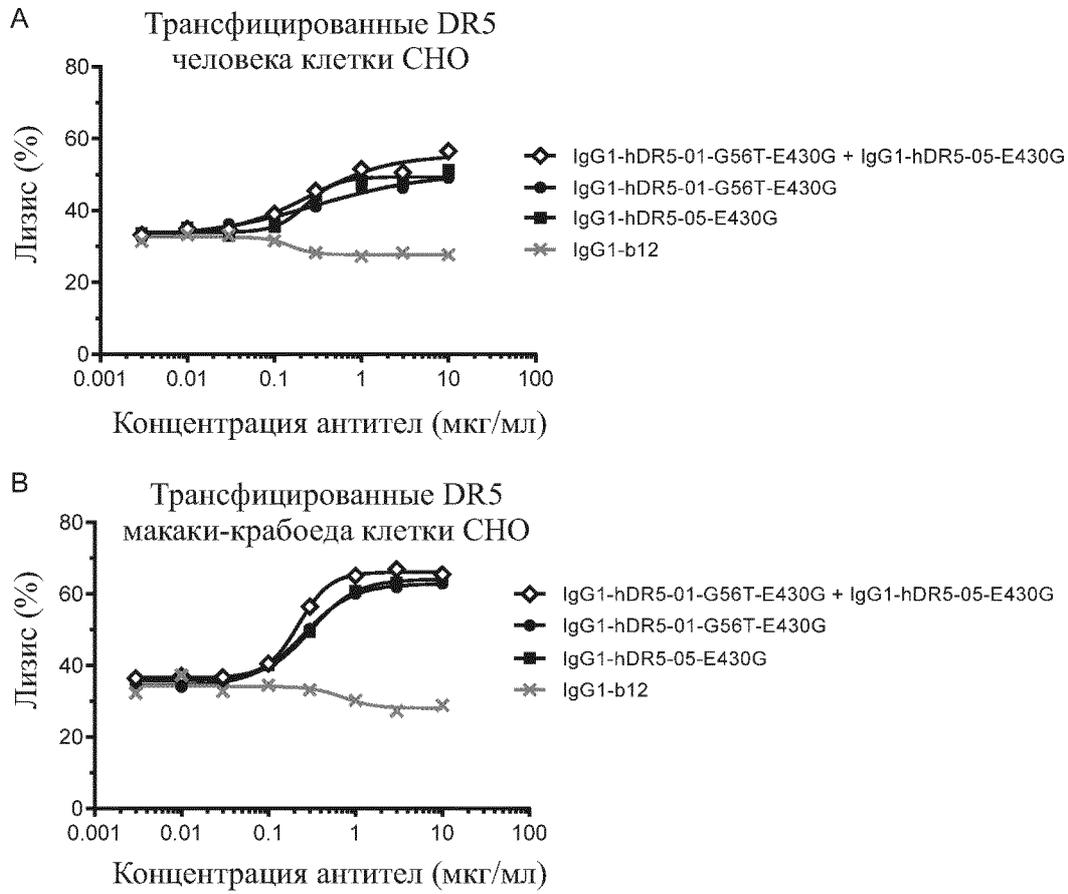
Фиг. 42



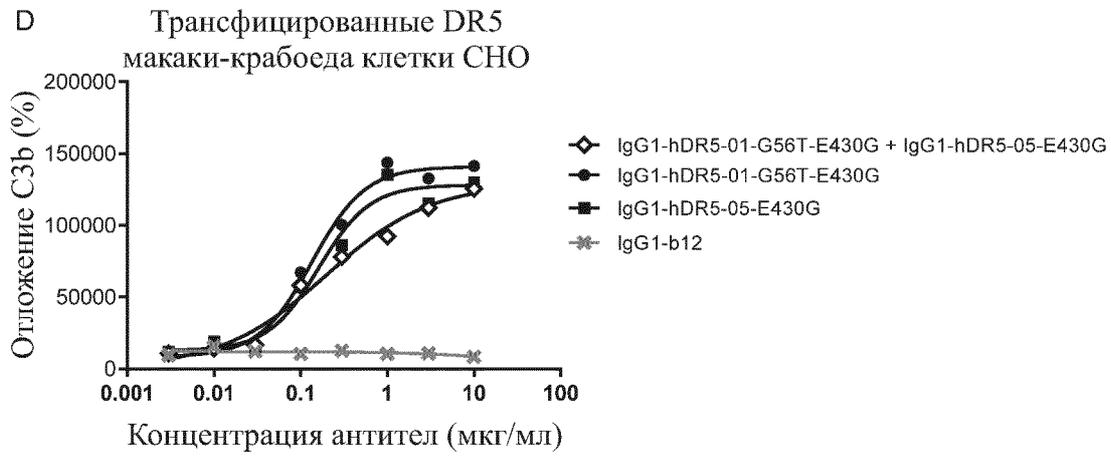
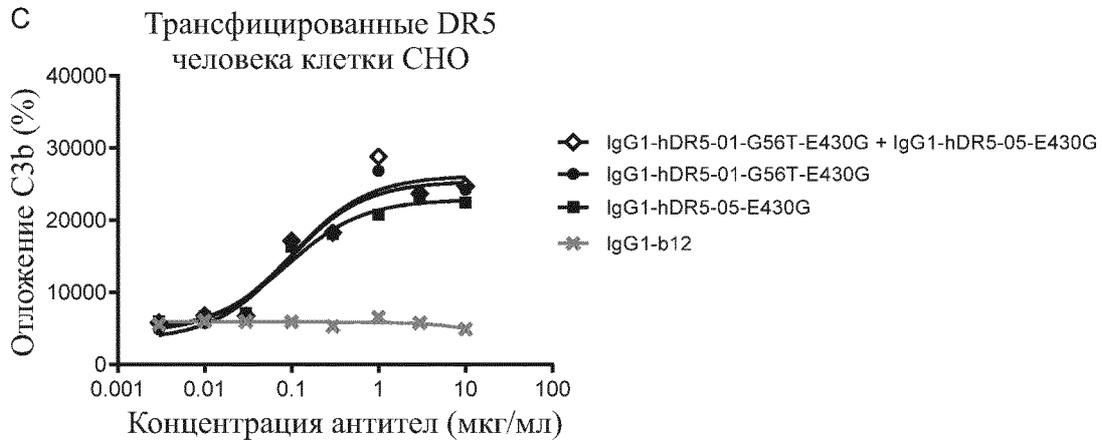
Фиг. 43



Фиг. 44

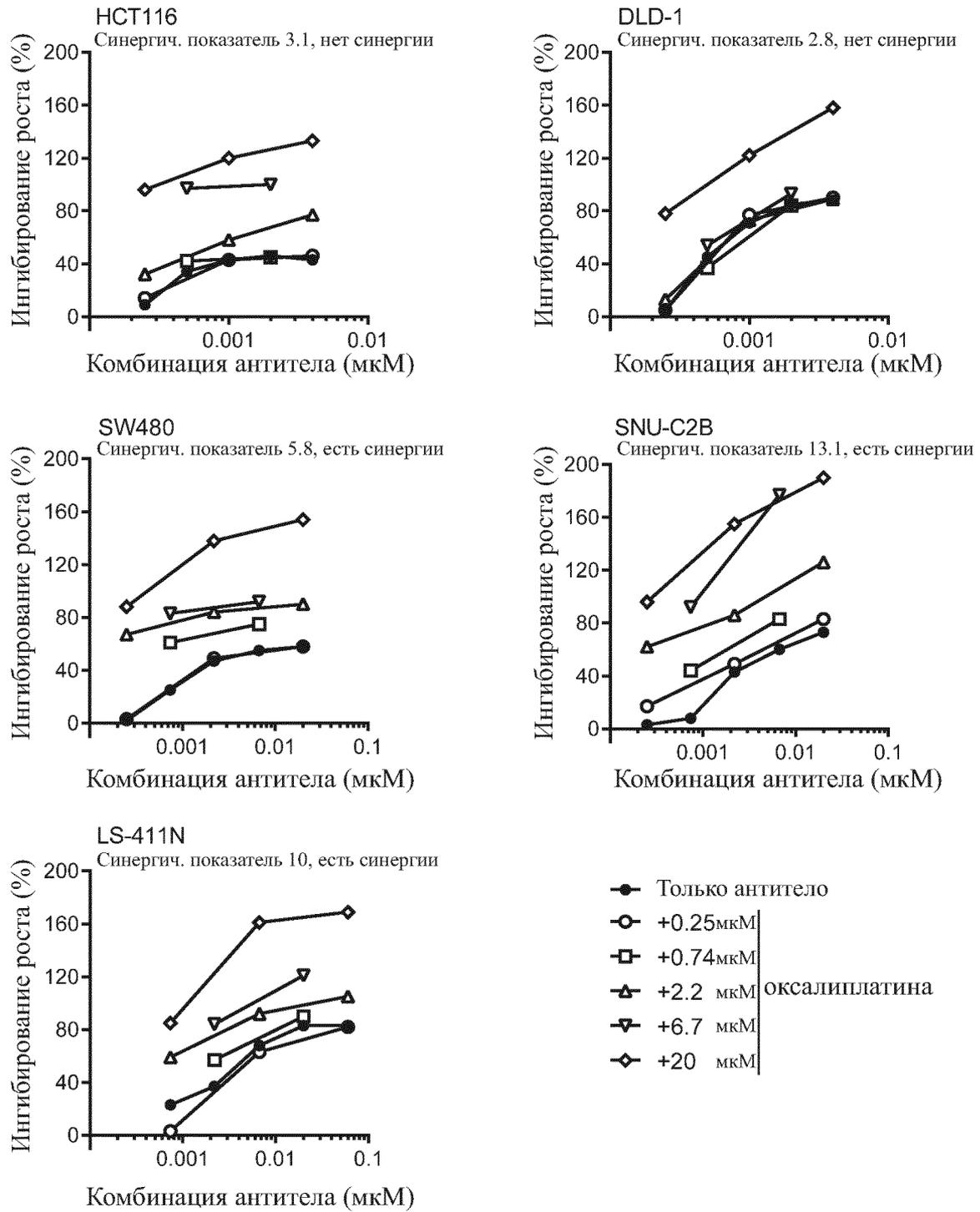


Фиг. 45



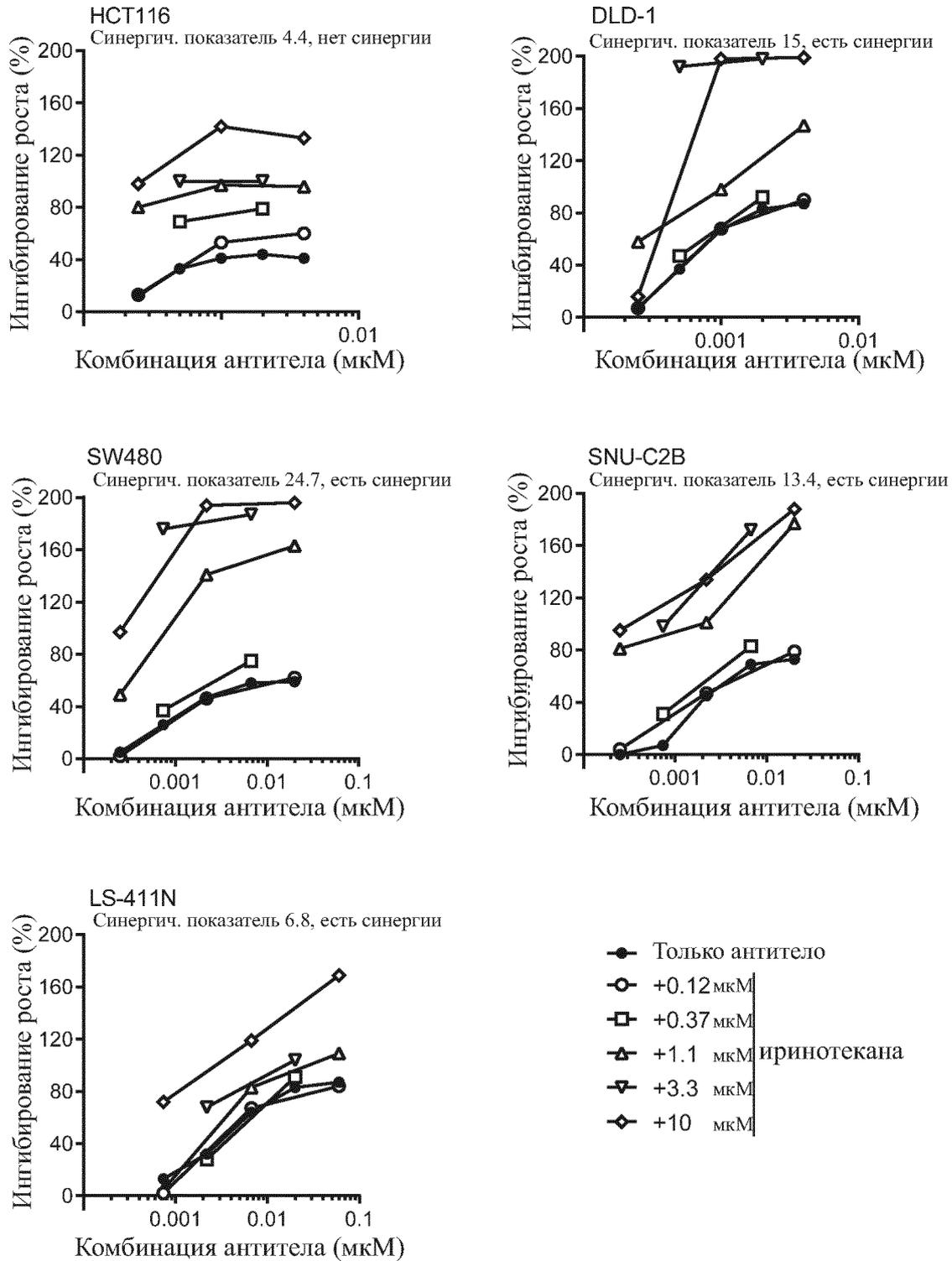
ФИГ. 45 продолжение

A ОКСАЛИПЛАТИН



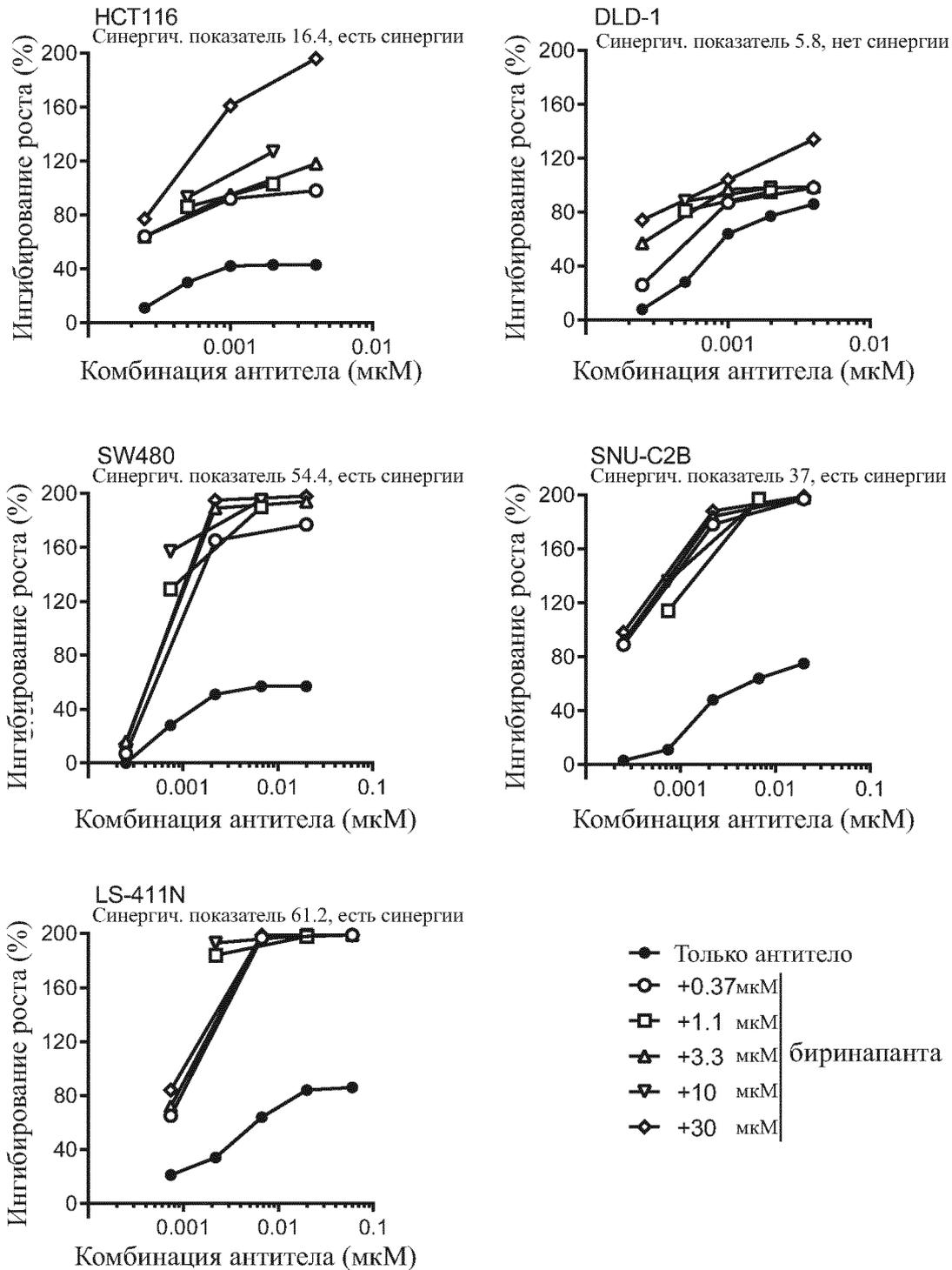
Фиг. 46

В ИРИНОТЕКАН



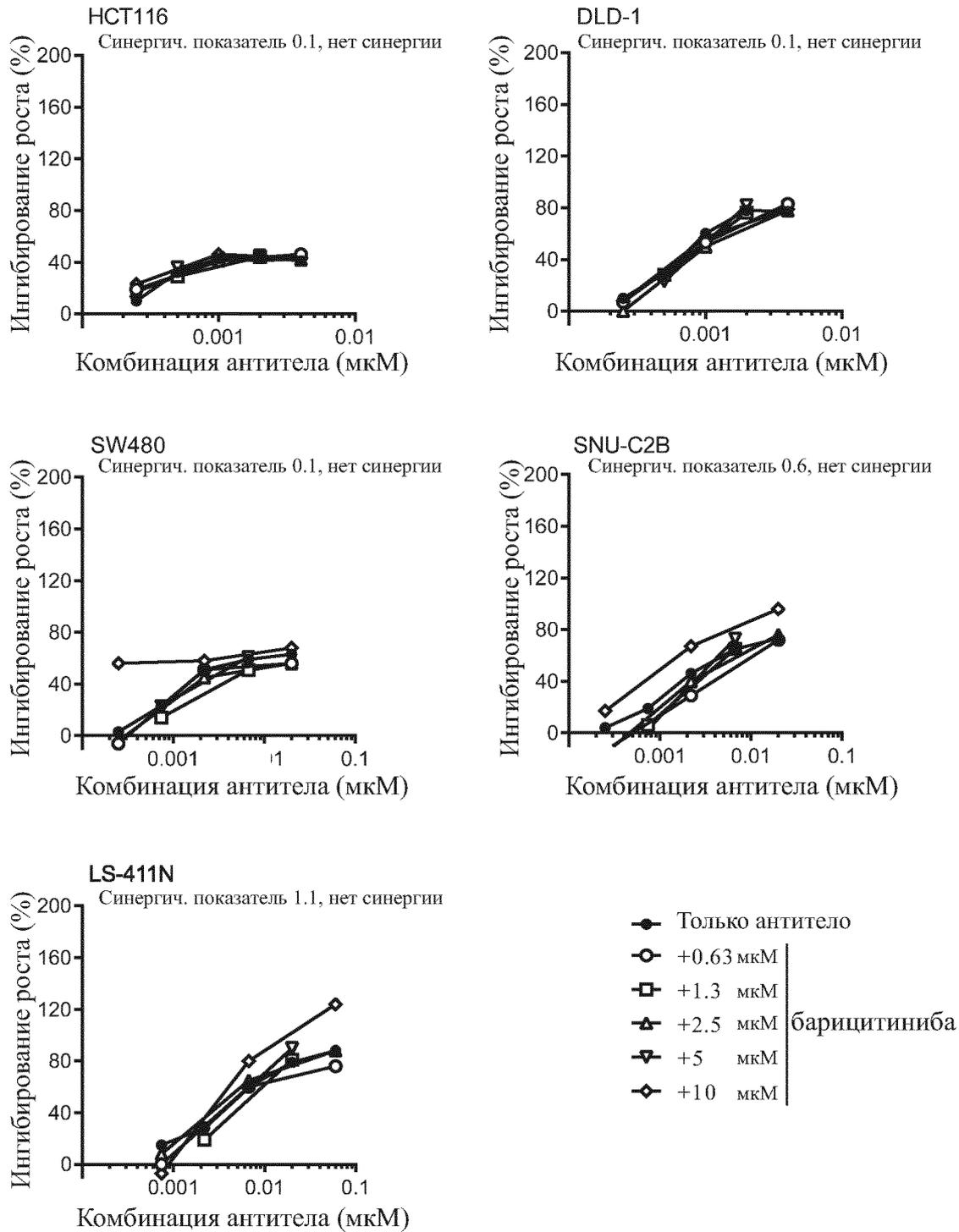
Фиг. 46 продолжение

С БИРИНАПАНТ



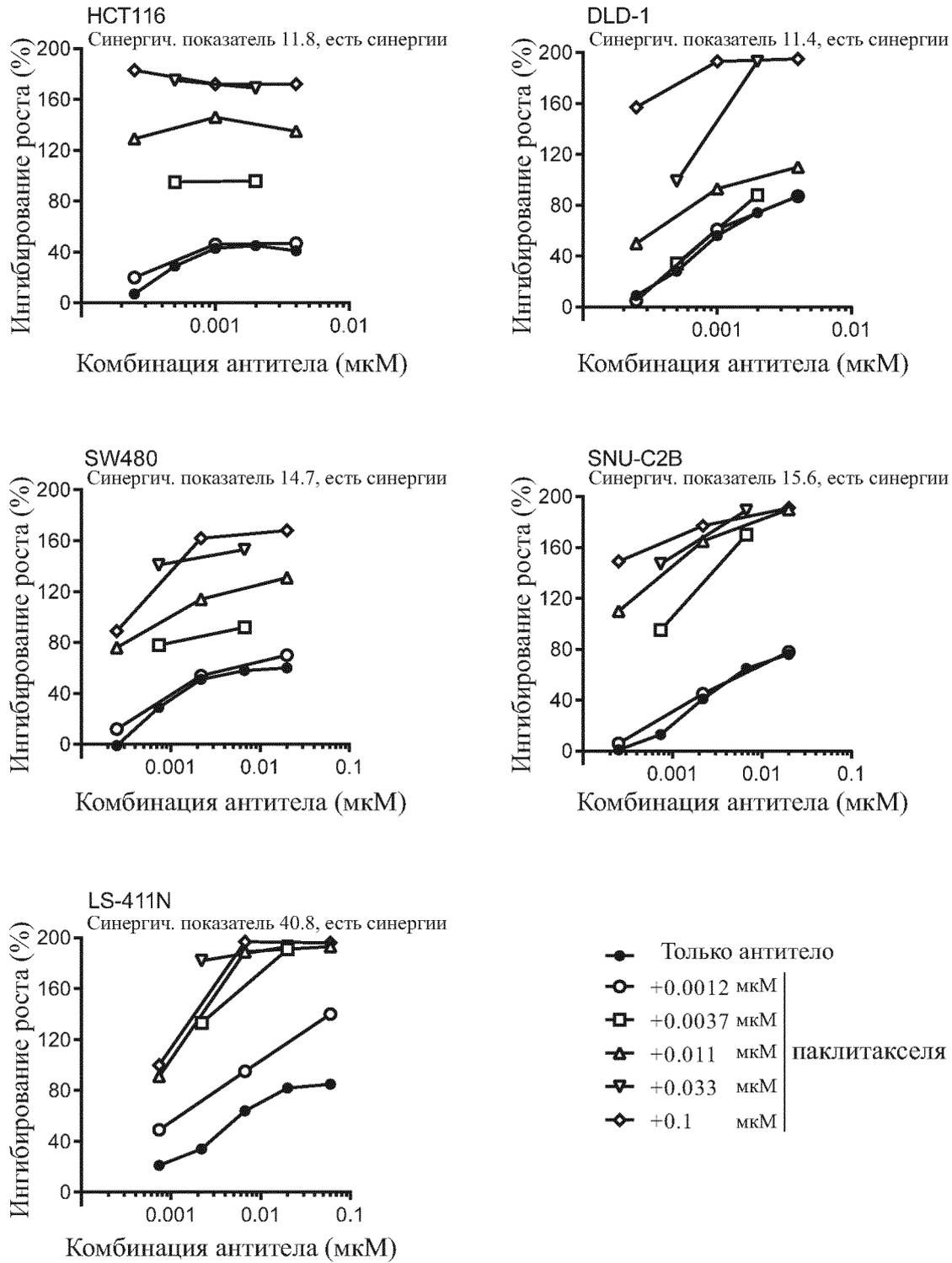
Фиг. 46 продолжение

D БАРИЦИТИНИБ

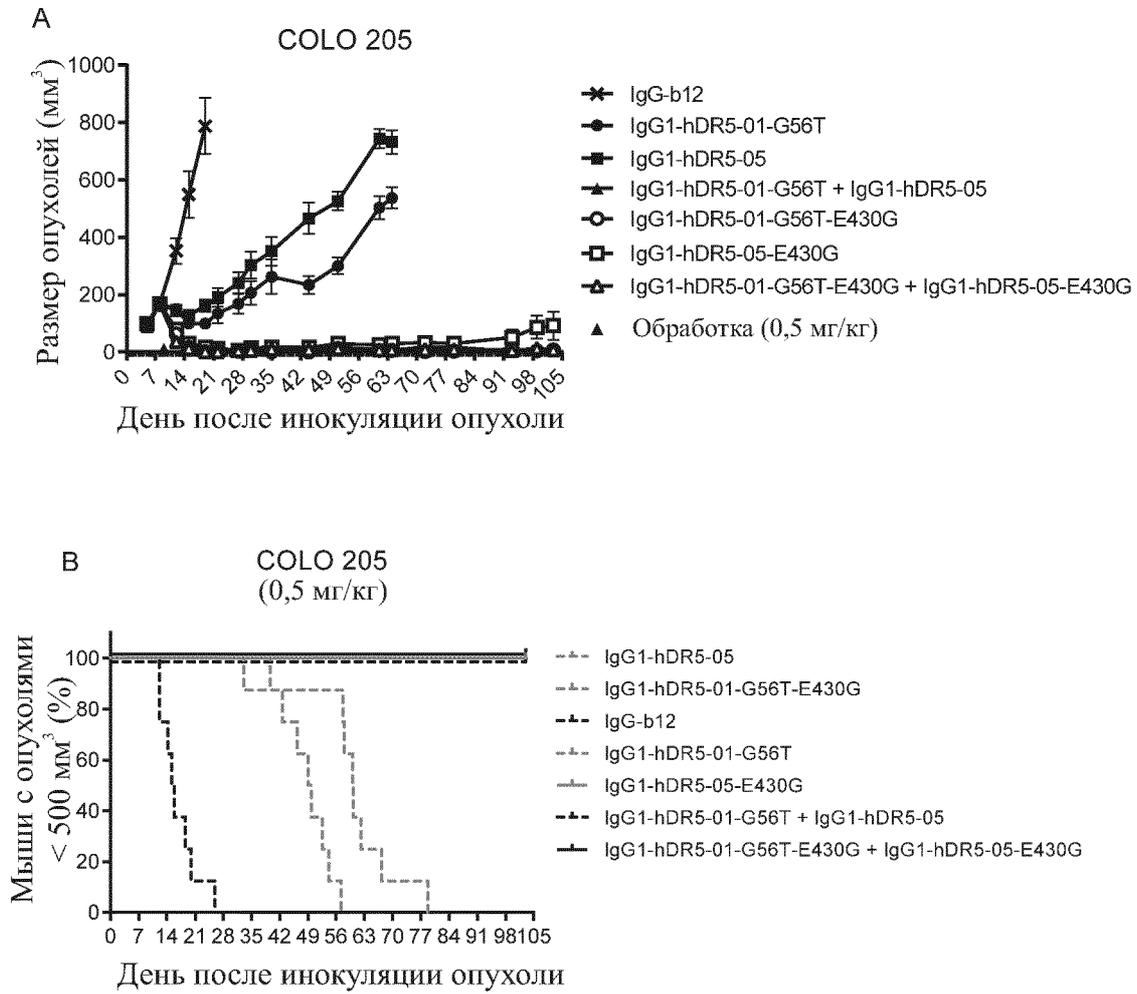


Фиг. 46 продолжение

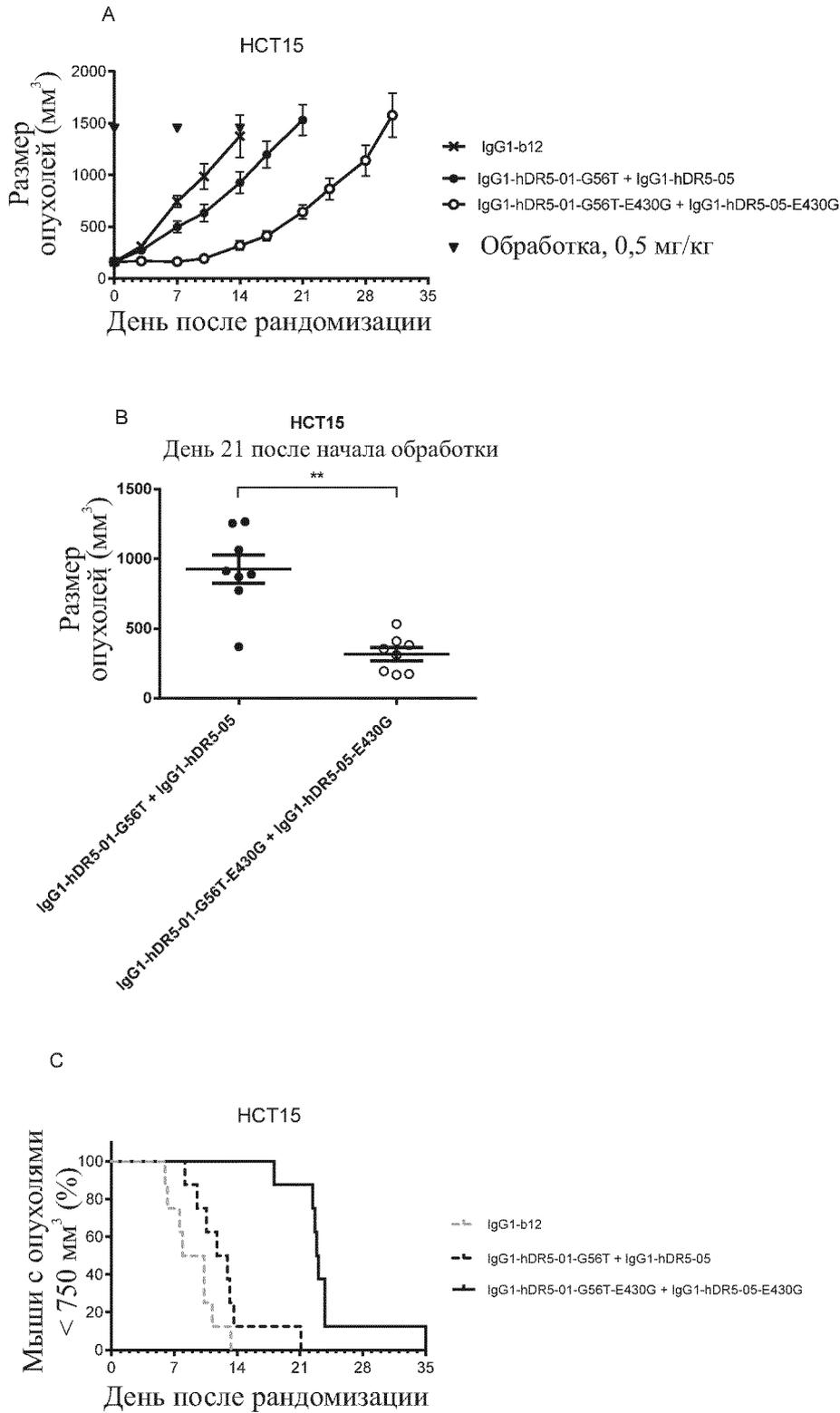
Е ПАКЛИТАКСЕЛЬ



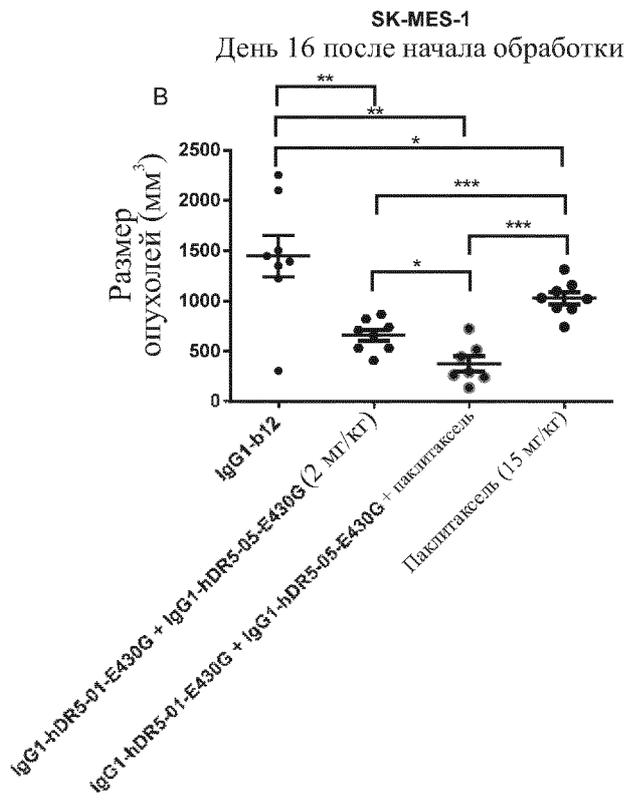
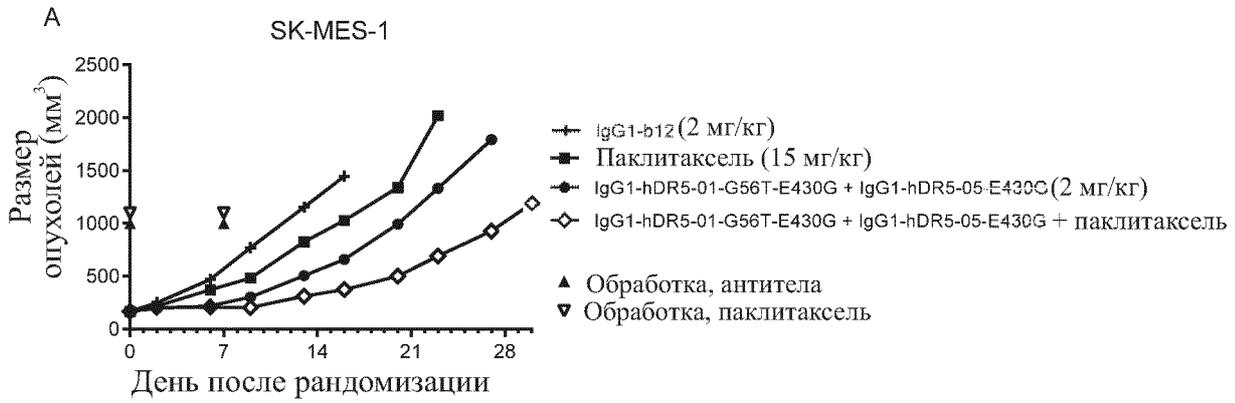
Фиг. 46 продолжение



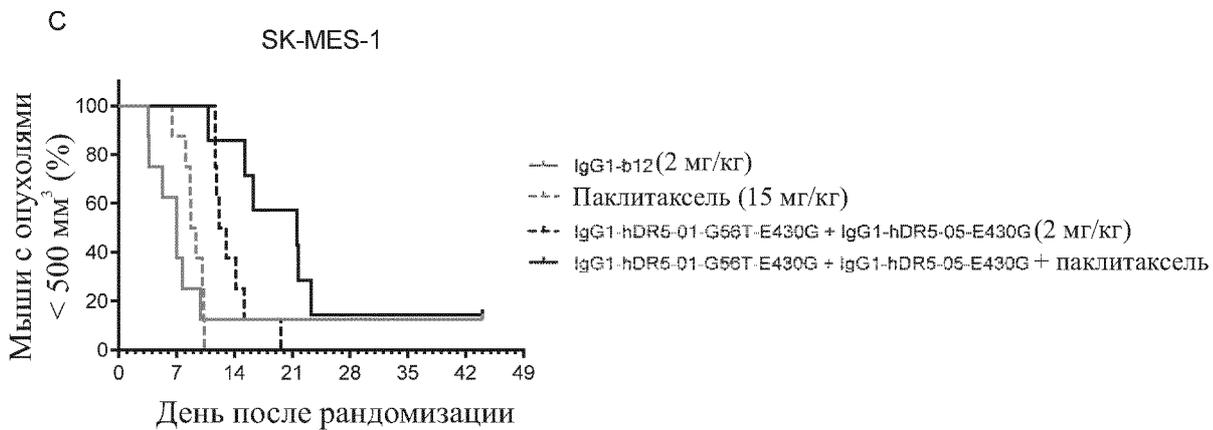
Фиг. 47



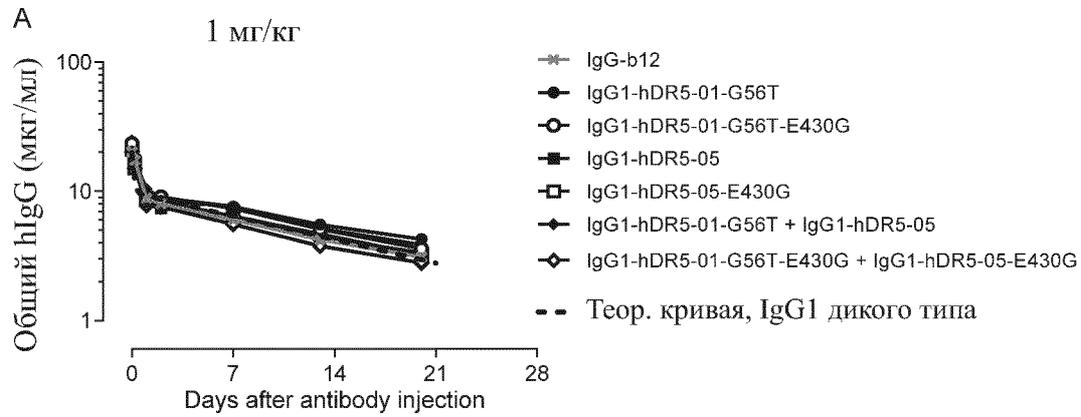
Фиг. 48



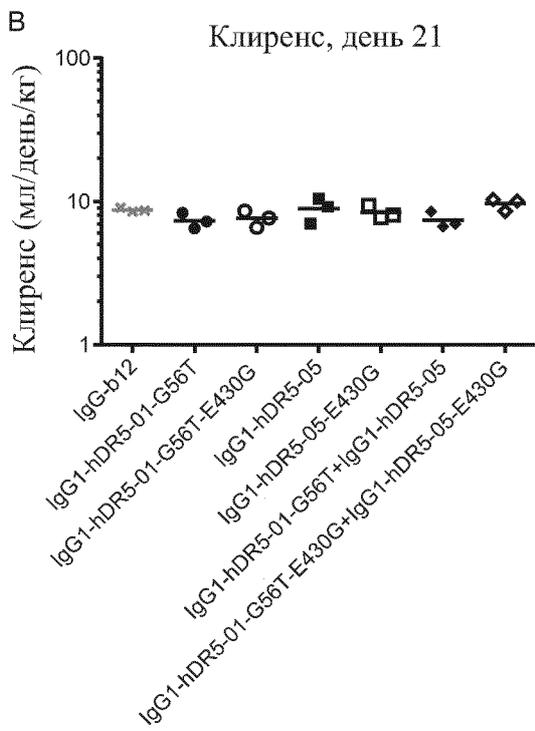
Фиг. 49



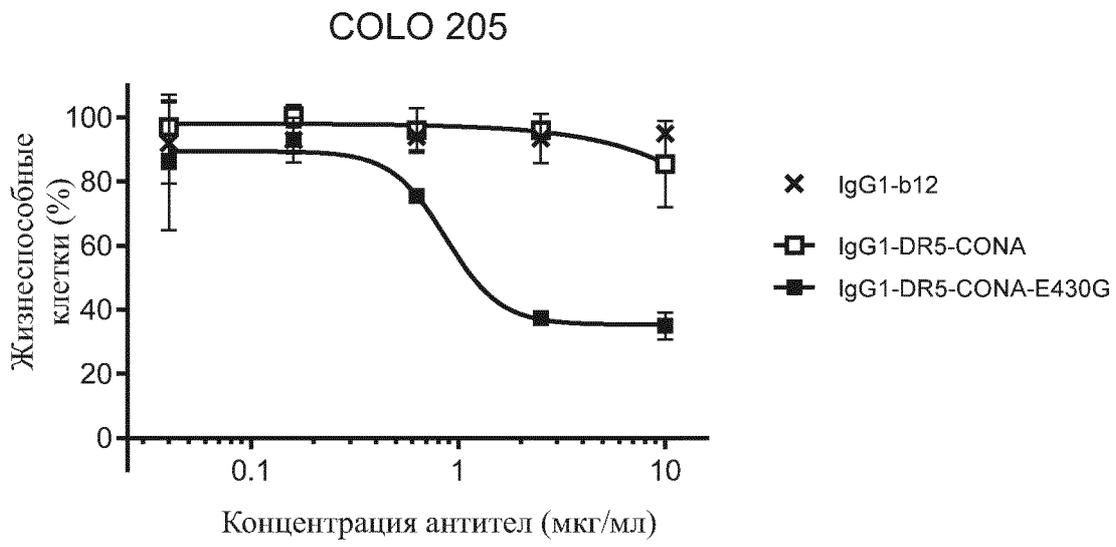
ФИГ. 49 продолжение



3) День после введения антител



Фиг. 50



Фиг. 51