

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092151 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.16

(22) Дата подачи заявки
2019.03.12

(51) Int. Cl. C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(54) АНТИТЕЛА

(31) 18161293.8; 18175347.6

(32) 2018.03.12; 2018.05.31

(33) EP

(86) PCT/EP2019/056197

(87) WO 2019/175198 2019.09.19

(88) 2019.11.14

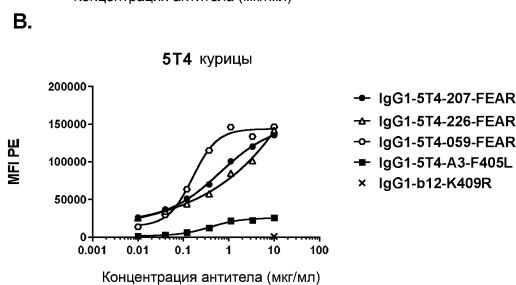
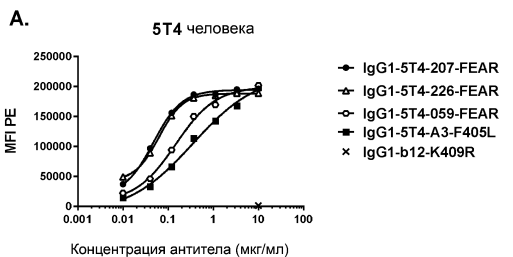
(71) Заявитель:
ГЕНМАБ А/С (DK)

(72) Изобретатель:

Сатейн Давид, Брей Эстгер К.В., Де
Гуэй Барт Э.К.Г., Кемпер Кристел,
Энгелбертс Патрик, Ван Ден Бринк
Эдвард Н, Радемакер Рик, Верзейл
Деннис, Хорбах Шенг, Паррен Паул
(NL)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, связывающимся с 5T4, включая биспецифические антитела, связывающиеся с 5T4 и CD3. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим антитела, и к применению антител для терапевтических и диагностических процедур, в частности, при терапии онкологических заболеваний.



A1

202092151

202092151

A1

АНТИТЕЛА

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам, связывающимся с 5T4, включая биспецифические антитела, связывающиеся с 5T4 и CD3. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела, и применению антител для терапевтических и диагностических процедур, в частности, при терапии онкологических заболеваний.

Предшествующий уровень техники

5T4 (также известный как гликопротеин трофобластов [TPBG] или Wnt-активированный фактор ингибирования 1 [WIF1]) представляет собой однопроходный трансмембранный белок 72 кДа, который содержит 8 лейцин-богатых повторов (LRR) и 7 потенциальных сайтов N-гликозилирования (Zhao et al., 2014 Structure 22, 612-620).

Экспрессия 5T4 ограничена в нормальных тканях взрослого человека, за исключением плаценты (Southall et al., 1990 Br J Cancer 61, 89-95). 5T4 экспрессируется при многих онкологических заболеваниях человека, включая рак почки, шейки матки, яичника, легкого, простаты и толстой кишки (Stern and Harrop, 2017 Cancer Immunol Immunother 66, 415-426; Southall et al., 1990 Br J Cancer 61, 89-95). Экспрессия 5T4 в опухолевых клетках стимулирует развитие опухоли за счет 1) облегчения мезенхимально-эпителиального перехода (Damelin et al., 2011 Cancer Res 71, 4236-4246; Carsberg et al., 1996 Int J Cancer 68, 84-92) и 2) ингибирования канонического пути передачи сигналов Wnt/бета-катенин и активации неканонического пути Wnt (Kagermeier-Schenk et al., 2011 Dev Cell 21, 1129-1143).

Антитела, нацеленные на 5T4, и терапии, нацеленные на 5T4, обладают клинической активностью при нескольких видах онкологических заболеваний, о которых известно, что они экспрессируют 5T4 (включая колоректальный рак, рак легкого и почки). Например, наптумомаб эстафенатокс представляет собой рекомбинантный слитый белок, который состоит из фрагмента 5T4-Fab, генетически слитого с сконструированным вариантом суперантигена SEA/E-120. В настоящее время он проходит клинические испытания в качестве иммунотерапевтического средства для лечения немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), почечно-клеточного (RCC) и рака поджелудочной железы (см., например, Eisen, et al., 2014 Curr Oncol Rep 16, 370). Кроме того, TroVax® представляет собой модифицированную вакцину Ankara, которая экспрессирует конструкции 5T4 (MVA-5T4), которые демонстрируют клиническую пользу при колоректальном раке, раке предстательной железы и почек (см., например, Stern and Harrop, 2017 Cancer Immunol

Immunother 66, 415-426; Scurr et al., 2017 JAMA Oncol 12, 10). Дополнительные антитела против 5T4 описаны в WO2007106744, WO03038098, WO2011048369, WO2013041687, WO2017072207.

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в искоренении онкологических заболеваний, все еще существует потребность в дальнейшем улучшении терапии онкологических заболеваний на основе антител.

Краткое изложение изобретения

Целью настоящего изобретения является предоставление антитела, включающего, по меньшей мере, одну антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4 (гликопротеин трофобластов), где указанное антитело способно блокировать связывание с 5T4 антитела, содержащего переменную тяжелую цепь (VH) область, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9 [059].

Антитело может, в частности, быть биспецифическим антителом и может дополнительно включать антигенсвязывающую область антитела, которое связывается с CD3, например, CD3ε человека (эпсилон), такого как CD3ε человека (эпсилон), как указано в SEQ ID NO: 4.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к нуклеотидной конструкции, включающей

а) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4, как определено в данном документе, и/или

б) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4, как определено в данном документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к экспрессирующему вектору, включающему

а) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4, как определено в данном документе, и/или

б) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4, как определено в данном документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке, содержащей нуклеотидную конструкцию или экспрессирующий вектор, как определено в данном

документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей антитело согласно изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело, как определено в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, как определено в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства, например, для применения при лечении заболевания.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения, причем способ включает введение антитела, композиции или фармацевтической композиции, как определено в данном документе, объекту, нуждающемуся в этом.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам получения антитела, как определено в данном документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему антитело, как определено в данном документе; и инструкции по применению указанного набора.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антиидиотипическому антителу, которое связывается с антигенсвязывающей областью, способной связываться с 5T4 антитела, как определено в данном документе.

Краткое описание чертежей

Фигура 1: Вытеснение антител IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR в комбинации с IgG1-5T4-A3-F405L. Вытеснение антител определяли биослойной интерферометрией на приборе Octet HTX (ForteBio). IgG1-5T4-A3-F405L было иммобилизовано на биосенсоре и загружено 5T4ECDHis человека (зрелый белок SEQ ID NO. 99). Впоследствии загруженные биосенсоры подвергались воздействию IgG1-5T4-A3-F405L, IgG1-5T4-H8-FEAR, IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR или IgG1-5T4-226-FEAR. На фигуре показаны ответы ассоциации (500 с) при воздействии второго антитела. А-С. IgG1-5T4-A3-F405L не показало связывания с иммобилизованным комплексом IgG1-5T4-A3-F405L-5T4ECDHis, что указывает на перекрестную блокировку (самоблокировку) с IgG1-5T4-A3-F405L. Антитела IgG1-5T4-H8-FEAR показали увеличение массы (что указывает на связывание с иммобилизованным комплексом IgG1-5T4-A3-F405L-5T4ECDHis) и, следовательно, отсутствие перекрестного блокирования с IgG1-5T4-A3-F405L. А. IgG1-5T4-059-FEAR, В. IgG1-5T4-207-FEAR и С. IgG1-5T4-226-

FEAR - все показали первоначальное увеличение массы (что указывает на связывание антител с иммобилизованным комплексом IgG1-5T4-A3-F405L-5T4ECDHis) с последующим быстрым уменьшением массы. Такое поведение антител указывает на вытеснение антител (Abdiche YN, et al. (2017) Antibodies Targeting Closely Adjacent or Minimally Overlapping Epitopes Can Displace One Another. PLoS ONE 12(1): e0169535. doi:10.1371/journal.pone.0169535).

Фигура 2: Одновременное связывание антител 5T4 с мембраносвязанным 5T4, измеренное с помощью проточной цитометрии. Антитела 5T4 IgG1-5T4-H8-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR были конъюгированы с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) и добавлены в концентрации 2 мкг/мл к 5T4-экспрессирующим клеткам SK-OV-3 в присутствии 10 мкг/мл неконъюгированных IgG1-5T4-H8-FEAR, IgG1-5T4-A1-F405L, IgG1-5T4-A3-F405L, IgG1-b12, IgG1-5T4-207-FEAR или IgG1-5T4-226-FEAR. Был рассчитан процент связывания FITC-меченых антител и отображен как средний процент связывания $\pm$ стандартное отклонение (SD).

Фигура 3: Связывание антител 5T4 с клетками HEK-293, трансфицированными полноразмерным 5T4 человека и курицы. Клетки HEK-293, транзитивно трансфицированные полноразмерным 5T4 человека (SEQ ID NO: 1) (A) или куриным 5T4 (SEQ ID NO: 3) (B), инкубировали с различными концентрациями антител IgG1-5T4-A3-F405L, IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR или IgG1-5T4-226-FEAR. После инкубации с R-фикоэритрин (PE)-конъюгированным козьим антителом против человеческого IgG F(ab')₂ определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) с помощью проточной цитометрии. В качестве отрицательного контроля был включен IgG1-b12-K409R (10 мкг/мл).

Фигура 4: Способность к интернализации моновалентных антител 5T4. Биспецифические, конъюгированные с токсином антитела, которые распознают 5T4 одним Fab-плечом, в то же время узнавая нерелевантный антиген (HIV-1 gp120, который не экспрессируется на опухолевых клетках) с помощью второго Fab-плеча, были получены путем контролируемого обмена Fab-плеча неконъюгированных антител 5T4 с антителами IgG1-b12 (специфичными к HIV-1 gp120), которые были конъюгированы с одной молекулой дуостатина-3 на одно антитело. Клетки MDA-MB-468 (A) и HCC1954 (B) инкубировали с возрастающими концентрациями антител, как указано. Жизнеспособность клеток измеряли через 5 дней. Данные представлены как средний процент жизнеспособных клеток из трех повторных экспериментов. В качестве отрицательного контроля был включен моноспецифический двухвалентный IgG1-b12, конъюгированный с дуостатином-3 (IgG1-b12-vcDuo3).

Фигура 5 (I): Связывание биспецифических антител CD3x5T4 с полноразмерным 5T4 человека и яванского макака, трансфицированным в клетки НЕК-293. Связывание моновалентных и двухвалентных антител 5T4 анализировали с использованием клеток НЕК-293, транзитивно трансфицированных полноразмерным 5T4 человека (левые панели) или яванского макака (правые панели). Клетки инкубировали с возрастающими концентрациями антител, как указано. После вторичного мечения конъюгированным с FITC козьим F(ab')₂ против IgG человека связывание анализировали с помощью проточной цитометрии. В качестве антитела отрицательного контроля был включен IgG1-b12-K409R (3 мкг/мл). Данные представлены как значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) для двух технических повторов $\pm$ стандартное отклонение. А. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-207-FEAR. В. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR. С. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR. D. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-H8-FEAR и IgG1-5T4-H8-FEAR.

Фигура 5 (II): Связывание биспецифических антител CD3x5T4 с 5T4 яванского макака и человека, трансфицированных в клетки НЕК-293. Моно- и бивалентное связывание антител 5T4 анализировали с использованием клеток НЕК-293, транзитивно трансфицированных 5T4 человека (левые панели) или 5T4 яванского макака (правые панели). Клетки инкубировали с возрастающими концентрациями антител, как указано. После вторичного мечения конъюгированного с фикоэритрином (PE) козьего F(ab')₂ против IgG человека связывание анализировали с помощью проточной цитометрии. А. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-207-FEAR; В. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR; С. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR; D. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR и IgG1-5T4-106-FEAR; E. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-076-FEAR и IgG1-5T4-076-FEAR; F. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-085-FEAR и IgG1-5T4-085-FEAR; G. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-127-FEAR и IgG1-5T4-127-FEAR; H. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR и IgG1-5T4-A1-FEAR; I. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR и IgG1-5T4-A3-FEAR.

Фигура 6 (I): Связывание биспецифических CD3x5T4 и моноспецифических антител 5T4 с 5T4-положительными опухолевыми клетками человека. Моно- и двухвалентное связывание антител 5T4 с клетками HeLa (левые панели) или клетками MDA-MB-231 (правые панели) определяли с помощью проточной цитометрии. Клетки инкубировали с возрастающими концентрациями антител. После вторичного мечения

конъюгированным с FITC козьим F(ab')₂ против IgG человека, MFI определяли с помощью проточной цитометрии. А. Связывание антител bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-207-FEAR с клетками HeLa (левая панель) или клетками MDA-MB-231 (правая панель). В. Связывание антител bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR с клетками HeLa (левая панель) или клетками MDA-MB-231 (правая панель). С. Связывание антител bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR с клетками HeLa (левая панель) или клетками MDA-MB-231 (правая панель). IgG1-b12-K409R (3 мкг/мл) включали в качестве отрицательного контроля (белые кружки). Фигура 6 (II): Связывание биспецифических антител CD3x5T4 и моноспецифических антител 5T4 с клетками HeLa. Моно- и двухвалентное связывание антител 5T4 с клетками HeLa определяли методом проточной цитометрии. Клетки инкубировали с возрастающими концентрациями антител. После вторичного мечения конъюгированным с фикоэритрином (PE) козьим F(ab')₂ против человеческого IgG определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) с помощью проточной цитометрии. А. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-207-FEAR; В. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR; С. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR; D. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR и IgG1-5T4-106-FEAR; Е. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-085-FEAR и IgG1-5T4-085-FEAR; F. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-127-FEAR и IgG1-5T4-127-FEAR; G. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR и IgG1-5T4-A1-FEAR; H. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR и IgG1-5T4-A3-FEAR

Фигура 6 (III): Связывание биспецифических антител CD3x5T4 и моноспецифических антител 5T4 с клетками MDA-MB-231. Моно- и двухвалентное связывание антител 5T4 с клетками MDA-MB-231 определяли методом проточной цитометрии. Клетки инкубировали с возрастающими концентрациями антител. После вторичного мечения с помощью PE-конъюгированного козьего F(ab')₂ против человеческого IgG определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) с помощью проточной цитометрии. А. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-207-FEAR; В. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR; С. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR; D. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR и IgG1-5T4-106-FEAR; Е. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-085-FEAR и IgG1-5T4-085-FEAR; F. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-127-FEAR и IgG1-5T4-127-FEAR; G. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR и IgG1-5T4-A1-FEAR; H.

Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR и IgG1-5T4-A3-FEAR.

Фигура 7 (I): Индукция цитотоксичности *in vitro* биспецифическими антителами CD3x5T4 в клетках MDA-MB-231 с использованием очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток. Клетки MDA-MB-231 инкубировали с возрастающими концентрациями биспецифических антител CD3x5T4 или моноспецифических двухвалентных антител 5T4 и выделенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток в соотношении эффектор: клетка-мишень (Е:Т) 8: 1. Для этого эксперимента использовали очищенные Т-клетки, полученные от двух разных доноров, донора А (левые панели) и донора В (правые панели). Цитотоксичность определяли путем измерения процентного содержания жизнеспособных клеток MDA-MB-231 после 72 часов инкубации (% жизнеспособных клеток = [поглощение образца - поглощение обработанных стауропорином клеток-мишеней]/[поглощение необработанных клеток-мишеней - поглощение обработанных стауропорином клеток-мишеней] x 100). А. Цитотоксичность, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-207-FEAR; В. Цитотоксичность, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR; С. Цитотоксичность, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR.

Фигура 7 (II): значения IC50 цитотоксичности, индуцированной *in vitro* биспецифическими антителами CD3x5T4 в клетках MDA-MB-231 с использованием очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток. Значения IC50 цитотоксичности, опосредованной Т-клетками, индуцированной bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEGAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEGAL-hsIgT4-226-FEGAL-hsIgT4-226-FEGAL-hs1 -226-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR в клетках MDA-MB-231 анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02. Данные представлены как средние значения IC50 для двух разных доноров ± стандартное отклонение.

Фигура 8 (I): Индукция цитотоксичности биспецифическими антителами CD3x5T4 в клетках MDA-MB-231 с использованием Т-клеток в качестве эффекторных клеток *in vitro*. Клетки MDA-MB-231 инкубировали с возрастающими концентрациями биспецифических антител CD3x5T4 или гомодимеров 5T4 и выделяли Т-клетки в качестве эффекторных клеток в соотношении Е: Т 8: 1. Для этого эксперимента использовались три

разных донора. Показанные данные представляют собой средний % выживаемости $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM) трех протестированных доноров. А. Т-клеточная цитотоксичность (снижение выживаемости), индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-207-FEAR; В. Опосредованная Т-клетками цитотоксичность, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR; С. Опосредованная Т-клетками цитотоксичность, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR; D. Опосредованная Т-клетками цитотоксичность, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR и IgG1-5T4-106-FEAR; E. Опосредованная Т-клетками цитотоксичность, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR и IgG1-5T4-A1-FEAR; F. Опосредованная Т-клетками цитотоксичность, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR и IgG1-5T4-A3-FEAR.

Фигура 8 (II): значения IC50 цитотоксичности, индуцированной биспецифическими антителами CD3x5T4 в клетках MDA-MB-231 с использованием Т-клеток в качестве эффекторных клеток *in vitro*. Значения IC50 опосредованной Т-клетками цитотоксичности, индуцированной биспецифическими антителами CD3x5T4 в клетках MDA-MB-231, анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02. Данные представлены как средние значения IC50 трех разных доноров $\pm$ стандартное отклонение. А. Значения IC50 опосредованной Т-клетками цитотоксичности, индуцированной bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR-bsIgT4-FEAR-bsIgT4-FEAR-bsIgG3 106-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR; В. Значения IC50 опосредованной Т-клетками цитотоксичности, индуцированной bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEAL bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR.

Фигура 9 (I): активация Т-клеток *in vitro* биспецифическими антителами CD3x5T4 в присутствии клеток MDA-MB-231. Клетки MDA-MB-231 инкубировали с возрастающими концентрациями биспецифических антител CD3x5T4 и моноспецифических двухвалентных антител 5T4, как указано, и выделяли Т-клетки в качестве эффекторных клеток в соотношении Е:Т 8:1. Экспрессию трех маркеров активации Т-клеток (PD1

[верхние панели], CD25 [средние панели] и CD69 [нижние панели]) анализировали с помощью проточной цитометрии. Для этого эксперимента использовались два разных донора: донор А (закрашенные символы) и донор В (светлые символы). А. Активация Т-клеток, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-207-FEAR; В. Активация Т-клеток, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR; С. Активация Т-клеток, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR.

Фигура 9 (II): значения EC50 активации Т-клеток *in vitro* биспецифическими антителами CD3x5T4 в присутствии клеток MDA-MB-231. Значения EC50 маркеров активации Т-клеток *in vitro* (PD1, CD25 и CD69), индуцированных bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5ART4, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR в присутствии клеток MDA-MB-231 анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02. Данные представлены как среднее значение двух разных доноров $\pm$ стандартное отклонение.

Фигура 10 (I): активация Т-клеток *in vitro* биспецифическими антителами CD3x5T4 в присутствии клеток MDA-MB-231. Клетки MDA-MB-231 инкубировали с возрастающими концентрациями биспецифических антител CD3x5T4 и гомодимеров 5T4 и выделяли Т-клетки в качестве эффекторных клеток в соотношении Е: Т 8: 1. Активацию Т-клеток измеряли по увеличению % CD69+ клеток в популяциях CD4+ (левые панели) и CD8+ (правые панели) Т-клеток. Для этого эксперимента использовались три разных донора; показанные данные представляют собой средний % положительной регуляции CD69 $\pm$ стандартная ошибка среднего у трех протестированных доноров. А. Активация Т-клеток, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-207-FEAR; В. Активация Т-клеток, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR; С. Активация Т-клеток, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR; D. Активация Т-клеток, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR и IgG1-5T4-106-FEAR; Е. Активация Т-клеток, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR, bsIgG1-huCD3-

H101G-FEALx5T4-A1-FEAR и IgG1-5T4-A1-FEAR; F. Активация Т-клеток, индуцированная в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR и IgG1-5T4-A3-FEAR.

Фигура 10 (II): значения EC50 активации Т-клеток *in vitro* биспецифическими антителами CD3x5T4 в присутствии клеток MDA-MB-231. Значения EC50 маркеров активации Т-клеток (увеличение %CD69+ [AB], CD25+ [CD] и PD1+ [EF], CD25 и CD69 клеток в популяциях CD4+ и CD8+ Т-клеток), индуцированных *in vitro* биспецифическими антителами CD3x5T4 в присутствии клеток MDA-MB-231 анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02. Данные представлены как среднее значение трех разных доноров $\pm$ стандартное отклонение. А. Значения EC50 положительной регуляции CD69, индуцированной bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-FEAL-huCD3-FEAL-huCD3-FEAL-huCD3 bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR; В. Значения EC50 положительной регуляции CD69, индуцированной bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx3-T4-059s H101G-FEALx5T4-106-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR. В. Значения EC50 положительной регуляции CD25, индуцированной bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-FEAL-huCD3-FEAL-huCD3-FEAL-huCD3-FEAR bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR; D. Значения EC50 положительной регуляции CD25, индуцированной bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx3-T4-059s. H101G-FEALx5T4-106-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR. Е. Значения EC50 положительной регуляции PD1, индуцированной bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-FEAL-huCD3-FEAL-huCD3-FEAL-huCD3 bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR; F. Значения EC50 положительной регуляции PD1, индуцированной bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx3-T4-059s. H101G-FEALx5T4-106-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR.

Фигура 11: Высвобождение цитокинов Т-клетками, индуцированное биспецифическими антителами CD3x5T4 в присутствии 5T4-положительных опухолевых клеток. Клетки MDA-MB-231 инкубировали с биспецифическими антителами к CD3x5T4

с концентрацией 0,2 мкг/мл (bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR) и 5T4 моноспецифическими антителами (IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR или IgG1-5T4-059-FEAR) и выделенными Т-клетками в качестве эффекторных клеток в соотношении Е:Т 8:1. Высвобождение цитокинов анализировали с помощью анализа U-PLEX. А. Концентрация IL-10, IL-13 и TNF в надосадочной жидкости совместных культур Т-клеток (полученных от донора А) и опухолевых клеток после 72 часов инкубации с биспецифическими антителами CD3x5T4 или моноспецифическими антителами 5T4. В. Концентрация IL-10, IL-13 и TNF в надосадочной жидкости совместных культур Т-клеток (полученных от донора В) и опухолевых клеток после 72 часов инкубации с биспецифическими антителами CD3x5T4 или моноспецифическими антителами 5T4.

Фигура 12: Индукция цитотоксичности *in vitro* биспецифическими антителами CD3x5T4 в клетках SK-OV-3 с использованием PBMC в качестве эффекторных клеток при различных соотношениях Е:Т. Клетки SK-OV-3 инкубировали с возрастающими концентрациями bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR (левые панели) или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (правые панели) и PBMC в качестве эффекторных клеток в соотношении Е:Т 1: 2, 1: 1, 2: 1, 4: 1, 8: 1 и 12: 1. Цитотоксичность определяли путем измерения процента жизнеспособных клеток SK-OV-3 через 72 часа инкубации (% жизнеспособных клеток = [поглощение образца - поглощение клеток-мишеней, обработанных стауроспорином]/[поглощение необработанных клеток-мишеней - поглощение клеток-мишеней, обработанных стауроспорином] x 100). Для этого эксперимента использовались PBMC от двух разных доноров: А. донора С и В. донора D.

Фигура 13: Индукция цитотоксичности в клетках SK-OV-3 *in vitro* биспецифическими антителами CD3x5T4 с использованием Т-клеток в качестве эффекторных клеток при различных соотношениях Е:Т. Клетки SK-OV-3 инкубировали с возрастающими концентрациями bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR (левые панели) или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (правые панели) и выделяли Т-клетки в качестве эффекторных клеток в Соотношение Е:Т составляет 1: 2, 1: 1, 2: 1, 4: 1 и 8: 1. Эффективность цитотоксичности определяли путем измерения процента жизнеспособных клеток SK-OV-3 через 72 часа инкубации (% жизнеспособных клеток = [поглощение образца - поглощение обработанных стауроспорином клеток-мишеней]/[поглощение необработанных клеток-мишеней - поглощение обработанных стауроспорином клетки-мишени] x 100). В этом эксперименте использовали Т-клетки от двух разных доноров: А.

донора Е и В. донора F.

Фигура 14. Противоопухолевая активность биспецифических антител CD3x5T4 на модели ксенотрансплантата MDA-MB-231 у мышей NSG-HIS. А. Средний размер опухоли в модели ксенотрансплантата MDA-MB-231 у мышей NSG-HIS после обработки PBS (контроль носителя), 0,5 мг/кг bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR или 0,5 мг/кг bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR. Размер опухоли оценивали штангенциркулем. Планки погрешностей указывают SEM. В. Процент мышей NSG-HIS, которым инъецировали клетки MDA-MB-231 с размером опухоли <500 мм³, после обработки PBS, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR.

Фигура 15: Связывание непосредственно FITC-меченных 5T4-специфических антител с вариантами 5T4 человека с одиночными мутациями аланина в положениях 32-355 ECD 5T4 человека, как определено с помощью проточной цитометрии. Связывание выражали в виде Z-балла (кратное изменение) в качестве меры изменения связывания по сравнению с контрольным антителом, специфичным для 5T4 без перекрестного блокирования (bsIgG1-5T4-A1-F405Lxb12-FEAR-FITC), используемым для нормализации. Число на оси абсцисс относится к аминокислотным положениям в 5T4 человека (SEQ ID: 1). Остатки, в которых Z-балл связывания была ниже, чем -1,5 (обозначено пунктирной линией), считаются «мутантами с потерей связывания». Остатки с положительным Z-баллом связывания представляют собой потерю связывающих остатков для неперекрестного блокирования специфического контрольного антитела 5T4 (bsIgG1-5T4-A1-67F-F405Lxb12-FEAR-FITC). Остатки в положениях 38, 45, 49, 51, 54, 62, 64, 66, 68, 71, 72, 77, 91, 104, 108, 110, 112, 118, 121, 122, 135, 137, 155, 161, 167, 171, 201, 202, 205, 208, 218, 231, 269, 279, 298, 300, 303, 323, 324, 340 и 344 не оценивались, поскольку эти положения содержали либо эндогенные аланины, либо цистеины. Представленные данные представляют собой Z-баллы для связывания (A) bsIgG1-b12-FEALx5T4-059-FEAR-FITC, (B) bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR-FITC, (C) bsIgG1-b12-FEALx5T4-226-FEAR-FITC и (D) bsIgG1-5T4-A3-F405Lxb12-FEAR-FITC. Заглубленные остатки с Z-баллом чуть ниже -1,5, которые, как предполагается, будут пространственно отделены от большей части поверхностных потерь связывающих остатков, были исключены (для bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR-FITC: L281 [Z-балл: -1,57] и P326 [Z-балл: 1,54]; и для bsIgG1-b12-FEALx5T4-226-FEAR-FITC: L273 [Z-балл: -1,58], L281 [Z-балл: -1,65], N294 [Z-балл: -1,57], L309 [Z-балл: -1,63] и P326 [Z-балл: -1,67]).

Фигура 16 (I): Индукция цитотоксичности *in vitro* биспецифическими антителами CD3x5T4 в опухолевых клетках разных этиологий с использованием Т-клеток в качестве эффекторных клеток. Опухолевые клетки инкубировали с возрастающими

концентрациями bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR или контрольных антител (bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR, bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR в качестве эффекторных клеток) и выделенных Т-клеток в соотношении Е:Т 4: 1. Цитотоксичность (снижение выживаемости) определяли путем измерения процента жизнеспособных опухолевых клеток через 72 часа инкубации. Представленные данные представляют собой средний % выживаемости $\pm$ стандартная ошибка среднего для повторяющихся лунок от одного репрезентативного донора, по меньшей мере, из трех протестированных доноров. А. Цитотоксичность (снижение выживаемости), индуцированная в клеточных линиях рака поджелудочной железы; В. Цитотоксичность (снижение выживаемости), индуцированная в клеточных линиях рака шейки матки.

Фигура 16 (II): Значения IC50 цитотоксичности, индуцированной *in vitro* биспецифическими антителами CD3x5T4 в линиях опухолевых клеток разных этиологий с использованием Т-клеток в качестве эффекторных клеток. Значения IC50 опосредованной Т-клетками цитотоксичности, индуцированной bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR в опухолевых клетках по указанным показаниям, анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02. Данные представлены как средние значения IC50, по меньшей мере, трех разных доноров (см. Таблицу 10) $\pm$ стандартное отклонение.

Фигура 17 (I): Активация Т-клеток *in vitro* биспецифическими антителами CD3x5T4 в присутствии опухолевых клеток разных этиологий. Опухолевые клетки инкубировали с возрастающими концентрациями bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR или контрольных антител (bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR, bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR в качестве эффекторных клеток и выделенных Т-клеток. соотношение Е:Т 4: 1 в течение 72 часов. Активацию Т-клеток измеряли по положительной регуляции CD69 (% от CD69+ клеток) в популяциях Т-клеток CD4+ (левые панели) и CD8+ (правые панели). Представленные данные представляют собой средний процент CD69+ клеток $\pm$ стандартное отклонение дублирующих лунок от одного репрезентативного донора из, по меньшей мере, трех протестированных доноров. А. Активация Т-клеток, индуцированная биспецифическими антителами CD3x5T4 в присутствии линии клеток рака поджелудочной железы ВхРс-3; В. Активация Т-клеток, индуцированная биспецифическими антителами CD3x5T4 в присутствии линии клеток рака поджелудочной железы PANC-1; С. Активация Т-клеток, индуцированная биспецифическими антителами CD3x5T4 в присутствии линии клеток рака шейки матки SiHa; D. Активация Т-клеток, индуцированная биспецифическими антителами CD3x5T4 в присутствии линии клеток рака шейки матки Ca Ski.

Фигура 17 (II): Значения EC50 активации Т-клеток *in vitro* биспецифическими антителами CD3x5T4 в присутствии линий опухолевых клеток различных этиологий. Значения EC50 активации Т-клеток (% CD69+ клеток в популяциях CD4+ и CD8+ Т-клеток), индуцированной bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR в совместном культивировании с линиями опухолевых клеток разных этиологий, анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02. Данные представлены как средние значения EC50, по меньшей мере, трех разных доноров (см. Таблицу 10) $\pm$ стандартное отклонение. А. Значения EC50 активации CD4+ Т-клеток, индуцированной bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR в присутствии указанных линий опухолевых клеток; В. Значения EC50 активации CD8+ Т-клеток, индуцированной bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR в присутствии указанных линий опухолевых клеток.

Подробное описание

Определения

Используемый в данном документе термин «антитело» предназначен для обозначения молекулы иммуноглобулина, фрагмента молекулы иммуноглобулина или производного любого из них, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном в типичных физиологических и/или опухолеспецифических условиях с периодом полувыведения значительных периодов времени, например, по меньшей мере, около 30 минут, по меньшей мере, около 45 минут, по меньшей мере, около одного часа, по меньшей мере, около двух часов, по меньшей мере, около четырех часов, по меньшей мере, около 8 часов, по меньшей мере, около 12 часов, по меньшей мере, около 24 часов или более, по меньшей мере, около 48 часов или более, по меньшей мере, около 3, 4, 5, 6, 7 или более дней и т.д., или любом другом соответствующем функциональном периоде (таком как время, достаточное для индукции, стимулирования, усиления и/или модуляции физиологического ответа, связанного со связыванием антитела с антигеном, и/или время, достаточное для интернализации антитела). Связывающая область (или связывающий домен, который может использоваться в данном документе, оба имеют одинаковое значение), которая взаимодействует с антигеном, включает переменные области как тяжелой, так и легкой цепей молекулы иммуноглобулина. Константные области антител (Ab) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент в классический путь активации комплемента.

В контексте настоящего изобретения термин «антитело» включает моноклональное антитело (mAb), антителоподобный полипептид, такой как химерное антитело и

гуманизированное антитело, а также «фрагмент антитела» или его «фрагмент», сохраняющий способность специфически связываться с антигеном (антигенсвязывающим фрагментом), обеспечиваемый любым известным способом, таким как ферментативное расщепление, пептидный синтез и рекомбинантные методы, и сохранение способности конъюгировать с токсином. Антитело, как определено в соответствии с изобретением, может обладать любым изотипом, если иное не ограничено настоящим описанием.

Как указано выше, используемый в данном документе термин «антитело», если не указано иное или явно не противоречит контексту, включает фрагменты антитела, которые сохраняют способность специфически взаимодействовать, например, связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена с помощью фрагментов полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антитело», включают (i) Fab' или Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из вариабельного домена легкой цепи (VL), вариабельного домена тяжелой цепи (VH), константной области легкой цепи (CL) и доменов константной области 1 (CH1) тяжелой цепи или моновалентного антитела, как описано в WO 2007/059782; (ii) фрагменты F (ab')₂, двухвалентные фрагменты, содержащие два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий по существу из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb Ward et al., *Nature* 341, 544-546 (1989), который по существу состоит из домена VH и также называется доменным антителом Holt et al; *Trends Biotechnol.* 2003 Nov;21(11):484-90; (vi) верблюдовые или нанотела Revets et al; *Expert Opin Biol Ther.* 2005 Jan;5(1):111-24 и (vii) выделенная область, определяющая комплементарность (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, который позволяет создавать их в виде единой белковой цепи, в которой VL и пара областей VH с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), см., например, Revets et al; *Expert Opin Biol Ther.* 2005 Jan;5(1):111-24 и Bird et al., *Science* 242, 423-426 (1988). Такие одноцепочечные антитела охвачены термином антитело пока не определено иное или очевидно не указано контекстом. Хотя такие фрагменты, как правило, включены в обозначение антитела, они все вместе или по отдельности представляют собой уникальные признаки настоящего изобретения, демонстрирующие различные биологические свойства и применимость. Эти и другие применяемые антителы фрагменты в контексте настоящего изобретения обсуждаются далее в данном документе.

Антитело можно продуцировать и собирать из различных систем экспрессии или продукции *in vitro* или *ex vivo*, например, из рекомбинантно модифицированных клеток-хозяев, из гибридом или систем, в которых используются клеточные экстракты, поддерживающие транскрипцию и/или трансляцию последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих антитело. Следует понимать, что множество различных антител, антитела, определенные в контексте настоящего изобретения, могут быть получены путем продуцирования каждого антитела отдельно в продуцирующей системе, как указано выше, и последующего смешивания антител, или путем продуцирования нескольких антител в одной продуцирующей системе.

Используемый в данном документе термин «иммуноглобулиновая тяжелая цепь» или «тяжелая цепь иммуноглобулина» предназначен для обозначения одной из тяжелых цепей иммуноглобулина. Тяжелая цепь обычно состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно VH) и константной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в данном документе CH), которая определяет изотип иммуноглобулина. Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Термин «иммуноглобулин», используемый в данном документе, предназначен для обозначения класса структурно связанных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, все четыре потенциально связаны дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо изучена (см., например, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). В структуре иммуноглобулина две тяжелые цепи связаны между собой дисульфидными связями в так называемой «шарнирной области». Как и тяжелые цепи, каждая легкая цепь обычно состоит из нескольких областей; вариабельный участок легкой цепи (сокращенно VL) и константный участок легкой цепи. Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена, CL. Кроме того, области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или в форме структурно определенных петель), также называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), с вкраплениями более консервативных областей, которые называются каркасными областями (FR). Каждая VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Последовательности CDR определены согласно IMGT (см. Lefranc MP. et al., *Nucleic Acids Research*, 27, 209-212, 1999] и Brochet X. *Nucl. Acids Res.* 36, W503-508 (2008)).

При использовании в данном документе термины «полумолекула», «Fab-плечо» и

«плечо» относятся к одной паре тяжелая цепь-легкая цепь. Когда описывается биспецифическое антитело, включающее полумолекулу антитела, «полученную из» первого антитела, и полумолекулу антитела, «полученную из» второго антитела, термин «полученное из» указывает на то, что биспецифическое антитело было получено путем рекомбинации любым известным способом указанных полумолекул каждого из указанных первого и второго антител в полученное биспецифическое антитело. В этом контексте «рекомбинация» не предназначена для ограничения каким-либо конкретным методом рекомбинации и, таким образом, включает все способы получения биспецифических антител, описанных в данном документе ниже, включая, например, рекомбинацию путем обмена полумолекулы, а также рекомбинация на уровне нуклеиновых кислот и/или за счет совместной экспрессии двух полумолекул в одних и тех же клетках.

Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающая область» или «связывающая область» относится к области антитела, которая способна связываться с антигеном. Антиген может быть любой молекулой, такой как полипептид, например, присутствует на клетке, бактерии или вирусе. Термины «антиген» и «мишень» могут, если не противоречат контексту, использоваться взаимозаменяемо в контексте настоящего изобретения. Термины «антигенсвязывающая область» и «антигенсвязывающий сайт» могут использоваться, если это не противоречит контексту, взаимозаменяемо в контексте настоящего изобретения.

Термин «блокирует связывание» или «блокирует связывание антитела», или «перекрестно блокирует связывание», или «перекрестно блокирует связывание» относится к ситуации, когда одно антитело, связанное со специфическим антигеном, предотвращает связывание второго антитела с тем же самым антигеном и наоборот. В отсутствие другого антитела каждое антитело обладает способностью связываться с антигеном, что определяется по значительному ответу связывания, тогда как одно из антител утратило ответ связывания, когда присутствует другое антитело. Способность одного антитела блокировать связывание другого антитела может быть определена с помощью биослойной интерферометрии в классическом формате сэндвич-анализа для количественного определения связывания эпитопа, например, как описано в Примере 3 в настоящей заявке и у Abdiche et al. (Abdiche YN, Malashock DS, Pinkerton A, Pons J. Exploring blocking assays using Octet, ProteOn, and Biacore biosensors. *Anal Biochem.* 2009; 386(2): 172-180). Вкратце, в сэндвич-анализе для количественного определения связывания эпитопа антитело в растворе проверяют на связывание со своим специфическим антигеном, который сначала захватывается иммобилизованным антителом. В контексте настоящего изобретения одно антитело не блокирует связывание другого антитела, если оно способно «вытеснять»

другое антитело в соответствии с приведенным ниже определением «вытеснения». Термины «блокирует связывание» и «блокирование связывания антитела», «перекрестное блокирование связывания» и «перекрестное блокирование связывания» могут, если не противоречат контексту, использоваться взаимозаменяемо в контексте настоящего изобретения. Предпочтительно способность одного антитела блокировать связывание другого антитела определяется с использованием полноразмерных антител.

Термин «вытеснение» или «способность вытеснять» или «вытеснять» относится к ситуации, когда два антитела нарушают связывание друг друга с антигеном, кинетически изменяя связывание друг друга со своим специфическим антигеном посредством образования временного тримолекулярного комплекса, который быстро разрушается, удерживая одно антитело с антигеном и вытесняя другое. Вытеснение антител определено в Abdiche et al., 2017 (Abdiche YN, Yeung AY, Ni I, Stone D, Miles A, Morishige W, et al. (2017) Antibodies Targeting Closely Adjacent or Minimally Overlapping Epitopes Can Displace One Another. PLoS ONE 12(1): e0169535. doi:10.1371/journal.pone.0169535). Вытеснение антител может быть определено с помощью биослойной интерферометрии с использованием биосенсоров без метки в реальном времени в формате классического сэндвич-анализа, как описано у Abdiche et al. 2017 и в Примере 4 в настоящей заявке. Предпочтительно вытеснение антител определяют с использованием антител в формате IgG.

Используемый в данном документе термин «связывание» относится к связыванию антитела с заранее определенным антигеном или мишенью, обычно с аффинностью связывания, соответствующей KD $1E-6$ М или менее, например, $5E-7$ М или менее, $1E-7$ М или менее, такое как $5E-8$ М или менее, такое как $1E-8$ М или менее, такое как $5E-9$ М или менее, или такое как $1E-9$ М или менее, при определении биослойной интерферометрией с использованием антитела в качестве лиганда и антигена в качестве аналита и связыванию с заданным антигеном с аффинностью, соответствующим KD , которое, по меньшей мере, в десять раз ниже, например, по меньшей мере, в 100 раз ниже, например, по меньшей мере, в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере, в 10 000 раз ниже, например, по меньшей мере, в 100 000 раз ниже, чем его аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от заранее определенного антигена или близкородственного антигена.

Термин « KD » (М), используемый в данном документе, относится к константе равновесия при диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген и получается делением k_d на k_a .

Термин « k_d » (сек-1), используемый в данном документе, относится к константе

скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Это значение также обозначается как значение k_{off} или скорость диссоциации.

Термин «ка» ($M^{-1} \times \text{сек}^{-1}$) в контексте настоящего описания относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Упомянутое значение также называется значением k_{on} или скорость ассоциации.

Используемый в данном документе термин «5T4» относится к белку, названному 5T4, который также называют гликопротеином трофобластов, онкофетальным антигеном 5T4, онкофетальным гликопротеином трофобластов 5T4, TPBG, WAIF1 и M6P1. Это трансмембранный белок 72-80 кДа с ядром, имеющим обширное N-сцепленное гликозилирование. У человека (*Homo sapiens*) белок 5T4 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1 (гликопротеин трофобластов человека: учетный номер Uniprot Q13641). В аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1, аминокислотные остатки 1-31 представляют собой сигнальный пептид, а аминокислотные остатки 32-420 представляют собой зрелый полипептид. У яванского макака (*Macaca fascicularis*) белок 5T4 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2 (учетный номер Uniprot Q4R8Y9). В аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2, аминокислотные остатки 1-34 представляют собой сигнальный пептид, а аминокислотные остатки 35-420 представляют собой зрелый полипептид. У курицы (*Gallus gallus*) белок 5T4 имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 3 (учетный номер Uniprot R4GM46). В последовательности, показанной в SEQ ID NO: 3, аминокислотные остатки 1-27 представляют собой сигнальный пептид, а аминокислотные остатки 28-379 представляют собой зрелый полипептид.

Используемый в данном документе термин «CD3» относится к белку 3 кластера дифференцировки человека, который является частью белкового комплекса корцептора Т-клетки и состоит из четырех различных цепей. CD3 также обнаружен у других видов, и, таким образом, термин «CD3» не ограничивается человеческим CD3, если это не противоречит контексту. У млекопитающих комплекс содержит цепь CD3 γ (гамма) (цепь CD3 γ человека UniProtKB/Swiss-Prot № P09693 или CD3 γ яванского макака UniProtKB/Swiss-Prot № Q95LI7), цепь CD3 δ (дельта) (CD3 δ человека UniProtKB/Swiss-Prot № P04234, или CD3 δ яванского макака UniProtKB/Swiss-Prot № Q95LI8), две цепи CD3 ϵ (эпсилон) (CD3 ϵ человека UniProtKB/Swiss-Prot № P07766; аминокислотные остатки 1-22 представляют собой сигнальный пептид, а аминокислотные остатки 23- 207 представляет собой зрелый полипептид CD3 ϵ , который обозначен в настоящем документе как SEQ ID NO: 4; CD3 ϵ яванского макака UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI5; или CD3 ϵ

макаки-резуса UniProtKB/Swiss-Prot No G7NCB9), а также цепь CD3 ζ (дзета) (CD3 ζ человека UniProtKB/Swiss-Prot № P20963, CD3 ζ яванского макака UniProtKB/Swiss-Prot № Q09TK0). Эти цепи связываются с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (TCR), и генерируют сигнал активации в Т-лимфоцитах. Молекулы TCR и CD3 вместе составляют комплекс TCR.

Термин «связывающая область антитела» относится к области антигена, которая включает эпитоп, с которым связывается антитело. Область связывания антитела может быть определена путем эпитоп-специфической сортировки с использованием биослойной интерферометрии, сканирования аланинов или анализа перетасовкой (с использованием антигенных конструкций, в которых области антигена обмениваются с областями другого вида, и определения, связывается или нет антитело с антигеном). Аминокислоты в области связывания антитела, которые участвуют во взаимодействии с антителом, можно определить с помощью масс-спектрометрии с водород-дейтериевым обменом и кристаллографией антитела, связанного с его антигеном.

Термин «эпитоп» означает антигенную детерминанту, которая специфически связывается с антителом. Эпитопы обычно состоят из поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров или их комбинации, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем что связывание с первым но не последним нарушается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, которые непосредственно участвуют в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются или покрываются антителом, когда оно связывается с антигеном (другими словами, аминокислотный остаток находится внутри или близко к области узнавания специфического антитела).

Термины «моноклональное антитело», «моноклональное Ab», «композиция моноклонального антитела», «mAb» или тому подобное в контексте настоящего описания относятся к композиции молекул антител с одним молекулярным составом. Композиция моноклонального антитела демонстрирует уникальную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Соответственно, термин «человеческое моноклональное антитело» обозначает антитела, демонстрирующие уникальную специфичность связывания, и которые содержат переменные и константные области, выделенные из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. Человеческие моноклональные антитела могут продуцироваться гибридомой, которая

включает В-клетку, полученную от трансгенного или трансхромосомного животного, отличного от человека, такого как трансгенная мышь, имеющего геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой. Моноклональные антитела также могут быть получены из рекомбинантно модифицированных клеток-хозяев или систем, в которых используются клеточные экстракты, поддерживающие транскрипцию и/или трансляцию последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих антитело, *in vitro*.

Термин «изотип», используемый в данном документе, относится к классу иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM) или любым его аллотипам, таким как IgG1m (za) и IgG1m (f) который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Кроме того, каждый изотип тяжелой цепи можно комбинировать с легкой цепью каппа (κ) или лямбда (λ).

Термин «полноразмерное антитело» при использовании в данном документе относится к антителу (например, родительскому или вариантному антителу), содержащему одну или две пары тяжелых и легких цепей, каждая из которых содержит все константные и переменные домены тяжелой и легкой цепей, которые обычно обнаруживаются в паре тяжелая цепь-легкая цепь антитела дикого типа этого изотипа. В полноразмерном вариантном антителе константные и переменные домены тяжелой и легкой цепей могут, в частности, включать аминокислотные замены, которые улучшают функциональные свойства антитела по сравнению с полноразмерным родительским антителом или антителом дикого типа. Полноразмерное антитело по настоящему изобретению может быть получено способом, включающим стадии (i) клонирования последовательностей CDR в подходящий вектор, содержащий полные последовательности тяжелой цепи и полную последовательность легкой цепи, и (ii) экспрессию полных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи в подходящих системах экспрессии. Специалист в данной области знает, как получить полноразмерное антитело, начиная либо с последовательностей CDR, либо с последовательностей полной переменной области. Таким образом, квалифицированный специалист должен знать, как получить полноразмерное антитело согласно настоящему изобретению.

Термин «человеческое антитело» в контексте настоящего описания предназначен для включения антител, имеющих переменные и каркасные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека и константного домена иммуноглобулина человека. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими зародышевыми последовательностями иммуноглобулинов (например, мутации, вставки или делеции,

введенные неспецифическим или сайтспецифическим мутагенезом *in vitro* или соматическими мутациями *in vivo*). Однако используемый в данном документе термин «человеческое антитело» не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида, не относящегося к человеку, такого как мышь, были привиты в каркасные последовательности человека.

Используемый в данном документе термин «гуманизированное антитело» относится к генно-инженерному нечеловеческому антителу, которое включает константные домены человеческого антитела и нечеловеческие переменные домены, модифицированные для обеспечения высокого уровня гомологии последовательности с переменными доменами человека. Это может быть достигнуто путем прививки шести областей, определяющих комплементарность (CDR) нечеловеческих антител, которые вместе образуют сайт связывания антигена, в гомологичную человеческую акцепторную каркасную область (FR) (см. WO92/22653 и EP0629240). Чтобы полностью восстановить аффинность связывания и специфичность родительского антитела, может потребоваться замена каркасных остатков родительского антитела (то есть нечеловеческого антитела) в человеческих каркасных областях (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые важны для связывающих свойств антитела. Таким образом, гуманизированное антитело может содержать нечеловеческие CDR-последовательности, в первую очередь человеческие каркасные области, необязательно содержащие одну или несколько обратных мутаций аминокислот в нечеловеческой аминокислотной последовательности, и полностью человеческие константные области. Необязательно, дополнительные модификации аминокислот, которые не обязательно являются обратными мутациями, могут быть применены для получения гуманизированного антитела с предпочтительными характеристиками, такими как аффинность и биохимические свойства.

Термин «область Fc» в контексте настоящего описания относится к области, содержащей в направлении от N- к C-концевому концу антитела, по меньшей мере, шарнирную область, область CH2 и область CH3. Область Fc антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента.

Используемый в данном документе термин «шарнирная область» относится к шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например,

шарнирная область человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 216-230 в соответствии с нумерацией EU, как указано в Kabat Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689 (1991). Однако шарнирная область также может относиться к любому из других подтипов, описанных в данном документе.

Термин «область CH1» или «домен CH1» в контексте настоящего описания относится к области CH1 тяжелой цепи иммуноглобулина. Таким образом, например, область CH1 антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 118-215 согласно нумерации EU, как указано в Kabat (там же). Однако область CH1 также может относиться к любому из других подтипов, как описано в данном документе.

Термин «область CH2» или «домен CH2» в контексте настоящего описания относится к области CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, участок CH2 антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 231-340 согласно нумерации EU, как указано в Kabat (там же). Однако область CH2 также может представлять собой любую из других подтипов, как описано в данном документе.

Термин «область CH3» или «домен CH3» в контексте настоящего описания относится к области CH3 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, участок CH3 человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 341-447 согласно нумерации EU, как указано в Kabat (там же). Однако CH3-область также может представлять собой любую из других подтипов, как описано в данном документе.

Термин «Fc-опосредованные эффекторные функции» в контексте настоящего описания предназначен для обозначения функций, которые являются следствием связывания полипептида или антитела с его мишенью или антигеном на клеточной мембране, где Fc-опосредованная эффекторная функция связана с Fc-областью полипептида или антитела. Примеры Fc-опосредованных эффекторных функций включают (i) связывание C1q, (ii) активацию комплемента, (iii) комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), (iv) антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), (v) связывание с Fc-гамма-рецептором (FcγR), (vi) антителозависимое, FcγR-опосредованное перекрестное связывание антигена, (vii) антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), (viii) комплемент-зависимая клеточная цитотоксичность (CDCC), (ix) комплемент- усиленная цитотоксичность, (x) связывание с рецептором комплемента опсонизированного антитела, опосредованное антителом, (xi) опсонизация и (xii) комбинация любого из (i) - (xi).

Термины «инертность», «инертный» или «неактивирующий» в контексте настоящего описания относятся к области Fc, которая, по меньшей мере, не способна

связывать какой-либо Fc γ R, индуцировать опосредованное Fc перекрестное связывание Fc γ R или индуцировать опосредованное Fc γ R перекрестное связывание антиген-мишеней через две области Fc отдельных антител или неспособна связывать C1q. Инертность области Fc антитела можно тестировать с использованием антитела в моноспецифическом или биспецифическом формате.

Термин «полноразмерный» при использовании в контексте антитела указывает на то, что антитело не является фрагментом, а содержит все домены конкретного изотипа, обычно встречающиеся для этого изотипа в природе, например, домены VH, CH1, CH2, CH3, шарнира, VL и CL для антитела IgG1.

Термин «моновалентное антитело» в контексте настоящего изобретения относится к молекуле антитела, которая может взаимодействовать со специфическим эпитопом на антигене, только с одним антигенсвязывающим доменом (например, одним плечом Fab). В контексте биспецифического антитела «связывание моновалентного антитела» относится к связыванию биспецифического антитела с одним специфическим эпитопом на антигене только с одним антигенсвязывающим доменом (например, одним плечом Fab).

Термин «моноспецифическое антитело» в контексте настоящего изобретения относится к антителу, которое обладает специфичностью связывания только с одним эпитопом. Антитело может быть моноспецифическим моновалентным антителом (т.е. несущим только одну антигенсвязывающую область) или моноспецифическим двухвалентным антителом (т.е. антителом с двумя идентичными антигенсвязывающими областями).

Термин «биспецифическое антитело» относится к антителу, имеющему два неидентичных антигенсвязывающих домена, например, два неидентичных Fab-плеча или два Fab-плеча с неидентичными областями CDR. В контексте этого изобретения биспецифические антитела обладают специфичностью, по меньшей мере, к двум различным эпитопам. Такие эпитопы могут находиться на одном или разных антигенах или мишенях. Если эпитопы находятся на разных антигенах, такие антигены могут находиться на одной и той же клетке или в разных клетках, типах клеток или структурах, таких как внеклеточный матрикс или везикулы и растворимый белок. Таким образом, биспецифическое антитело может быть способным к перекрестному связыванию нескольких антигенов, например, двух разных клеток.

Термин «двухвалентное антитело» относится к антителу, которое имеет две антигенсвязывающие области, которые связываются с эпитопами на одной или двух мишенях или антигенах или связываются с одним или двумя эпитопами на одном и том же антигене. Следовательно, бивалентное антитело может быть моноспецифическим

бивалентным антителом или биспецифическим бивалентным антителом.

Термины «аминокислота» и «аминокислотный остаток» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо, и их не следует понимать как ограничивающие. Аминокислоты - это органические соединения, содержащие функциональные аминогруппы ($-NH_2$) и карбоксильные ($-COOH$), а также боковую цепь (группа R), специфичную для каждой аминокислоты. В контексте настоящего изобретения аминокислоты можно классифицировать на основе структуры и химических характеристик. Таким образом, классы аминокислот могут быть отражены в одной или обеих следующих таблицах:

Основная классификация, основанная на структуре и общей химической характеристике группы R.

Класс	Аминокислота
Кислые остатки	D и E
Основные остатки	K, R, и H
Гидрофильные незаряженные остатки	S, T, N, и Q
Алифатические незаряженные остатки	G, A, V, L, и I
Неполярные незаряженные остатки	C, M, и P
Ароматические остатки	F, Y, и W

Альтернативные Физически и Функциональные Классификации Аминокислотных Остатков

Класс	Аминокислота
Остатки, содержащие гидроксильные остатки	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Циклоалкенил-ассоциированные 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 and E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Малые остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V
Самые малые остатки	A, G и S
Остатки, участвующие в формировании поворота	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, P, D, E и R

Замена одной аминокислоты на другую может быть классифицирована как

консервативная или неконсервативная замена. В контексте изобретения «консервативная замена» представляет собой замену одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей аналогичные структурные и/или химические характеристики, т.е. замену одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток того же класса, как определено в любой из двух приведенных выше таблиц: например, лейцин может быть заменен изолейцином, поскольку оба они являются алифатическими разветвленными гидрофобами. Точно так же аспарагиновая кислота может быть заменена глутаминовой кислотой, поскольку они обе представляют собой небольшие отрицательно заряженные остатки.

В контексте настоящего изобретения замена в антителе обозначается как:

Исходная аминокислота – положение – замененная аминокислота;

Ссылаясь на хорошо известную номенклатуру аминокислот, используется трехбуквенный или однобуквенный код, включая коды «Хаа» или «Х» для обозначения любого аминокислотного остатка. Таким образом, Хаа или Х обычно могут представлять любую из 20 встречающихся в природе аминокислот. Используемый в данном документе термин «встречающийся в природе» относится к любому из следующих аминокислотных остатков, которыми являются: глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, лизин, аргинин, гистидин, аспарагиновая кислота, аспарагин, глутаминовая кислота, глутамин, пролин, триптофан, фенилаланин, тирозин, метионин и цистеин. Соответственно, обозначение «K409R» или «Lys409Arg» означает, что антитело содержит замену лизина на аргинин в положении аминокислоты 409.

Замена аминокислоты в данном положении на любую другую аминокислоту обозначается следующим образом:

Исходная аминокислота - положение; или например, «K409»

Для модификации, в которой исходная аминокислота(ы) и/или замещенная(ые) аминокислота(ы) могут содержать более одной, но не все аминокислоты, более чем одна аминокислота может быть разделена знаком «,» или «/». Например, замена лизина на аргинин, аланин или фенилаланин в положении 409:

«Lys409Arg,Ala,Phe» или «Lys409Arg/Ala/Phe», или «K409R,A,F», или «K409R/A/F», или «K409 R, A или F».

Такое обозначение может использоваться взаимозаменяемо в контексте изобретения, но имеет то же значение и цель.

Кроме того, термин «замена» охватывает замену любой одной или других девятнадцати природных аминокислот или других аминокислот, таких как неприродные аминокислоты. Например, замена аминокислоты К в положении 409 включает каждую из

следующих замен: 409A, 409C, 409D, 409E, 409F, 409G, 409H, 409I, 409L, 409M, 409N, 409Q, 409R, 409S, 409T, 409V., 409W, 409P и 409Y. В частности это эквивалентно обозначению 409X, где X обозначает любую аминокислоту, отличную от исходной аминокислоты. Эти замены могут также обозначаться K409A, K409C и т.д. или K409A,C и т.д. или K409A/C/ и т.д. То же самое применимо по аналогии к каждому положению, упомянутому в данном документе, для конкретного включения в него любой из таких замен.

Антитело согласно изобретению может также включать делецию аминокислотного остатка. Такое удаление может быть обозначено «del» и включает, например, запись как K409del. Таким образом, в таких воплощениях лизин в положении 409 удален из аминокислотной последовательности.

Термин «клетка-хозяин» в контексте настоящего описания предназначен для обозначения клетки, в которую был введен экспрессирующий вектор. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только определенного объекта в виде клетки, но также потомства такой клетки. Так как некоторые изменения могут происходить в последующих поколениях либо из-за мутации, либо влияния окружающей среды, то такое потомство может быть фактически не идентичным родительской клетке, но все еще включаться в объем термина «клетка-хозяин» используемый в данном документе. Рекомбинантные клетки-хозяева включают, например, трансфектомы, такие как клетки CHO, клетки HEK-293, клетки Expi293F, клетки PER.C6, клетки NS0 и лимфоцитарные клетки, а также прокариотические клетки, такие как E.coli, и другие эукариотические клетки-хозяева, такие как клетки растений и грибов.

Термин «трансфектома», используемый в данном документе, включает рекомбинантные эукариотические клетки-хозяева, экспрессирующие антитело или антиген-мишень, такие как клетки CHO, клетки PER.C6, клетки NS0, клетки HEK-293, клетки Expi293F, клетки растений или грибов, включая дрожжевые клетки.

Для целей настоящего изобретения идентичность последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями определяется с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) осуществляемого в программе Needle 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 новее. Используемые параметры: штраф за открытие разрыва 10, штраф за расширение разрыва 0,5, и матрица замещения EBLOSUM62 (EMBOSS версия BLOSUM62). Результат Needle, помеченный как «самая длинная идентичность» (полученный с использованием опции -nobrief), используется как процент идентичности и

рассчитывается следующим образом:

$(\text{Идентичные остатки} \times 100) / (\text{Длина выравнивания} - \text{общее количество разрывов в выравнивании})$.

Удержание подобных остатков также или альтернативно может быть измерено с помощью показателя сходства, определяемого с помощью программы BLAST (например, BLAST 2.2.8, доступный через NCBI с использованием стандартных настроек BLOSUM62, штраф за открытие разрыва = 11 и штраф за продление разрыва = 1) . Подходящие варианты обычно включают, по меньшей мере, около 45%, например, по меньшей мере, около 55%, по меньшей мере, около 65%, по меньшей мере, около 75%, по меньшей мере, около 85%, по меньшей мере, около 90%, по меньшей мере, около 95% или более (например, около 99%) сходство с родительской последовательностью.

Термин «интернализированный» или «интернализация» в контексте настоящего описания относится к биологическому процессу, в котором молекулы, такие как антитело согласно настоящему изобретению, захватываются клеточной мембраной и втягиваются внутрь клетки. Интернализация также может быть обозначена как «эндоцитоз».

Антитела

В первом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, содержащему, по меньшей мере, одну антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4 (гликопротеином трофобластов), причем указанное антитело способно блокировать связывание с 5T4 антитела, выбранного из группы, состоящей из:

a) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9 [059],

b) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16 [076],

c) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23 [085],

d) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30 [106],

e) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 37 [127],

f) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44 [207]; и

g) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51 [226].

В частности, в изобретении предлагается антитело, включающее, по меньшей мере, одну антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4 (гликопротеином трофобластов), где антитело способно блокировать связывание с 5T4 антитела, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанная в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи (VL), содержащая последовательность, указанной в SEQ ID NO: 9 [059].

В частности, антитело может блокировать связывание с 5T4 антитела, выбранного из группы, состоящей из:

a) антитела, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44 [207],

b) антитела, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51 [226]; и

антитела, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9 [059].

В конкретных воплощениях изобретения антитело способно блокировать связывание с 5T4 антитела, выбранного из группы, состоящей из:

a) антитела, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44 [207]; и

b) антитела, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51 [226]

Антитела согласно изобретению характеризуются тем, что обладают специфичностью или способностью связывать 5T4 человека (*Homo sapiens*). Следовательно, 5T4, как в данном документе упоминается, может, в частности, быть 5T4 человека, таким как зрелый полипептид SEQ ID NO: 1.

В дополнительных воплощениях антитела по изобретению характеризуются тем, что обладают специфичностью или способностью связываться с 5Т4 яванского макака (*Macaca fascicularis*), например, специфичностью или способностью связываться с 5Т4 человека, так и яванского макака. 5Т4 яванского макака может, в частности, быть зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2.

В других воплощениях антитела согласно изобретению обладают специфичностью или способностью связываться с 5Т4 курицы (*Gallus gallus*), например, специфичностью или способностью связываться с 5Т4 человека и 5Т4 курицы, или такой как специфичность или способность связываться с 5Т4 человека, яванского макака и курицы, причем 5Т4 курицы, в частности, может иметь аминокислотную последовательность зрелого полипептида SEQ ID NO: 3.

Соответственно, антитела по изобретению могут обладать специфичностью или быть способными связываться с 5Т4 человека, таким как зрелый полипептид SEQ ID NO: 1, и 5Т4 яванского макака, например, зрелый полипептид SEQ ID NO: 2.

Кроме того, антитела согласно изобретению могут обладать специфичностью или быть способными связываться с 5Т4 человека, таким как зрелый полипептид SEQ ID NO: 1, 5Т4 яванской макаки, такой как зрелый полипептид SEQ ID NO: 2 и 5Т4 курицы, такой как зрелый полипептид SEQ ID NO: 3.

Антитела по настоящему изобретению могут быть способны связывать 5Т4 человека, яванского макака и/или 5Т4 курицы с аффинностью связывания, которая соответствует значению KD $1E-7$ М или меньше, например, значению KD около $1E-7$ М или меньше, $5E-8$ М или меньше, около $5E-8$ М или меньше, $1E-8$ М или меньше, около $1E-8$ М или меньше, $5E-9$ М или меньше, около $5E-9$ М или меньше, например, как $1E-9$ М или меньше, или например, около $1E-9$ М или меньше, например, с аффинностью связывания, соответствующим значению KD , которое находится в диапазоне от $1E-7$ до $5E-10$ М, например, в диапазоне от около $1E-7$ до около $5E-10$ М, например, от $1E-7$ до $1E-9$ М, например, от около $1E-7$ до около $1E-9$ М, например, от $5E-8$ до $5E-10$ М, например, около $5E-8$ до около $5E-10$ М, например, от $5E-8$ до $1E-9$ М, например, от около $5E-8$ до около $1E-9$ М, например, от $1E-8$ до $5E-10$ М, например, около $1E-8$ до около $5E-10$ М, например, от $1E-8$ до $1E-9$ М, например, от около $1E-8$ до около $1E-9$ М, например, от $1E-8$ до $5E-9$ М или такого как от около $1E-8$ до около $5E-9$ М.

Хотя специалист в данной области может определить аффинность антитела к связыванию с его мишенью, аффинность связывания антител согласно изобретению с 5Т4 может быть, в частности, определена с помощью биослойной интерферометрии, необязательно, как указано в примере 2 в данном документе.

Более конкретно, аффинность связывания антитела согласно изобретению может быть определена с использованием процедуры, такой как процедура биослойной интерферометрии, включающая стадии:

I) Иммобилизации антитела в количестве 1 мкг/мл в течение 600 секунд на биосенсоре, основанном на принципе захвата антителами к Fc-фрагменту IgG человека;

II) Определения ассоциации в течение периода времени 200 секунд и диссоциации в течение периода времени 1000 секунд 5T4ECDHis (зрелый белок SEQ ID NO: 99) или 5T4 яванского макака (зрелый белок SEQ ID NO: 2 или рекомбинантный белок 5T4 яванского макака (Cusabio; кат. № CSB-MP024093MOV), используя серии 2-кратных разведений в диапазоне от 100 нМ до 1,56 нМ.

III) Сравнение проводили с данными, полученными в контрольном буфере (0 нМ).

Аффинность связывания антитела согласно изобретению может, в частности, быть определена с использованием антитела, как определено в любом из предшествующих пп., которое представляет собой моноспецифическое двухвалентное антитело, такое как антитело, которое представляет собой полноразмерный IgG1.

В дополнительных воплощениях изобретения антитело распознает или связывается с эпитопом, или областью связывания антитела, или участком связывания на 5T4, указанный сайт связывания, или эпитоп, или область связывания антитела распознается любым одним из антител, выбранных из группы, состоящей из:

a) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9 [059],

b) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16 [076],

c) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23 [085],

d) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30 [106],

e) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 37 [127],

f) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44 [207]; и

g) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51 [226].

В других воплощениях антитело согласно изобретению распознает или связывается с областью связывания антитела, участком связывания или эпитопом на 5T4, который не является областью связывания антитела, участком связывания или эпитопом, связанным с антителом или отличным от него связывающим участком, связывающий сайт или эпитоп, связанный с антителом, выбранным из группы, состоящей из:

a) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 87, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 88 [H8],

b) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 83, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 84 [A1]; и

c) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 85, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 86 [A3].

В других воплощениях связывание антитела согласно изобретению с 5T4 блокируется связыванием с 5T4 антитела, включающего вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 85, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 86 [A3]. Антитело, включающее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 85 и 86, соответственно, представляет собой антитело A3, одно из трех мышинных антител к 5T4, раскрытых в WO2007106744. Изменение формулировки: антитело A3 с одиночной аминокислотной заменой. В последовательностях CDR?

В других воплощениях антитело по изобретению демонстрирует вытеснение антитела, связанного с 5T4 или с His-меченным внеклеточным доменом 5T4 (например, 5T4ECDHis/зрелый белок SEQ ID NO: 99), указанное антитело, связанное с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащая последовательность, указанную в SEQ ID NO: 85, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 86 [A3]. Такое поведение вытеснения указывает на то, что антитело по изобретению связывается с эпитопом, который

отличается от эпитопа, связанного антителом АЗ, но может примыкать к эпитопу, связанному с АЗ, или даже перекрываться с ним.

«Вытеснение» или способность вытеснять связанное антитело может быть определено в анализе биослойной интерферометрии, например, в анализе, проводимом, как описано в Примере 4 настоящей заявки.

«Перекрестное блокирование» или способность антитела, как определено в соответствии с изобретением, блокировать связывание другого антитела с 5Т4, может быть определена с использованием анализа сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS), например, в анализе, проводимом как описано в Примере 5.

В частности, «перекрестное блокирование» или способность антитела согласно изобретению блокировать связывание другого антитела с 5Т4 определяется как способность неконъюгированного антитела блокировать связывание конъюгированного антитела и необязательно определяется в процедура, состоящая из следующих стадий:

i) Предоставления набора образцов, где каждый образец включает смесь клеток аденокарциномы яичника человека SK-OV-3, антитело, которое связывается с 5Т4 и конъюгировано с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), и избыток неконъюгированного антитела, нацеленного на 5Т4,

ii) Инкубирования образцов в течение 30 минут при 4 °С, а затем центрифугирования образцов,

iii) Удаления надосадочной жидкости из каждого образца и ресуспендирование клеток в буфере и определение средней интенсивности флуоресценции (MFI) FITC с использованием проточного цитометра; и

iv) Расчет легко можно сделать следующим образом:

Разница в MFI между клетками, инкубированными со смесью FITC-конъюгированных антител и неконъюгированных антител, и клетками, инкубированными без FITC-конъюгированных или неконъюгированных антител, умноженная на 100 и затем разделенная на разницу в MFI между клетками, инкубированными со смесью FITC-конъюгированного антитела и антитела IgG-b12 и клетками, инкубированными без FITC-конъюгированных или неконъюгированных антител.

Хотя специалист в данной области знаком с подходящими технологиями для определения способности антитела блокировать связывание другого антитела с его мишенью или вытеснять другое антитело, связанное с его мишенью, в настоящей заявке раскрываются процедуры, подходящие для определения блокирования связывания и вытеснения. Следовательно, в некоторых воплощениях способность антитела согласно изобретению блокировать связывание другого антитела с 5Т4 или вытеснять другое

антитело, связанное с 5T4, может быть определена с помощью биослойной интерферометрии, такой как биослойная интерферометрия, выполняемая, как описано в Примере 3.

В частности, способность антитела согласно изобретению блокировать связывание другого антитела с 5T4 или вытеснять другое антитело, связанное с 5T4, определяется с помощью биослойной интерферометрии, может быть определена с помощью процедуры, включающей стадии:

i) Иммобилизации антитела согласно изобретению в количестве 20 мкг/мл в 10 mM натрий-ацетатном буфере на активированном аминореактивном биосенсоре 2-го поколения,

ii) Гашения биосенсора иммобилизованным антителом в этанолаmine pH 8,5,

iii) Погружения биосенсора с иммобилизованным антителом в композицию, содержащую 3,6 мкг/мл (100 nM) человеческого 5T4ECDHis (зрелый белок SEQ ID NO: 99), на период времени 500 секунд, и затем

iv) Погружения биосенсора с иммобилизованным антителом и 5T4ECDHis в композицию, содержащую 10 мкг/мл другого антитела, нацеленного на 5T4, и определение ответа ассоциации в течение периода времени 500 секунд;

при этом стадии i) -iv) выполняются при температуре 30 °C и встряхивании со скоростью 1000 об/мин.

Предоставленные в данном документе антитела могут связываться с эпитопом или связывающей областью антитела на человеческом 5T4, содержащей аминокислотные остатки R73, Y92 и R94; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

В настоящем документе также представлены антитела, которые связываются с эпитопом или связывающей областью антитела на человеческом 5T4, содержащей аминокислотные остатки S69, R73, Y92 и R94; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

Кроме того, в настоящем документе представлены антитела, которые связываются с эпитопом или связывающей областью антитела на человеческом 5T4, содержащей аминокислотные остатки R73, T74, Y92, R94 и N95; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

На основании результатов, представленных в Примере 16 в данном документе, без какого-либо желания связывать себя теорией, предполагаем, что любой один или несколько из этих аминокислотных остатков (т.е. S69, R73, T74, Y92, R94 и N95) непосредственно участвуют в связывании антитела, например, посредством

нековалентных взаимодействий; например, с аминокислотными остатками в последовательностях CDR антитела. Гипотеза подтверждается тем фактом, что эти остатки были идентифицированы как экспонированные на поверхности структуры 5T4 (4 нм; предоставлено в RCSB PDB Protein Data Bank; DOI: 10.2210/pdb4CNM/pdb), опубликовано в Zhao, Y., Malinauskas, T., Harlos, K., & Jones, E. Y. (2014). Structural insights into the inhibition of Wnt signaling by cancer antigen 5T4/Wnt-activated inhibitory factor 1. *Structure*, 22(4), 612–620.

Один или несколько из следующих дополнительных аминокислотных остатков могут участвовать в связывании антитела, например, косвенно участвовать в связывании, например, воздействуя на сворачивание белка и/или позиционируя один или несколько аминокислотных остатков, непосредственно участвующих в связывании антитела: L89, F111, L117, F138, L144, D148, N152; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1. В частности, L89, F111, L117, F138, L144 были идентифицированы как часть гидрофобного ядра в 5T4, как описано Zhao et al., *Structure*, 22 (4), 612-620.

Кроме того, описанное в данном документе антитело может быть связано с эпитопом или областью связывания антитела на человеческом 5T4, в котором аминокислотные остатки R73, Y92 и R94 непосредственно участвуют в связывании антитела, и где один или несколько аминокислотных остатков F111, F138, L144 и D148 косвенно участвуют в указанном связывании; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

Представленное в данном документе антитело может связываться с эпитопом или связывающей областью антитела на человеческом 5T4, в котором аминокислотные остатки S69, R73, Y92 и R94 непосредственно участвуют в связывании антитела, и где один или несколько аминокислотных остатков F111, F138 и D148 косвенно участвуют в указанном связывании; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

Кроме того, в настоящем раскрытии представлены антитела, которые связываются с эпитопом или связывающей областью антитела на человеческом 5T4, в котором аминокислотные остатки R73, T74, Y92, R94 и N95 непосредственно участвуют в связывании антитела, и где аминокислотный остаток F138 участвует косвенно в указанном связывании; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

Аминокислотные остатки, содержащиеся в указанном эпитопе или связывающей области антитела, и, необязательно, один или несколько дополнительных

аминокислотных остатков, которые косвенно участвуют в связывании, могут быть идентифицированы путем аланинового сканирования человеческого 5T4, имеющего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1 или последовательность зрелого полипептида SEQ ID NO: 1, или путем аланинового сканирования полипептида, содержащего аминокислотные остатки 32-355 SEQ ID NO: 1.

Аланиновое сканирование может, в частности, выполняться, как изложено или по существу, как изложено в Примере 16 в данном документе.

Кроме того, аланиновое сканирование может быть выполнено с помощью процедуры, состоящей из следующих стадий:

i) экспрессии мутантных полипептидов 5T4 человека, в которых все аминокислотные остатки во внеклеточном домене 5T4 человека (соответствующие аминокислотным остаткам 32-355 SEQ ID NO: 1), за исключением цистеинов и аланинов, индивидуально замещены аланином, и полипептидов 5T4 дикого типа (аминокислотные остатки 32-355 SEQ ID NO: 1) индивидуально в клетках эмбриональной почки человека, например, клетках HEK 293, так что для каждого мутанта или 5T4 дикого типа предоставляется образец, содержащий 70-90 000 клеток, например, 80 000 клеток,

ii) инкубации клеток в каждом образце с 20 мкл указанного антитела, конъюгированного с антителом, конъюгированным с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (3 мкг/мл; в буфере FACS) в течение 40 минут при комнатной температуре, а затем промывание каждого образца дважды в 150-180 мкл буфера для FACS (фосфатно-солевой буферный раствор [PBS; Lonza, кат. № BE17-517] + 0,1% [масс./об.] BSA [Roche, кат. № 10735086001] + 0,02% [масс./об.] азида натрия [NaN₃; EMELCA Bioscience, кат. № 41920044-3]) и ресуспендирования клеток в каждом образце в 30 мкл буфера FACS,

iii) Определения для каждого образца среднего количества связанного антитела на клетку, как среднего геометрического интенсивности флуоресценции (gMFI) для жизнеспособной популяции единичных клеток в указанном образце и нормализации данных для каждого тестируемого антитела против интенсивности связывания неперекрестно-блокирующего 5T4-специфического контрольного антитела с использованием уравнения:

$$\text{нормализованное } gMFI_{\text{положение aa}} = \log_{10} \left(\frac{gMFI_{\text{тестовое Ab}}}{gMFI_{\text{контрольное Ab}}} \right)$$

где «положение aa» относится к положению, в котором произошла мутация на аланин,

где Z-балл рассчитывается для выражения потери или усиления связывания антитела в соответствии с расчетом:

$$Z - \text{балл (кратное изменение)} = \frac{\text{нормализованное } gMFI_{\text{положительные АК}} - \mu}{\sigma}$$

где μ и σ - среднее и стандартное отклонение, соответственно, нормализованного gMFI, рассчитанного для всех мутантов,

где данные исключаются из анализа, если gMFI контрольного антитела для конкретного мутанта 5T4 ниже, чем среднее gMFI Control Ab - 2,5 x SD среднего gMFI Control Ab (от всех мутантов); и необязательно

где данные исключаются из анализа, если остаток связывается с Z-баллом чуть ниже -1,5 (например, между -1,5 и -1,8, например, между -1,5 и -1,7 или например, между -1,5 и -1,6) и прогнозируется, что этот остаток будет погружен и пространственно отделен от большинства остатков, которые, как предполагается, будут экспонироваться на поверхности и для которых определяется потеря связывания или снижение связывания.

Подходящее перекрестное блокирующее 5T4-специфическое контрольное антитело для применения на стадии iii) представляет собой биспецифическое антитело, включающее

- антигенсвязывающую область, которая содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 83, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 84 [A1];

и

- антигенсвязывающую область, которая содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 97, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 98 [B12].

Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с 5T4, так что происходит потеря связывания или связывание снижается, если любой один или несколько аминокислотных остатков R73, Y92 и R94 заменен/заменены аланином; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

В частности, антитела могут связываться с 5T4, так что происходит потеря связывания или связывание снижается, если любой один или несколько аминокислотных остатков S69, R73, Y92 и R94 заменен/заменены аланином; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

Кроме того, антитела могут связываться с 5T4, так что происходит потеря связывания или связывание снижается, если один или несколько аминокислотных остатков R73, T74, Y92, R94 и N95 заменен/заменены аланином; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

Кроме того, описанные в данном документе антитела могут связываться с 5T4, так

что происходит потеря связывания или связывание снижается, если любой один или несколько аминокислотных остатков: L89, F111, L117, F138, L144, D148, N152 заменен/заменены аланином; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

Кроме того, антитела могут связываться с 5T4, так что происходит потеря связывания или связывание снижается, если один или несколько аминокислотных остатков R73, Y92, R94, F111, F138, L144 и D148 заменен/заменены аланином; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

Антитела могут связываться с 5T4, так что происходит потеря связывания или связывание снижается, если какой-либо один или несколько аминокислотных остатков S69, R73, Y92, R94, F111, F138 и D148 заменены/заменяются аланином; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

В других воплощениях антитела по изобретению могут связываться с 5T4 таким образом, что происходит потеря связывания или связывание уменьшается, если любой один или несколько аминокислотных остатков R73, T74, Y92, R94, N95 и F138 заменены/заменены на аланин; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

Эффект любой из замен аланина, представленных выше, можно определить с помощью аланинового сканирования полипептида, содержащего аминокислотные остатки 32-355 SEQ ID NO: 1.

В частности, эффект замен аланина может быть определен с помощью процедуры, изложенной или, по существу изложенной в Примере 16 в данном документе.

Потеря связывания может быть определена как Z-балл связывания ниже 1,5; Z-балл, необязательно, рассчитывается, как изложено или по существу как указано в Примере 16 в данном документе.

Эффект любой из замен аланина можно определить с помощью процедуры, включающей следующие стадии:

i) экспрессии мутантных полипептидов 5T4 человека, в которых все аминокислотные остатки во внеклеточном домене 5T4 человека (соответствующие аминокислотным остаткам 32-355 SEQ ID NO: 1), за исключением цистеинов и аланинов, индивидуально замещены аланином, и полипептидов 5T4 дикого типа индивидуально в эмбриональных клетках почки человека, например, клетках НЕК 293, так что для каждого мутанта или 5T4 дикого типа предоставляется образец, содержащий 70-90 000 клеток,

например, 80 000 клеток,

ii) инкубации клеток в каждом образце с 20 мкл указанного антитела, конъюгированного с антителом, конъюгированным с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (3 мкг/мл; в буфере FACS) в течение 40 минут при комнатной температуре, а затем промывание каждого образца дважды в 150-180 мкл буфера для FACS (фосфатно-солевой буферный раствор [PBS; Lonza, кат. № BE17-517] + 0,1% [масс./об.] BSA [Roche, кат. № 10735086001] + 0,02% [масс./об.] азида натрия [NaN₃; EMELCA Bioscience, кат. № 41920044-3]) и ресуспендирования клеток в каждом образце в 30 мкл буфера FACS,

iii) Определения для каждого образца среднего количества связанного антитела на клетку, как среднего геометрического интенсивности флуоресценции (gMFI) для жизнеспособной популяции единичных клеток в указанном образце и нормализации данных для каждого тестируемого антитела против интенсивности связывания перекрестно-блокирующего 5T4-специфического контрольного антитела с использованием уравнения:

$$\text{нормализованное } gMFI_{\text{положение } a_k} = \log_{10} \left(\frac{gMFI_{\text{тестовое Ab}}}{gMFI_{\text{контрольное Ab}}} \right)$$

где «положение aa» относится к положению, в котором произошла мутация на аланин,

где Z-балл рассчитывается для выражения потери или усиления связывания антитела в соответствии с расчетом:

$$Z \text{ балл (кратное изменение)} = \frac{\text{нормализованное } gMFI_{\text{положение } a_k} - \mu}{\sigma}$$

где μ и σ - среднее и стандартное отклонение, соответственно, нормализованного gMFI, рассчитанного для всех мутантов,

где данные исключаются из анализа, если gMFI контрольного антитела для конкретного мутанта 5T4 ниже, чем среднее gMFIControl Ab - 2,5 x SD среднего gMFIControl Ab (от всех мутантов); и необязательно

где данные исключаются из анализа, если остаток связывается с Z-баллом чуть ниже -1,5 (например, между -1,5 и -1,8, например, между -1,5 и -1,7 или например, между -1,5 и -1,6) и прогнозируется, что этот остаток будет погружен и пространственно отделен от большинства остатков, которые, как предполагается, будут экспонироваться на поверхности и для которых определяется потеря связывания или снижение связывания.

Подходящим перекрестным блокирующим 5T4-специфическим контрольным антителом на стадии iii) описанной выше процедуры является биспецифическое антитело, включающее

- антигенсвязывающую область, которая содержит последовательность VH,

указанную в SEQ ID NO: 83, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 84 [A1];
и

- антигенсвязывающую область, которая содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 97, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 98 [B12].

Антитело по изобретению может характеризоваться сниженной способностью к интернализации, что проявляется в снижении цитотоксичности при конъюгировании с цитотоксическим фрагментом по сравнению с аналогичным образом конъюгированным антителом, включающим переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 87 и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 88 [H8]. Антитело, содержащее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 87 и 88, соответственно, может быть мышиным антителом против 5T4 mAb5T4, также называемым антителом H8 (Shaw et al. (2002), Biochem. J. 363: 137-45, WO98/55607). Различные химерные или гуманизированные версии антитела H8 раскрыты в WO06/031653.

Цитотоксичность или интернализация антител 5T4, которые моновалентно связывают 5T4, можно определить с использованием процедуры, изложенной в примере 7 настоящей заявки. В частности, цитотоксичность может быть определена с помощью анализа, включающего следующие стадии:

i) Обеспечения конъюгированного с токсином биспецифического антитела, которое моновалентно связывает 5T4, содержащего первое плечо Fab антитела, как определено в любом из предшествующих пп., и второе плечо Fab, способное связываться с белком gp120 вируса HIV (HIV-1 gp120), где HIV-1 gp120-специфичное Fab-плечо конъюгировано с дуостатином-3,

ii) Инкубации 5T4-положительных клеток рака молочной железы MDA-MB-468 (клон ATCC HTB-132) или HCC1954 (клон ATCC CRL-1338) с указанным биспецифическим антителом, которое моновалентно связывает 5T4, в течение 5 дней при 37°C; и

iii) Определения жизнеспособности клеток.

IgG-b12 - это антитело, специфичное к HIV-1 gp120 (Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5; 230 (3): 812-23). Последовательности переменных областей тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) представлены в SEQ ID NO: 97 и 98, соответственно.

В некоторых воплощениях антитело по изобретению представляет собой антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, состоящей из:

- a) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, 7 и 8 [059],
- b) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 13, 14 и 15 [076],
- c) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 20, 21 и 22 [085],
- d) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 27, 28 и 29 [106],
- e) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 34, 35 и 36 [127],
- f) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 41, 42 и 43 [207],
- g) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 48, 49 и 50 [226]; и
- h) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 содержат в общей сложности не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или большинство 10 аминокислотных замен по сравнению с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, определенными в любом из пунктов от a) до g).

В других воплощениях антитело согласно изобретению представляет собой антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, состоящей из:

- a) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, 7 и 8 [059],
- b) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 41, 42 и 43 [207];
- c) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 48, 49 и 50 [226]; и
- d) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 содержат в общей сложности не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или большинство 10 аминокислотных замен по сравнению с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, определенными в любом из пунктов от a) до c).

В частности, антитело согласно изобретению может быть антителом, в котором

указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, 7 и 8 [059].

В ином случае антитело по изобретению может быть антителом, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, состоящей из: переменной области тяжелой цепи (VH), содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 41, 42 и 43 [207].

Кроме того, антитело согласно изобретению может быть антителом, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, состоящей из: переменной области тяжелой цепи (VH), содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 48, 49 и 50 [226].

В других воплощениях антитело согласно изобретению представляет собой антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), выбранные из группы, включающей:

а) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 10, AAS и SEQ ID NO: 11, соответственно [059],

б) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 13, 14 и 15, соответственно; и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 17, DAS и SEQ ID NO: 18, соответственно [076],

с) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 20, 21 и 22, соответственно; и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 24, DAS и SEQ ID NO: 25, соответственно [085],

д) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 27, 28 и 29, соответственно; и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 31, DVS и SEQ ID NO: 32, соответственно [106],

е) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 34, 35 и 36, соответственно; и переменной области

легкой цепи (VL), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 38, DAS и SEQ ID NO: 39, соответственно [127],

f) вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 41, 42 и 43, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 45, DAS и SEQ ID NO: 46, соответственно [207],

g) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно, и область вариабельной области легкой цепи (VL), содержащая последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 52, DAS и SEQ ID NO: 53, соответственно [226]; и

h) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 содержат в общей сложности не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или большинство 10 аминокислотных замен по сравнению с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, определенными в любом из пунктов от а) до g).

Антитело по настоящему изобретению может быть антителом, в котором шесть определяющих комплементарность областей (CDR) антигенсвязывающей(их) области(ей), способных связываться с 5T4, включают в общей сложности не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или самое большее 10 аминокислотных замен по сравнению с

i) последовательностями CDR SEQ ID NO: 6, 7, 8, 10, AAS и SEQ ID NO: 11 [059],

ii) последовательностями CDR SEQ ID NO: 41, 42, 43, 45, DAS и SEQ ID NO: 46 [207]; или

iii) последовательностями CDR SEQ ID NO: 48, 49, 50, 52, DAS и SEQ ID NO: 53 [226].

Предпочтительно 1, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 из указанных аминокислотных замен является/являются консервативными аминокислотными заменами.

Антитело может, в частности, содержать одну или две вариабельные области тяжелой цепи, в которых определяющая комплементарность область 3 (CDR3) включает шесть последовательных аминокислотных остатков последовательности, указанной в SEQ ID NO: 102 (YYGMDV) [059, 207, 226]. Эти шесть последовательных аминокислотных остатков могут быть самыми С-концевыми аминокислотными остатками в CDR3.

Антитело по изобретению может быть антителом, где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает одну или две вариабельные области (VH) тяжелой цепи, содержащие последовательность CDR1 SEQ ID

NO: 41 (GGSFSGYY), последовательность CDR2 SEQ ID NO: 103 (IDHSX1ST) и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 104 (AX2WFGELX3X4YYYGMDV) и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность CDR1 SEQ ID NO: 105 (QSVSSX5), последовательность CDR2 DAS и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 46 (QQRSNWPLT), и где X1 представляет собой G или E, X2 представляет собой A или G, X3 представляет собой W или Y, X4 представляет собой D или H и X5 представляет собой Y или F [207, 226].

Антитело по изобретению может быть антителом, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно, и переменная область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 10, AAS и SEQ ID NO: 11, соответственно [059].

В ином случае антитело по изобретению может быть антителом, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 41, 42 и 43, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 45, DAS и SEQ ID NO: 46, соответственно [207].

Кроме того, антитело согласно изобретению может быть антителом, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 52, DAS и 53, соответственно [226].

В некоторых воплощениях антитело согласно изобретению представляет собой антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, включающей:

a) переменной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 5 [059],

b) переменной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 12 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере,

мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 12 [076],

с) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 19 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 19 [085],

d) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 26 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 26 [106],

e) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 33 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 33 [127],

f) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 40 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 40 [207]; и

g) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 47 [226].

Антитело согласно изобретению может, в частности, представлять собой антитело, где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 5 [059].

Также антитело согласно изобретению может быть антителом, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 40 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 40 [207].

Кроме того, антитело согласно изобретению может быть антителом, где указанная

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 47 [226].

В других воплощениях антитело согласно изобретению представляет собой антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), выбранные из группы, состоящей из:

a) вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающей последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 9 [059],

b) вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 12 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающей последовательность SEQ ID NO: 16 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 16 [076],

c) вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 19 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающей последовательность SEQ ID NO: 23 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 23 [085],

d) вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 26 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 26 [086],

мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 26, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающей последовательность SEQ ID NO: 30 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 30 [106],

е) вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 33 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающей последовательность SEQ ID NO: 37 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 37 [127],

ф) вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 40 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 40, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающей последовательность SEQ ID NO: 44 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 44 [207],

г) вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 47, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающей последовательность SEQ ID NO: 51 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 51 [226].

В одном воплощении, по меньшей мере, одна связывающая область включает вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), имеющую не более 10 мутаций или замен, не более 5 мутаций или замен, например, не более 4 мутаций или замен, например, максимум 3 мутаций или замен, например, максимум 2 мутаций или замен, например, максимум 1 мутацию или замену, в указанной

области переменной области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL), выбранных из группы, включающей:

- a) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи (VL), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 9 [059],
- b) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 12 и переменную область легкой цепи (VL), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 16 [076],
- c) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 19 и переменную область легкой цепи (VL), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 23 [085],
- d) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 26 и переменную область легкой цепи (VL), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 30 [106],
- e) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 33 и переменную область легкой цепи (VL), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 37 [127],
- f) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 40 и переменную область легкой цепи (VL), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 44 [207],
- g) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 47 и переменную область легкой цепи (VL), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 51 [226],

В некоторых воплощениях настоящего изобретения не более 10 мутаций или замен, не более 5 мутаций или замен, таких как не более 4 мутаций или замен, таких как не более 3 мутаций или замен, таких как не более 2 мутаций или замен, например, допускается не более 1 мутации или замены по всей длине переменной области тяжелой цепи и всей переменной области легкой цепи. В других воплощениях не более 10 мутаций или замен, не более 5 мутаций или замен, таких как не более 4 мутаций или замен, таких как не более 3 мутаций или замен, таких как не более 2 мутаций или замен, например, не более 1 мутации или замены может не входить ни в одну из 6 последовательностей CDR в указанной переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи.

Вплоть до 10 мутаций или замен могут быть распределены по всей длине переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи каждой связывающей области. Некоторые или все мутации или замены могут быть

консервативными заменами, в которых один аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток того же класса, что и указано в приведенном выше определении «аминокислота»; например, кислая аминокислота заменяется другим кислотным аминокислотным остатком, а ароматический остаток может быть заменен другим ароматическим остатком. Может быть предпочтительным, чтобы 35% или более, 50% или более, 60% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, 92% или более, 93% или более, или 94% или более замен в варианте представляют собой замены консервативных аминокислотных остатков.

В частности, некоторые или все мутации или замены могут происходить с аминокислотным(и) остатком(ами), каждый из которых имеет те же физические или функциональные свойства, что и соответствующий аминокислотный остаток, который они заменяют. Аминокислотные остатки, имеющие общие физические и функциональные свойства, указаны в приведенном выше определении «аминокислота»; например, под определением «аминокислота» в данном документе выше; например, гидрофобный остаток может быть заменен другим гидрофобным аминокислотным остатком, или остаток, связанный с циклоалкенилом, может быть заменен другим остатком, связанным с циклоалкенилом.

Антитела, содержащие замены или мутации, как описано выше, могут, в частности, быть функциональными вариантами областей VL, областей VH или одной или нескольких CDR, определенных выше со ссылкой на идентификаторы последовательностей. Функциональный вариант VL, VH или CDR, используемый в контексте антител по настоящему изобретению, все еще позволяет антителу сохранять, по меньшей мере, значительную часть (по меньшей мере, около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более) аффинности и/или специфичности/селективности родительского антитела, и в некоторых случаях такое антитело 5T4 может даже иметь большую аффинность, селективность и/или специфичность, чем исходное антитело.

В дополнительных воплощениях изобретения указанное антитело представляет собой антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), выбранные из группы, состоящей из:

a) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи (VL), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 9 [059],

b) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 12 и переменную область легкой цепи (VL),

включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 16 [076],

c) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 19 и переменную область легкой цепи (VL), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 23 [085],

d) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 26 и переменную область легкой цепи (VL), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 30 [106],

e) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 33 и переменную область легкой цепи (VL), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 37 [127],

f) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 40, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 44 [207]; и

g) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 47 и переменную область легкой цепи (VL), включающую или состоящую из последовательности SEQ ID NO: 51 [226],

Антитело по изобретению может быть полноразмерным антителом, таким как полноразмерное антитело IgG1.

Кроме того, антитело по изобретению может быть моновалентным антителом. В ином случае антитело по изобретению может быть двухвалентным антителом.

В других воплощениях антитело, предоставленное согласно настоящему изобретению, представляет собой моноспецифическое антитело.

В ином случае антитело согласно настоящему раскрытию может быть биспецифическим антителом.

Кроме того, в объем настоящего раскрытия входит предоставление антитела, как определено выше, причем антитело содержит антигенсвязывающую область антитела, которое связывается с CD3, например, CD3ε человека (эпсилон), такого как CD3ε человека (эпсилон), как указано в SEQ ID NO: 4.

В частности, настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, содержащему первую антигенсвязывающую область антитела, как описано выше, и вторую связывающую область, которая связывается с CD3, например, CD3 человека, как определено выше.

Примеры молекул биспецифических антител, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают, без ограничения указанным, (i) одно антитело, которое имеет два плеча, включающих разные антигенсвязывающие области, (ii)

одноцепочечное антитело, которое имеет специфичность к двум различным эпитопам, например, через два scFv, связанных тандемным дополнительным пептидным линкером; (iii) антитело с двумя вариабельными доменами (DVD-IgTM), где каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два вариабельных домена в тандеме через короткую пептидную связь. Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010); (v) Tandab®, который представляет собой слияние двух одноцепочечных диател, приводящее к четырехвалентному биспецифическому антителу, которое имеет два сайта связывания для каждого из антигенов-мишеней; (vi) флекситело, которое представляет собой комбинацию scFv с диателом, приводящую к поливалентной молекуле; (vii) так называемая молекула «dock and lock» (Dock-and-Lock®), основанная на «доме димеризации и стыковки» в протеинкиназе A, которая при применении к Fab может давать трехвалентный биспецифический связывающий белок, состоящий из двух идентичных Fab-фрагментов, связанных с другим Fab-фрагментом; (viii) так называемая молекула Scorpion, содержащая, например, два scFv, слитых с обоими концами Fab-плеча человека; и (ix) диатело.

В одном воплощении биспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой диатело, кросс-тело, такое как CrossMab, или биспецифическое антитело, полученное посредством контролируемой замены Fab-плеча (например, как описано в WO 2011/131746).

Примеры различных классов биспецифических антител включают, без ограничения указанным (i) IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами СН3 для усиления гетеродимеризации; (ii) рекомбинантные IgG-подобные молекулы двойного нацеливания, где каждая из двух сторон молекулы содержит Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента, по меньшей мере, двух разных антител; (iii) слитые молекулы IgG, где полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; (iv) слитые молекулы Fc, где одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, Fc-областями или их частями; (v) слитые молекулы Fab, в которых разные Fab-фрагменты слиты вместе, слиты с константными доменами тяжелой цепи, Fc-областями или их частями; и (vi) антитела на основе ScFv и диател и тяжелых цепей (например, доменные антитела, нанотела®), в которых разные одноцепочечные молекулы Fv или разные диатела или разные антитела тяжелой цепи (например, доменные антитела, нанотела®) слиты с друг с другом или с другим белком или молекулой носителя, слитой с константными доменами тяжелой цепи, Fc-областями или их частями.

Примеры IgG-подобных молекул с комплементарными молекулами доменов CH₃ включают, без ограничения указанным, Triomab® (Trion Pharma/Fresenius Biotech, WO/2002/020039), Knobs-into-Holes (Genentech, WO9850431;), CrossMAbs (Roche, WO2011117329) и электростатически согласованные (Amgen, EP1870459 и WO2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010129304), LUZ-Y (Genentech), DIG-body и PIG-body (Pharmabcine), Strand Engineered body (Pharmabcine), SEEDbody (EMD Serono, WO2007110205), Biclonics (Merus), FcΔAdp (Regeneron, WO 2010/015792), биспецифические IgG1 и IgG2 (Pfizer/Rinat, WO11143545), Azymetric scaffold (Zymeworks/Merck-WO76820) (Xencor, WO2011028952), двухвалентные биспецифические антитела (Roche WO 2009/080254) и молекулы DuoBody® (Genmab A/S, WO 2011/131746).

Примеры рекомбинантных IgG-подобных молекул с двойным нацеливанием включают, без ограничения указанным, (DT)-Ig с двойным нацеливанием (GSK/Domantis), антитело Two-in-one (Genentech), перекрестносшитые моноклональные антитела (онкологический центр Карманоса), mAb2 (F-Star, WO2008003116), Zybodies™ (Zyngenia), подходы с общей легкой цепью (Crucell/Merus, US 7,262,028), κLBodies (NovImmune) и CovX-body (CovX/Pfizer).

Примеры слитых молекул IgG включают, без ограничения указанным, Dual Variable Domain (DVD) -Ig™ (Abbott, US 7612181), двухдоменные антитела с двойной головкой (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), IgG-подобные биспецифические (ImClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) и BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, US007951918), слияние scFv (Novartis), слияние scFv (Changzhou Adam Biotech Inc., CN 102250246) и TvAb (Roche, WO2012025525, WO2012025530).

Примеры слитых молекул Fc включают, без ограничения указанным, ScFv/Fc Fusions (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Dual Affinity Retargeting Technology (Fc-DART™) (MacroGenics, WO2008157379, WO2010/080538) и Dual (ScFv) 2-Fab (Национальный исследовательский центр антителной медицины - Китай).

Примеры биспецифических антител слияния Fab включают, без ограничения указанным, F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), Dual-Action или Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock® (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotecnol) и Fab-Fv (UCB-Celltech).

Примеры scFv-, антител на основе диател и доменных антител включают, без ограничения указанным, биспецифический активатор Т-клеток (BiTE®) (Micromet, Tandem Diabody (Tandab™) (Affimed), технологию ретаргетинга с двойной аффинностью (DART) (MacroGenics), одноцепочечное диатело (Academic), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), ScFv химера с сывороточным альбумином человека (Merrimack) и

COMBODY (Epigen Biotech), нанотела с двойным нацеливанием® (Ablynx), антитела с двойным нацеливанием, состоящие только из тяжелой цепи

Антитело согласно настоящему раскрытию может, в частности, представлять собой антитело, в котором антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, включает

вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 54, 55 и 56, соответственно; [huCD3-H1L1] (WO2015001085 (Genmab A/S));

и, необязательно

вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 58, GTN и 59, соответственно [huCD3-H1L1].

Также раскрыты антитела, в которых антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, включает

вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность SEQ ID NO: 57, или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 57 [huCD3-H1L1];

и, необязательно

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность SEQ ID NO: 60 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 60, [huCD3-H1L1].

Настоящее раскрытие дополнительно относится к антителу, где

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL) содержащие последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 10, AAS и 11, соответственно [059];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 56, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59 [huCD3-H1L1], соответственно.

Также в описании представлено антитело, в котором

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 41, 42 и 43, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 45, 46 и 47, соответственно [207];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 56, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59 [huCD3-H1L1], соответственно.

Также в раскрытии представлено антитело, в котором

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 52, 53 и 54, соответственно [226 - VH + VL CDR1, -2 и -3 последовательности];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 56, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59 [huCD3-H1L1], соответственно.

Область связывания антигена, которая связывается с CD3, может связываться с константой равновесной диссоциации K_D в диапазоне 200-1000 нМ, например, в диапазоне 300-1000 нМ, в диапазоне 400-1000 нМ, в диапазоне 500 - 1000 нМ, в диапазоне 300 - 900 нМ, в диапазоне 400 - 900 нМ, в диапазоне 400 - 700 нМ, в диапазоне 500 - 900 нМ, в диапазоне 500 - 800 нМ, в пределах диапазонов 500-700 нМ, в диапазоне 600-1000 нМ, в диапазоне 600-900 нМ, в диапазоне 600-800 нМ или, например, в диапазоне 600-700 нМ.

В дополнительных воплощениях антитело, раскрытое в настоящем документе, имеет более низкую аффинность связывания человеческого CD3ε, чем антитело, имеющее антигенсвязывающую область, содержащую последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 57, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 60 [huCD3-H1L1],

предпочтительно, где указанная аффинность, по меньшей мере, в 2 раза ниже, например, как минимум в 5 раз ниже, например, как минимум в 10 раз ниже, например, по меньшей мере, в 20 раз ниже, по меньшей мере, в 30 раз ниже, по меньшей мере, в 40 раз ниже, по меньшей мере, в 45 раз ниже, по меньшей мере, в 50 раз ниже, по меньшей мере, в 55 раз ниже, или, например, по меньшей мере, в 60 раз ниже.

В частности, антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, может связываться с константой равновесной диссоциации KD в диапазоне 1-100 нМ, например, в диапазоне 5-100 нМ, в диапазоне 10-100 нМ, в пределах диапазон 1-80 нМ, диапазон 1-60 нМ, диапазон 1-40 нМ, диапазон 1-20 нМ, диапазон 5-80 нМ, диапазон 5-60 нМ, в диапазоне 5-40 нМ, в диапазоне 5-20 нМ, в диапазоне 10-80 нМ, в диапазоне 10-60 нМ, в диапазоне 10-40 нМ или в пределах диапазон 10-20 нМ.

Аффинность, с которой антитело согласно изобретению связывается с CD3, может быть определена с помощью биослойной интерферометрии, с использованием модификации процедуры, описанной выше или как изложено в Примере 2 в данном документе, в котором антитело иммобилизовано на биосенсоре, основанном на принципе захвата антителами к Fc-фрагменту IgG человека, и определяется ассоциация и диссоциация CD3E27-GSKa (зрелый белок SEQ ID NO: 101) с иммобилизованным антителом. Кроме того, аффинность, с которой антитело согласно изобретению связывается с CD3, может быть определена с помощью биослойной интерферометрии, как показано в Примере 9 в данном документе.

Антитела, связывающие CD3, в частности CD3 человека, с пониженной аффинностью, представлены в WO 2017/009442, и следует понимать, что любое из этих антител может служить основой для создания антител согласно настоящему изобретению, которые в дополнение к способности для связывания 5T4 также обладают способностью связывать CD3 с пониженной аффинностью. Следовательно, в дополнительных воплощениях антитело согласно изобретению представляет собой антитело, где

область связывания антигена, которая связывается с CD3, включает область вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность CDR1, последовательность CDR2 и последовательность CDR3,

вариабельная область тяжелой цепи (VH) по сравнению с вариабельной областью тяжелой цепи (VH), содержащей последовательность, указанную в SEQ ID NO: 57, имеет аминокислотную замену в одной из последовательностей CDR, причем замена находится в положении выбранные из группы, состоящей из: T31, N57, H101, G105, S110 и Y114, положения пронумерованы в соответствии с последовательностью SEQ ID NO: 57; и

вариабельная область легкой цепи (VL) дикого типа содержит последовательности

CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 58, GTN и SEQ ID NO: 59, соответственно.

Предпочтительно, чтобы последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3, содержали в общей сложности не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, при сравнении с последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 57.

Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3, могут иметь, по меньшей мере, 95% идентичность последовательностей, например, по меньшей мере, 96% идентичность последовательностей, по меньшей мере, 97 % идентичности последовательностей, по меньшей мере, 98% идентичности последовательностей или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательностей с аминокислотными последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) дикого типа, идентичность последовательностей рассчитывается на основе выравнивания аминокислотной последовательности, состоящей из последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3 с аминокислотной последовательностью, содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 дикого типа вариабельной области тяжелой цепи (VH).

В частности, антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, может содержать мутацию, выбранную из группы, состоящей из: T31M, T31P, N57E, H101G, H101N, G105P, S110A, S110G, Y114M, Y114R, Y114V, положения пронумерованы в соответствии с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 57.

В некоторых воплощениях антитело согласно изобретению представляет собой антитело, где указанное антитело представляет собой биспецифическое антитело, которое лишено или имеет пониженную Fc-опосредованную эффекторную функцию («инертное» антитело), и включает антигенсвязывающую область антитело, которое связывается с CD3, при этом антитело:

а) способно опосредовать зависящую от концентрации цитотоксичность клеток SK-OV-3 при использовании очищенных моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) или Т-клеток в качестве эффекторных клеток, например, при анализе, как описано в Примере 14 в данном документе,

б) способно опосредовать зависящую от концентрации цитотоксичность клеток MDA-MB-231 при использовании очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток, например, при анализе, как описано в Примере 13 в данном документе,

с) способно активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии опухолевых клеток

MDA-MB-231; например, при анализе, как описано в примере 13 (II) в данном документе

d) способно активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии опухолевых клеток ВхРС-3, PANC-1, Са Ski и/или SiHa; например, при анализе, как описано в Примере 17 в данном документе,

e) способно вызывать цитотоксичность опухолевых клеток ВхРС-3, PANC-1, Са Ski и/или SiHa при использовании очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток, например, при анализе, как описано в примере 17 в данном документе; и/или

f) демонстрирует противоопухолевую активность, такую как ингибирование роста опухоли или замедленного роста опухоли, в модели мышинового ксенотрансплантата с воссозданием гуманизированных иммунных гемопоэтических стволовых клеток, такой как *NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ*, инокулированной опухолевыми клетками человека MDA-MB-231; например, при определении, как описано в Примере 15; и

Кроме того, антитело по изобретению представляет собой антитело, которое при оценке с помощью проточной цитометрии или ELISA не связывает лейкоцитарные FcγR и не индуцирует CD3-зависимое, FcγR-опосредованное перекрестное связывание CD3 в отсутствие мишень (5T4) - специфических опухолевых клеток путем связывания с C1q.

Более подробное описание антител со сниженной Fc-опосредованной эффекторной функцией или без нее («инертные» антитела) можно найти ниже.

Способность антитела опосредовать зависящую от концентрации цитотоксичность клеток SK-OV-3 определяют в анализе цитотоксичности *in vitro*, включающем стадии:

- i) выделения PBMC или Т-клеток из лейкоцитов здоровых доноров человека,
- ii) предоставления

первого набора образцов, где каждый образец содержит PBMC и клетки аденокарциномы яичника человека SK-OV-3, и где отношения PBMC: клетки SK-OV-3 в указанных образцах составляют 1: 2, 1: 1, 2: 1, 4: 1, 8: 1 и 12: 1; и

второго набора образцов, где каждый образец содержит Т-клетки и клетки аденокарциномы яичника человека SK-OV-3, и где соотношения Т-клетки: клетки SK-OV-3 в указанных образцах составляют 1: 2, 1: 1, 2: 1, 4: 1 и 8: 1

iii) добавления антитела к каждому набору образцов в концентрациях от 0,0128 нг/мл до 1000 нг/мл и инкубация образцов в течение 72 часов при 37°C; и затем

iv) оценки жизнеспособности клеток SK-OV-3 с использованием резазурина (7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он 10-оксид).

Способность активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии опухолевых клеток MDA-MB-231 может быть определена с помощью анализа, включающего следующие стадии:

- i) Выделения Т-клеток из лейкоцитов здоровых доноров человека,
- ii) Предоставления набора образцов, каждый из которых содержит Т-клетки и клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, и где соотношение Т-клетки: клетки MDA-MB-231 в указанных образцах составляет 8:1,
- iii) добавления антитела к набору образцов в концентрациях от 0,0128 нг/мл до 1000 нг/мл и инкубация образцов в течение 72 часов при 37°C,
- iv) окрашивания Т-клеток флуоресцентно мечеными антителами против маркеров активации Т-клеток, таких как антитела CD69-APC, CD25-PE-Cy7 и CD279/PD 1-BV 604, путем инкубации с указанными антителами в течение 30 минут при 4 °C; и
- v) анализа Т-клеток с помощью проточной цитометрии.

Антитела APC против CD69 человека (CD69-APC) коммерчески доступны, например, от BioLegend (Cat. №№ 310909 и 310910). Моноклональное антитело к CD25, PE-Cyanine7 (CD25-PE-Cy7) также коммерчески доступно, например, от ThermoFisher Scientific (Cat. № 25-0259-42) и от BD Biosciences (Cat. # 557741). Наконец, антитела CD279/PD 1-BV 604 могут быть коммерчески получены от Genscript (Cat. № A01828).

Активация Т-клеток *in vitro* в присутствии опухолевых клеток ВхРС-3, PANC-1, Ca Ski и/или SiHa может быть определена с помощью процедуры, включающей стадии:

- i) Предоставления Т-клеток, выделенных из лейкоцитов здоровых доноров человека,
- ii) Предоставления набора образцов, где каждый образец содержит указанные Т-клетки и опухолевые клетки ВхРС-3, PANC-1, Ca Ski или SiHa, и где соотношение Т-клетки: опухолевые клетки в указанных образцах составляет 4: 1,
- iii) добавления антитела к набору образцов в концентрациях от 0,0128 нг/мл до 5000 нг/мл (например, 5-кратные разведения) и инкубация образцов в течение 72 часов при 37°C,
- iv) сбора из каждого образца 110 мкл надосадочной жидкости, содержащего Т-клетки, и окрашивание Т-клеток флуоресцентно мечеными антителами против Т-клеточных маркеров, таких как CD3-eFluor450, CD4-APC-eFluor780, DC8-AF700, и антителами против маркеров Т-клеток, такие как антитела 69-APC, CD25-PE-Cy7 и CD279/PD1-BV604, путем инкубации с указанными антителами в течение 30 минут при 4°C; и
- v) анализа образцов методом проточной цитометрии.

Способность вызывать цитотоксичность опухолевых клеток ВхРС-3, PANC-1, Ca Ski и/или SiHa может быть определена с помощью процедуры, включающей стадии:

- i) Предоставления Т-клеток, выделенных из лейкоцитов здоровых доноров

человека,

ii) Предоставления набора тестовых образцов и контрольных образцов, каждый из которых содержит указанные Т-клетки и опухолевые клетки ВхРС-3, PANC-1, Ca Ski или SiHa, которым дали прикрепиться к дну 96-луночного культурального планшета и где соотношение Т-клетки: опухолевые клетки в указанных образцах составляет 4: 1,

iii) добавления антитела к набору тестируемых образцов в концентрациях от 0,0128 нг/мл до 5000 нг/мл (например, 5-кратные разведения), в то время как контрольные образцы остаются необработанными или инкубируются с 5 мкМ стауроспорином, и инкубации всех образцов в течение 72 часов при 37°C,

iv) Инкубации прикрепленных клеток в 10% (масс./масс.) 7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он 10-оксиде (резазурин) в среде RPMI-1640 с добавлением 10% (масс./масс.) донорской бычьей сыворотки с железом и пенициллином/стрептомицином при 37°C в течение 4 часов,

v) Измерения оптической плотности клеток; принятия поглощения клеток, инкубированных со стауроспорином, за 0% жизнеспособности, а необработанных клеток за 100% жизнеспособности и расчета процента жизнеспособных клеток как

$$\times 100 \% \text{ живых клеток} = \left(\frac{[\text{поглощение образца} - \text{поглощение клеток, обработанных стауроспорином}]}{[\text{поглощение необработанных клеток} - \text{поглощение клеток, обработанных стауроспорином}]} \right)$$

Антитело по изобретению может, в частности, представлять собой антитело, в котором антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, включает:

a) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 61, 55 и 56 [VH CDR1-T31P + VH CDR 2,3] дикого типа, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], или

b) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 63, 55 и 56 [VH CDR1-T31M + VH CDR 2,3], соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно, или

c) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 65 и 56 [VH CDR-N57E + VH CDR 1,3 дикого типа], соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL),

содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно, или

d) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 67 [CDR 1,2 VH дикого типа + VH CDR3-H101G], соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно.

е) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 69 [CDR 1, 2 VH дикого типа + VH CDR3-H101N], соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно;

ф) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 71 [CDR 1,2 VH дикого типа + VH CDR3-G105P], соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно;

г) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 73 [CDR 1, 2 VH дикого типа + VH CDR3-S110A], соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно, или

h) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 75 [CDR 1,2 VH дикого типа + VH CDR3-S110G], соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно,

i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 77 [CDR 1,2 VH

дикого типа + VH CDR3-Y114V], соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно, или

j) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 79 [CDR 1,2 VH дикого типа + VH CDR3-Y114M], соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно, или

k) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 81 [CDR 1,2 VH дикого типа + VH CDR3-Y114R], соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающая область способна связываться с CD3 переменной областью тяжелой цепи (VH), содержащей CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 67 [VH дикого типа CDR 1,2 + VH CDR3-H101G], соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность как представлены в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает антитело, как определено выше, где

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL) содержащие последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 10, AAS и SEQ ID NO: 11, соответственно [059];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 67 [CDR 1, 2 VH дикого типа + VH CDR3-H101G], соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую

CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно.

Кроме того, изобретение обеспечивает антитело, как определено выше, где антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 41, 42 и 43, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащие последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 45, DAS и 46, соответственно [207];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 67 [CDR 1, 2 VH дикого типа + VH CDR3-H101G], соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно.

Кроме того, изобретение обеспечивает антитело, как определено выше, где антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 52, DAS и 53, соответственно [226];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 67 [CDR 1, 2 VH дикого типа + VH CDR3-H101G], соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно.

В антителе согласно изобретению антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, может содержать последовательность VH и последовательность VL, выбранную из группы, состоящей из:

а) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 62 [VH T31P], и

последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 60,

b) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 64 [VH T31M], и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 60,

c) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 66 [VH N57E], и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 60,

d) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 68 [VH H101G], и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 60,

e) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 70 [VH H101N], и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 60,

f) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 72 [VH G105P], и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 60,

g) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 74 [VH S110A], и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 60,

h) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 76 [VH S110G], и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 60,

i) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 78 [VH Y114V], и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 60,

j) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 80 [VH Y114M], и последовательности VL, указанная в SEQ ID NO: 60; и

k) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 82 [VH Y114R], и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 60.

В частности, антитело согласно изобретению может быть антителом, в котором антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 68 [VH H101G], и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 60.

В некоторых воплощениях антитело согласно изобретению представляет собой антитело, в котором

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, которая включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 5 [059];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, которая включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 68 [VH H101G], и

последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 60.

В других воплощениях антитело согласно изобретению представляет собой антитело, в котором

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 40 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 40 [207];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, которая включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 68 [VH H101G], и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 60.

В еще других воплощениях антитело согласно изобретению представляет собой антитело, в котором

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 47 [226];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, которая включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 68 [VH H101G], и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 60.

Как будет хорошо известно квалифицированному специалисту, каждая антигенсвязывающая область антитела обычно включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), и каждая из переменных областей содержит три последовательности CDR, CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности, FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно. Эта структура также может быть обнаружена в антителах согласно настоящему изобретению. Кроме того, антитело согласно изобретению могут содержать две константные области тяжелой цепи (CH) и две константные области легкой цепи (CL).

В конкретных воплощениях антитело согласно изобретению включает первую и вторую тяжелую цепь, например, первую и вторую тяжелую цепь, каждая из которых содержит, по меньшей мере, шарнирную область, область CH2 и CH3. Стабильные гетеродимерные антитела могут быть получены с высоким выходом, например, путем так

называемого обмена Fab-плеча, как это предусмотрено в WO 2008/119353 и WO 2011/131746, на основе двух гомодимерных исходных белков, содержащих только несколько асимметричных мутаций в областях СНЗ. Следовательно, в некоторых воплощениях антитело представляет собой первую тяжелую цепь, в которой была заменена, по меньшей мере, одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из Т366, L368, К370, D399, F405, Y407 и К409 в тяжелой цепи IgG1 человека, и вторая тяжелая цепь, в которой была заменена, по меньшей мере, одна из аминокислот в положениях, соответствующих положению, выбранному из группы, состоящей из Т366, L368, К370, D399, F405, Y407 и К409 в тяжелой цепи IgG1 человека, причем указанные замены указанной первой и указанной второй тяжелых цепей находятся в разных положениях, и при этом положения аминокислот пронумерованы в соответствии с нумерацией EU.

В конкретных воплощениях изобретение относится к антителу, в котором аминокислота в положении, соответствующем К409 в тяжелой цепи IgG1 человека, представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи, или наоборот.

В некоторых воплощениях антитело согласно настоящему изобретению содержит, помимо антигенсвязывающих областей, область Fc, состоящую из последовательностей Fc двух тяжелых цепей. Каждая из первой и второй последовательности Fc может быть любого изотипа, включая любой изотип человека, такой как изотип IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM или IgA, или смешанный изотип. Предпочтительно область Fc представляет собой изотип IgG1 человека, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанный изотип, такой как изотип IgG1 человека.

Антитела по настоящему изобретению могут включать модификации в области Fc, чтобы сделать антитело инертным или неактивирующим антителом. Следовательно, в антителах, описанных в данном документе, одна или обе тяжелые цепи могут быть модифицированы таким образом, что антитело индуцирует опосредованную Fc эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с антителом, которое является идентичным, за исключением того, что оно содержит немодифицированные первую и вторую тяжелые цепи. Fc-опосредованная эффекторная функция может быть измерена путем определения Fc-опосредованной экспрессии CD69 на Т-клетках (т.е. экспрессии CD69 в результате опосредованного антителом CD3 Fcγ-рецептор-зависимого перекрестного связывания CD3), путем связывания с рецепторами Fcγ, путем связывания с C1q, или путем индукции Fc-опосредованного перекрестного связывания FcγR. В

частности, константные последовательности тяжелой цепи могут быть изменены таким образом, что Fc-опосредованная экспрессия CD69 снижается, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 99% или 100% по сравнению с антителом дикого типа (немодифицированным), где указанная Fc-опосредованная экспрессия CD69 определяется с помощью функционального анализа на основе РВМС, например, как описано в Примере 3 из WO2015001085. Модификации константных последовательностей тяжелой и легкой цепи также могут приводить к снижению связывания C1q с указанным антителом. По сравнению с немодифицированным антителом снижение может составлять, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или 100%, и связывание C1q может быть определено с помощью ELISA. Кроме того, область Fc, которая может быть модифицирована так, чтобы указанное антитело опосредовало снижение Fc-опосредованной пролиферации Т-клеток по сравнению с немодифицированным антителом, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 99% или 100%, при этом указанная пролиферация Т-клеток измеряется с помощью функционального анализа на основе РВМС.

Примеры положений аминокислот, которые могут быть изменены, например, в антителе изотипа IgG1 включают положения L234 и L235. Следовательно, антитело согласно изобретению может содержать первую и вторую тяжелую цепь, причем как в первой, так и во второй тяжелой цепи аминокислотные остатки в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно для нумерации EU представляют собой F и E, соответственно.

Кроме того, аминокислотная замена D265A может снизить связывание со всеми рецепторами Fcγ и предотвратить ADCC (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. (276): 6591-604). Следовательно, антитело по изобретению может содержать первую и вторую тяжелую цепь, причем как в первой, так и во второй тяжелой цепи аминокислотный остаток в положении, соответствующем положению D265 тяжелой цепи IgG1 человека, согласно нумерации EU представляет собой A. Дальнейшие воплощения изобретения относятся к антителам, в которых, по меньшей мере, в одной, например, в обеих, указанной первой и второй тяжелых цепях, аминокислоты в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека, представляют собой F, E и A, соответственно. В настоящей заявке антитела, которые имеют комбинацию трех аминокислотных замен L234F, L235E и D265A и, кроме того, мутацию K409R или F405L, описанную в данном документе выше, обозначаются

суффиксом «FEAR» или «FEAL», соответственно.

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 дикого типа обозначена в настоящем документе как SEQ ID NO: 89. В соответствии с воплощениями, раскрытыми выше, антитело по изобретению может включать константную область тяжелой цепи IgG1, несущую замену F405L и имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 90, и/или константную область тяжелой цепи IgG1, несущую замену K409R и имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 94.

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1, несущей замены L234F, L235E и D265A, обозначена в данном документе как SEQ ID NO: 91. Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1, несущей замены L234F, L235E, D265A и F405L, обозначена в данном документе как SEQ ID NO: 92. Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1, несущей замены L234F, L235E, D265A и K409R, обозначена в настоящем документе как SEQ ID NO: 93.

Настоящее изобретение также относится к антителу, где

а) антигенсвязывающая(ие) область(и), способная связываться с 5T4, является гуманизированной и/или

б) антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, если присутствует, гуманизирована.

Также изобретение обеспечивает антитело, где

а) антигенсвязывающая(ие) область(и), способная связываться с 5T4, является/являются человеческими, и/или

б) антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, если присутствует, является человеческой.

Кроме того, изобретение обеспечивает антитело, где

а) антигенсвязывающая(ие) область(и), способная связываться с 5T4, является/являются химерными, и/или

б) антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, если присутствует, является химерной.

В некоторых воплощениях антитело содержит легкую цепь каппа (κ). Последовательность в конкретных воплощениях изобретения, касающихся биспецифических антител, легкая каппа-цепь включает последовательности CDR1, -2 и -3 легкой цепи антитела 5T4, как описано выше.

В дополнительных воплощениях изобретения антитело по любому из

предшествующих пп., где указанное антитело содержит легкую цепь лямбда (λ). В конкретных воплощениях изобретения, касающихся биспецифических антител, легкая лямбда-цепь включает последовательности CDR1, -2 и -3 легкой цепи антитела CD3, как описано выше, в частности последовательности CDR1, -2 и -3 антитела CD3, имеющего пониженную аффинность к CD3, как описано выше. Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа включена в данный документ как SEQ ID NO: 95, а аминокислотная последовательность константной области легкой цепи лямбда включена в данное описание как SEQ ID NO: 96.

В конкретных воплощениях антитело включает легкую цепь лямбда (λ) и легкую цепь каппа (κ); например, антитело с тяжелой цепью и легкой лямбда-цепью, которые содержат связывающую область, способную связываться с CD3, и тяжелую цепь и легкую каппа-цепь, которые содержат связывающую область, способную связываться с 5T4.

Иммуноконъюгаты

В другом аспекте изобретение обеспечивает иммуноконъюгат или конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий антитело, определенное выше, и терапевтическую составляющую, такую как цитотоксический агент, химиотерапевтическое лекарственное средство, цитокин, иммунодепрессант, антибиотик или радиоизотоп. Обычно в распоряжении специалиста будут многочисленные цитотоксические агенты, химиотерапевтические лекарственные средства, цитокины, иммунодепрессанты, антибиотики и радиоизотопы, оптимальный выбор терапевтического фрагмента в зависимости от желаемого применения иммуноконъюгата. Для определенных применений предпочтительным цитотоксическим агентом может быть агент, разрушающий микротрубочки, такой как дуостатин, например, Дуостатин-3.

Нуклеотидные конструкции

Дальнейший аспект изобретения относится к нуклеотидной конструкции, содержащей

а) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4, как определено в данном документе ранее, и/или

б) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4, как определено в данном документе ранее.

Нуклеотидная конструкция может дополнительно включать

а) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную

связываться с CD3, как определено в данном документе ранее; и/или

b) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в данном документе ранее.

Экспрессирующие векторы

Другой аспект изобретения обеспечивает экспрессирующий вектор, содержащий последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие последовательности тяжелой и/или легкой цепей антитела согласно изобретению. В частности, экспрессирующий вектор может содержать:

a) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4, как определено в данном документе ранее, и/или

b) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4, как определено в данном документе ранее.

экспрессирующий вектор может дополнительно включать:

a) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в данном документе ранее; и/или

b) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в данном документе ранее.

В следующем воплощении экспрессирующий вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую константную область легкой цепи, тяжелой цепи или как легкой, так и тяжелой цепей антитела, например, человеческого моноклонального антитела IgG1,κ.

Экспрессирующий вектор в контексте настоящего изобретения может быть любым подходящим вектором, включая хромосомный, нехромосомный и синтетический нуклеотидные векторы (нуклеотидная последовательность содержащая набор элементов контроля экспрессии). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирусы, дрожжевые плазмиды, векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, и векторы на основе виру+сных нуклеиновых кислот (РНК или ДНК). В одном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против 5T4, содержится в «голом» векторе ДНК или РНК, включая, например, линейный элемент экспрессии (как описано, например, у Sykes and Johnston,

Nat Biotech 17, 35559 (1997).), компактный нуклеотидный вектор (как описано, например, в US 6077, 835 и/или WO 00/70087), плазмидный вектор, такой как pBR322, pUC 19/18 или pUC 118/119, нуклеотидный вектор минимального размера «midge» (как описано, например, в Schakowski et al., Mol Ther 3, 793800 (2001)), или в виде осажденной конструкции нуклеотидного вектора, такой как конструкция, осажденная CaP04 (как описано, например, в WO 00/46147, Benvenisty и Reshef, PNAS USA 83, 955155 (1986), Wigler et al., Cell 14, 725 (1978), и Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)). Такие нуклеотидные векторы и их применения хорошо известны в данной области (см. например, US 5,589,466 и US 5,973,972).

В одном воплощении вектор подходит для экспрессии антитела против 5Т4 в бактериальной клетке. Примеры таких векторов включают экспрессирующие векторы, такие как BlueScript (Stratagene), векторы pIN, Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503 5509 (1989), векторы pET (Novagen, Madison WI) и т.п.).

Экспрессирующий вектор также может или в ином случае является вектором, подходящим для экспрессии в дрожжевой системе. Может быть использован, любой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Подходящие векторы включают, без ограничения перечисленным, векторы, включающие конститутивные или индуцибельные промоторы, такие как альфа-фактор, алкоголь оксидаза и PGH (рассмотренные в: F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing и Wiley InterScience New York (1987) и Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516 544 (1987)).

Нуклеотидная конструкция и/или вектор может также содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность секреции/локализации, которая может нацеливать полипептид, такой как растущая полипептидная цепь, в периплазматическое пространство или в среду для культивирования клеток. Такие последовательности известны в данной области и включают лидер секреции или сигнальные пептиды, последовательности нацеливания в органеллы (например, последовательности ядерной локализации, сигналы удержания в ER, последовательности транзита в митохондриях, последовательности транзита в хлоропласты), последовательности мембранной локализации/заякоривания (например, последовательности остановки переноса, последовательности GPI-заякоривания) и т.п.

В экспрессирующем векторе по настоящему изобретению нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против 5Т4, могут содержать или могут быть связаны с любым подходящим промотором, энхансером и другими элементами, способствующими экспрессии. Примеры таких элементов включают сильные промоторы экспрессии

(например, промотор/энхансер IE CMV человека, а также промоторы RSV, SV40, SL33, MMTV и HIV LTR), эффективные последовательности терминации поли (A), начало репликации плазмидного продукта в *E. coli*, ген устойчивости к антибиотикам в качестве селектируемого маркера и/или удобный сайт клонирования (например, полилинкер). Нуклеиновые кислоты могут также содержать индуцибельный промотор, в отличие от конститутивного промотора, такого как CMV IE (квалифицированный специалист поймет, что такие термины фактически являются описателями степени экспрессии гена в определенных условиях).

В одном воплощении экспрессирующий вектор, кодирующий анти-5T4-антитело, может быть размещен в клетке-хозяине или животном-хозяине и/или доставлен в нее через вирусный вектор.

Клетки и клетки-хозяева

В дополнительном аспекте изобретение относится к клетке, содержащей нуклеотидную конструкцию, как определено в данном документе выше, или экспрессирующий вектор, как определено в данном документе выше. Следует понимать, что клетка могла быть получена путем трансфекции клетки-хозяина указанной нуклеотидной конструкцией или экспрессирующим вектором, такой как рекомбинантная клетка-хозяин.

Клетка-хозяин может быть человеческого происхождения, такая как клетка эмбриональной почки человека (НЕК), такая как клетка НЕК/Expi. В ином случае клетка-хозяин может происходить из грызунов, например, из клеток яичников китайского хомячка, таких как клетки CHO/N50. Кроме того, клетка-хозяин может иметь бактериальное происхождение.

Клетка может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело по изобретению или его части, стабильно интегрированные в клеточный геном. В ином случае клетка может содержать неинтегрированную нуклеиновую кислоту, такую как плазида, космида, фагмида или элемент линейной экспрессии, который содержит последовательность, кодирующую экспрессию антитела против 5T4 по изобретению или его части. В частности, клетка-хозяин может содержать неинтегрированную нуклеиновую кислоту, такую как плазида, космида, фагмида или элемент линейной экспрессии, который содержит последовательность, кодирующую экспрессию антитела против 5T4 или его части.

Композиции

Еще один аспект изобретения относится к композиции, содержащей антитело; например, биспецифическое антитело или иммуноконъюгат, как определено выше.

Композиция может быть фармацевтической композицией, содержащей антитело, биспецифическое антитело или иммуноконъюгат и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции могут быть составлены с носителем, наполнителем и/или разбавителем, а также с любыми другими компонентами, подходящими для фармацевтических композиций, включая известные адъюванты, в соответствии с традиционными методами, такими как те, что описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Фармацевтически приемлемые носители или разбавители, а также любые известные адъюванты и эксципиенты должны подходить для антитела или конъюгата антитела по настоящему изобретению и выбранного способа введения. Пригодность для носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяется на основании отсутствия значительного отрицательного воздействия на желаемые биологические свойства выбранного соединения или фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, менее чем значительное воздействие [относительное ингибирование 10% или менее относительное ингибирование, относительное ингибирование 5% или менее и т.д.] при связывании антигена).

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может включать разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионный детергент, такой как Tween-20 или Tween-80), стабилизаторы (например, сахара или аминокислоты, не содержащие белков), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьировать, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от целого ряда фармакокинетических факторов, включающих активность конкретных применяемых композиций по настоящему изобретению, или их амида, путь введения, время введения, скорость выведения конкретного применяемого соединения, длительность лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов используемых в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраста, пола, массы, состояния, общего уровня здоровья и предыдущей истории болезни подвергнутого лечению пациента и т.п. факторов, хорошо известных в медицине.

Фармацевтически приемлемые носители включают любые и все подходящие

растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, агенты изотоничности, антиоксиданты и агенты, замедляющие всасывание, и тому подобное, которые физиологически совместимы с соединением по настоящему изобретению.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают воду, физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер, этанол, декстрозу, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло и кунжутное масло, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовая камедь и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат, и/или различные буферы. Другие носители хорошо известны в фармацевтике.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъеклируемых растворов или дисперсий для немедленного приема. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда любая обычная среда или агент несовместимы с активным соединением, предполагается их применение в фармацевтических композициях по настоящему изобретению.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут также включать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например, (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобное; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и тому подобное; и (3) хелатирующие металлы агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут включать в композиции агенты изотоничности, такие как сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, глицерин или хлорид натрия.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать один или несколько адъювантов, подходящих для выбранного пути введения, такие как консерванты, увлажнители, эмульгаторы, диспергенты, консерванты или

буферы, которые могут повышать срок годности или эффективность фармацевтической композиции. Соединения по настоящему изобретению могут быть получены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, такими как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, моностеарат глицерина, дистеарат глицерина, биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, сложные полиортоэфиры и полимолочную кислоту отдельно или с воском, или другие материалы, хорошо известные в данной области. Способы приготовления таких составов обычно известны специалистам в данной области, см., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

В одном воплощении соединения настоящего изобретения могут быть составлены для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Фармацевтически приемлемые носители для парентерального введения включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций для немедленного приема. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда какая-либо обычная среда или агент несовместимы с активным соединением, предполагается их применение в фармацевтических композициях по настоящему изобретению. В композиции также могут быть включены другие активные или терапевтические соединения.

Фармацевтические композиции для инъекций обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой водный или неводный растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и сложные органические эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Соответствующая текучесть может поддерживаться, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как глицерин, маннит, сорбит или хлорид натрия.

Пролонгированное всасывание композиций для инъекций может быть достигнуто путем включения в композицию агента, замедляющего абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина. Стерильные инъеклируемые растворы могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель вместе с одним или в комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. Как правило, дисперсии готовят путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъеклируемых растворов, примерами способов приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента вместе с любым дополнительным требуемым ингредиентом из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизационной микрофильтрацией. В общем, дисперсии готовят путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций примерами методов приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из их ранее стерильно отфильтрованного раствора.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может включать одно антитело, биспецифическое антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) по настоящему изобретению, комбинацию антитела, биспецифического антитела или ADC по настоящему изобретению с другим терапевтическим соединением или комбинацию соединений по настоящему изобретению.

Фармацевтическая композиция может вводиться любым подходящим путем или в любом режиме. Подходящие пути введения соединения по настоящему изобретению *in vivo* и *in vitro* хорошо известны в данной области и могут быть выбраны специалистами в данной области.

В одном воплощении фармацевтическая композиция по настоящему изобретению вводится парентерально; то есть способом введения, отличным от энтерального и

местного введения; обычно путем инъекции и включают эпидермальную, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсульную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, интрандиозную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, внутричерепную, внутригрудную, эпидуральную и надчревную инъекцию и инфузию. В частности, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может вводиться внутривенной или подкожной инъекцией или инфузией.

Применения и терапевтические приложения

Настоящее изобретение, кроме того, обеспечивает антитело, такое как биспецифическое антитело, или иммуноконъюгат, или конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), как определено в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства. Антитела или иммуноконъюгаты против 5T4 по настоящему изобретению можно использовать для лечения или профилактики заболевания или нарушения, вовлекающего клетки, экспрессирующие 5T4. В частности, биспецифические антитела согласно изобретению; т.е. антитела, которые содержат антигенсвязывающие области, способные связывать 5T4 и CD3, могут быть полезны в терапевтических условиях, в которых желательно специфическое нацеливание и опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих 5T4, и они могут быть более эффективными по сравнению с обычным анти-5T4 антителами при некоторых таких показаниях и условиях.

В одном воплощении антитело, такое как биспецифическое антитело, или иммуноконъюгат, или конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) по настоящему изобретению, раскрыто в настоящем документе для применения при лечении онкологических заболеваний. Антитело, такое как биспецифическое антитело, или иммуноконъюгат, или конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), может, в частности, использоваться для лечения онкологических заболеваний, которые характеризуются экспрессией 5T4, по меньшей мере, в некоторых опухолевых клетках.

Онкологическое заболевание, в частности, может быть выбрано из группы, состоящей из рака почки/почек, рака молочной железы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака матки/эндометрия/шейки матки, рака легкого, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, лимфомы, острого миелоидного лейкоза.

Кроме того, изобретение относится к применению антитела согласно изобретению

для производства лекарственного средства, такого как лекарственное средство для лечения онкологических заболеваний, например, выбранных из группы, состоящей из рака почки/почек, рака молочной железы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака матки/эндометрия/шейки матки, рака легкого, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, лимфомы, острого миелоидного лейкоза.

В дополнительном аспекте изобретение обеспечивает способ лечения заболевания, включающий введение антитела, иммуноконъюгата, композиции, такой как фармацевтическая композиция или конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) по изобретению, объекту, нуждающемуся в этом.

В конкретных воплощениях изобретения указанный способ предназначен для лечения онкологических заболеваний. Способ изобретения может, в частности, включать следующие стадии:

а) выбор объекта, страдающего от злокачественной опухоли, содержащей опухолевые клетки, экспрессирующие 5T4, и/или злокачественной опухоли, о которой известно, что она экспрессирует 5T4; и

б) введение объекту антитела, такого как биспецифическое антитело, фармацевтической композиции или конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) по настоящему изобретению.

Онкологическое заболевание, в частности, может быть выбран из группы, состоящей из рака почки/почек, рака молочной железы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака матки/эндометрия/шейки матки, рака легкого, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, лимфомы, острого миелоидного лейкоза.

Режимы дозировки в вышеуказанных способах лечения и применения регулируются с получением оптимальной целевой реакции (например, терапевтической реакции). Например, может быть введен одиночный болюс, могут быть введены несколько доз в течение периода времени или дозы могут быть пропорционально уменьшены или увеличены в зависимости от потребностей терапевтической ситуации. Парентеральные композиции могут быть составлены в виде стандартной лекарственной формы для легкого введения и единообразия доз.

Эффективные дозировки и режимы дозирования антител зависят от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и могут быть определены специалистами в данной области. Примерный неограничивающий диапазон терапевтически эффективного

количества соединения настоящего изобретения составляет около 0,001-10 мг/кг, например, около 0,001-5 мг/кг, например, около 0,001-2 мг/кг, например, около 0,001-1 мг/кг, например, около 0,001, около 0,01, около 0,1, около 1 или около 10 мг/кг. Другой примерный, неограничивающий диапазон терапевтически эффективного количества антитела по настоящему изобретению составляет около 0,1-100 мг/кг, например, около 0,1-50 мг/кг, например, около 0,1-20 мг/кг, например, около 0,1-10 мг/кг, например, около 0,5, около 0,3, около 1, около 3, около 5 или около 8 мг/кг.

Врач, имеющий среднюю квалификацию в данной области, может легко определить и прописать эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начинать дозу антитела, используемого в фармацевтической композиции, с уровней, более низких, чем требуются для достижения искомого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока искомый эффект не будет достигнут. В общем, подходящей суточной дозой антитела по настоящему изобретению будет такое количество соединения, которое является самой низкой дозой, эффективной для достижения терапевтического эффекта. Введение может быть парентеральным, таким как внутривенное, внутримышечное или подкожное введение. В одном из воплощений антитела можно вводить путем инфузии в недельной дозе, рассчитанной в мг/м². Такие дозировки могут, например, основываться на дозировках мг/кг, указанных выше, в соответствии со следующим: доза (мг/кг) x 70: 1,8. Такое введение может повторяться, например, 1-8 раз, как например, 3-5 раз. Введение может осуществляться путем непрерывной инфузии в течение периода от 2 до 24 часов, например, от 2 до 12 часов. В одном воплощении антитела можно вводить путем медленной непрерывной инфузии в течение длительного периода, например, более 24 часов, для снижения токсических побочных эффектов.

В одном воплощении антитела можно вводить в недельной дозе, рассчитанной как фиксированная доза, до 8 раз, например, от 4 до 6 раз при введении один раз в неделю. Такой режим может повторяться один или несколько раз по необходимости, например, через 6 или 12 месяцев. Такие фиксированные дозировки могут, например, основываться на дозировках в мг/кг, указанных выше, с расчетной массой тела 70 кг. Дозировка может быть определена или скорректирована путем измерения количества антитела по настоящему изобретению в крови при введении, например, путем взятия биологического образца и использования антиидиотипических антител, которые нацелены на антигенсвязывающую область антигена 5T4 антител настоящего изобретения.

В одном воплощении антитела можно вводить в качестве поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение 6 месяцев или более.

Антитело также можно вводить профилактически, чтобы снизить риск развития онкологического заболевания, отсрочить наступление события при прогрессировании онкологического заболевания и/или снизить риск рецидива, когда онкологическое заболевание находится в стадии ремиссии.

Антитела по изобретению также можно вводить в составе комбинированной терапии, то есть в сочетании с другими терапевтическими агентами, относящимися к заболеванию или состоянию, которое необходимо лечить. Соответственно, в одном воплощении содержащее антитело лекарственное средство предназначено для комбинирования с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, такими как цитотоксический, химиотерапевтический или антиангиогенный агент.

Получение антител

В настоящем документе также предоставляется способ получения антитела, такого как биспецифическое антитело по изобретению. В частности, предоставляется способ получения антитела по изобретению, включающий стадии:

- a) культивирование клетки-хозяина, содержащей экспрессирующий вектор, как определено в данном документе; и
- b) и очистки указанного антитела из культуральной среды.

В воплощениях, где антитело включает область связывания, способную связываться с 5T4, и область связывания, способную связываться с CD3, антитело может быть получено с использованием способа, включающего стадии:

- a) Обеспечения антитела, способного связываться с 5T4, путем культивирования клетки-хозяина, включающей экспрессирующий вектор, как определено в данном документе, в условиях, допускающих экспрессию антитела, способного связываться с 5T4, и очистки антитела, способного связываться с 5T4, из культуральной среды;

- b) Обеспечения антитела, способного связываться с CD3, путем культивирования клетки-хозяина, включающей экспрессирующий вектор, содержащий

I) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в данном документе выше; и

II) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в данном документе выше;

в условиях, позволяющих экспрессию антитела, способного связываться с CD3, и

очистки антитела, способного связываться с CD3, из культуральной среды;

c) инкубирования указанного антитела, способного связываться с 5T4, вместе с указанным антителом, способным связываться с CD3, в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы позволить цистеинам в шарнирной области подвергнуться изомеризации дисульфидной связи, и

d) получения указанного антитела.

Наборы

В изобретении также предлагается набор, включающий антитело, как описано выше, например, набор для применения в качестве сопутствующей диагностики/для идентификации среди популяции пациентов тех пациентов, которые имеют склонность отвечать на лечение антителом, как определено в данном документе выше, или иммуноконъюгат, или конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), как определено в данном документе выше, или для прогнозирования эффективности или противоопухолевой активности указанного антитела, или иммуноконъюгата, или ADC при использовании в лечении пациента, набор включает антитело, как определено выше; и инструкции по применению указанного набора.

Антиидиотипические антитела

В дополнительном аспекте изобретение относится к антиидиотипическому антителу, которое связывается с антителом, включающим, по меньшей мере, одну антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4, то есть антителу согласно изобретению, как описано в данном документе. В конкретных воплощениях антиидиотипическое антитело связывается с антигенсвязывающей областью, способной связываться с 5T4.

«Антиидиотипическое» (Id) антитело представляет собой антитело, которое распознает уникальные детерминанты, как правило, ассоциированные с антигенсвязывающим сайтом антитела. Анти-id антитело может быть получено путем иммунизации животного того же вида и генетического типа, что и источник моноклонального антитела против 5T4, моноклональным антителом, против которого получают анти-Id. Иммунизированное животное как правило распознает и отвечает на идиотипические детерминанты иммунизированного антитела выработкой антитела к этим идиотипическим детерминантам (анти-id антитело). Такие антитела описаны, например, в US 4 699 880. Такие антитела являются дополнительными признаками настоящего изобретения.

Анти-id антитела также могут быть использованы в качестве «иммуногена» для индукции иммунного ответа в другом животном, для выработки так называемого анти-

анти-id антитела. Анти-анти-Id-антитело может быть эпитопно идентичным исходному моноклональному антителу, которое индуцировало анти-Id-антитело. Таким образом, используя антитела к идиотипическим детерминантам моноклонального антитела, можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела с идентичной специфичностью. Анти-Id-антитела можно варьировать (тем самым продуцируя варианты анти-Id антител) и/или дериватизировать с помощью любого подходящего метода, такого как те, которые описаны в другом месте в настоящем документе в отношении 5T4-специфических антител по настоящему изобретению. Например, моноклональное анти-Id-антитело может быть связано с носителем, таким как гемоцианин лимфы улитки (KLH), и использоваться для иммунизации мышей BALB/c. Сыворотка этих мышей обычно будет содержать анти-анти-Id антитела, которые обладают связывающими свойствами, подобными, если не идентичными, исходным/родительским анти-5T4-антителам.

Последовательности

SEQ NO:	ID	Название	Домен	Последовательность
1		5T4 человека	ORF	<u>MPGGCSRGPAAAGDGRRLRLARLALVLLG</u> WVSSSSPTSSASSFSSAPFLASAVSAQPP LPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLTEV PTDLPAYVRNLFLTGNQLAVLPAGAFAR RPPLAELAALNLSGSRLEVRAGAFEHLP SLRQLDLSHNPLADLSPFAFSGSNASVSA PSPLVELILNHIVPPEDERQNRSFEGMVV AALLAGRALQGLRRLELASNHFLYLPRD VLAQLPSLRHLDLSNNSLVSLTYVSFRNL THLESLHLEDNALKVLHNGTLAELQGLP HIRVFLDNNPWVCDCHMADMVTWLKET EVVQGKDRLTCAYPEKMRNRVLLELNS ADLDCDPILPPSLQTSYVFLGIVLALIGAIF LLVLYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHME GYHYRYEINADPRLTNLSSNSDV
2		5T4 яванского макака	ORF	<u>MPGGCSRGPAAAGDGRRLRLARLALVLLG</u> WVSSSSSTSSASSSSSSAPFLASAASAQPP LPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLTEV PTDLPYVRNLFLTGNQLAVLPAGAFAR RPPLAELAALNLSGSRLEVRGGAFEHLP SLRQLDLSHNPLAYLSPFAFSGSNASISAP SPLVELILNHIVPPDDKRQNRSFEGMVAA ALVAGRALQGLHLELASNHFLYLPRDV LAQLPSLRYLDLSNNSLVSLTYVSFRNL HLESLHLEDNALKVLHNGTLAELQGLPH VRVFLDNNPWVCDCHMADMVTWLKQT GVVQGKDRLTCAFPEKMRNRVLLELNSA DLDCDPILPPSLQTSYVFLGIVLALIGAIFL LVLYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEG YHYRYEINADPRLTNLSSNSDV

3	5T4 курицы	ORF	<u>MPGRE</u> AERRGALCLGLLHALLGCGSAQ PPAACPAPECSEAAKTVKCVNKNLTEV PPDLPPYVRNLFITGNRLGRLPAGALSAP RLAELGSLNLSGNHLRAVEAGALAALPA LRQLDLGGNPLAELSPLAFGRASPLEELA LRGALREQGALLGLADLLQAGALRNLSR LELADNGLLLLPTGMLGALPALRHLDLS NNSLVGLRNVSFQGLVRLQSLNLSDNSL GVLNRGTLAQWRGLPALRRISLSHNTWV CDCAIEDMVAWLKESDQVEGKEALSCAF PEKMAGRALLKLNTSELNCSAPVDVPSQ LQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLYLNRKGI KKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINAD PRLTNLSSNSDV
4	зрелый CD3ε (эпсилон) человека	Зрелый белок	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCP QYPGSEILWQHNDKNIGGEDDDKNIGSD EDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPED ANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVI VDICITGGLLLL VYYWSKNRKA KAKPVT RGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDIYEP RK GQRDL YSGLNQ RRI
5	HC_5T4-059	VH	<u>QVQLVES</u> GGGVVQGRSLRLSCAVSGFT <u>FSSYDMN</u> WVRQAPGKGLEWVTFISYDGS <u>NKYNADS</u> VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN <u>SLRAEDT</u> AVYYC <u>ARDSYSRSWYGDYYG</u> <u>MDVWGQGT</u> TVTVSS
6	HC_5T4-059	VH_CD R1	GFTFSSYD
7	HC_5T4-059	VH_CD R2	ISYDGSNK
8	HC_5T4-059	VH_CD R3	ARDSYSRSWYGDYYGMDV
9	LC_5T4-059	VL	<u>DIQMTQSP</u> SSLSASVGDRVITICRASQGIS <u>SWLAWYQ</u> QKPEKAPKSLIY <u>AASSLQSGV</u> <u>PSRFSGSG</u> SGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYNSYPL</u> TFGGG TKVEIK
10	LC_5T4-059	VL_CDR 1	QGISSW
	LC_5T4-059	VL_CDR 2	AAS
11	LC_5T4-059	VL_CDR 3	QQYNSYPLT
12	HC_5T4-076	VH	<u>QVQLVQSG</u> AEVKKPGASVKVSKASGY <u>TFTSYGIS</u> WVRQAPGQGLEWMGWISAY <u>NGNTNYA</u> QKLQGRVTMTTDTSTRAYM <u>ELRSLRSD</u> DTAVYYC <u>ARDPGYFDWLYG</u> <u>DYWGQGT</u> LVTVSS
13	HC_5T4-076	VH_CD R1	GYTFTSYG
14	HC_5T4-076	VH_CD R2	ISAYNGNT

15	HC_5T4-076	VH_CD R3	ARDPGYFDWLYGDY
16	LC_5T4-076	VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS <u>SALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGV</u> PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQFNSYPRTFGQGTKVEIK
17	LC_5T4-076	VL_CDR 1	QGISSA
	LC_5T4-076	VL_CDR 2	DAS
18	LC_5T4-076	VL_CDR 3	QQFNSYPRT
19	HC_5T4-085	VH	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS</u> <u>TYNADSVKGRFTIFRDNSKNTLYLHMNS</u> LRAEDTAVYYC <u>ARDPGYNNVEYLDHWG</u> QGTLVTVSS
20	HC_5T4-085	VH_CD R1	GFTFSSYA
21	HC_5T4-085	VH_CD R2	ISGSGGST
22	HC_5T4-085	VH_CD R3	ARDPGYNNVEYLDH
23	LC_5T4-085	VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS <u>SALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGV</u> PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQFNSYPLTFGGGGTKVEIK
24	LC_5T4-085	VL_CDR 1	QGISSA
	LC_5T4-085	VL_CDR 2	DAS
25	LC_5T4-085	VL_CDR 3	QQFNSYPLT
26	HC_5T4-106	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRF <u>TSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDS</u> <u>DARYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSS</u> LKASDTGMYYC <u>ARSVLFDYWGQGT</u> LVTVSS
27	HC_5T4-106	VH_CD R1	GYRFTSYW
28	HC_5T4-106	VH_CD R2	IYPGDSDA
29	HC_5T4-106	VH_CD R3	ARSVLFDY
30	LC_5T4-106	VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS <u>SALAWYQQKPGKAPKLLIYDVSNLESGV</u> PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQFNSYPHTFGQGTKLEIK
31	LC_5T4-106	VL_CDR 1	QGISSA
	LC_5T4-106	VL_CDR 2	DVS

32	LC_5T4-106	VL_CDR 3	QQFNSYPHT
33	HC_5T4-127	VH	<u>EVQLLESRGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF</u> <u>SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGS</u> <u>IYYADSVKGRFTISRDNSSKTLYLQMNS</u> <u>LRAEDTAVYYCAKDWGSGSYPAEYFQH</u> <u>WGQGTLLTVSS</u>
34	HC_5T4-127	VH_CD R1	GFTFSSYA
35	HC_5T4-127	VH_CD R2	ISGSGGST
36	HC_5T4-127	VH_CD R3	AKDWGSGSYPAEYFQH
37	LC_5T4-127	VL	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS</u> <u>SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI</u> <u>PARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC</u> <u>QQRSNWLMYTFGQGTKLEIK</u>
38	LC_5T4-127	VL_CDR 1	QSVSSY
	LC_5T4-127	VL_CDR 2	DAS
39	LC_5T4-127	VL_CDR 3	QQRSNWLMYT
40	HC_5T4-207	VH	<u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGG</u> <u>ESGYYWTWIRQPPGKGLEWIGEIDHSEST</u> <u>NYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT</u> <u>AADTAVYYCAGWFGELYHYYYGMDVW</u> <u>GQGTTVTVSS</u>
41	HC_5T4-207	VH_CD R1	GGSFSGYY
42	HC_5T4-207	VH_CD R2	IDHSEST
43	HC_5T4-207	VH_CD R3	AGWFGELYHYYYGMDV
44	LC_5T4-207	VL	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS</u> <u>SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGI</u> <u>PARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC</u> <u>QQRSNWPLTFGGGGTKVEIK</u>
45	LC_5T4-207	VL_CDR 1	QSVSSY
	LC_5T4-207	VL_CDR 2	DAS
46	LC_5T4-207	VL_CDR 3	QQRSNWPLT
47	HC_5T4-226	VH	<u>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGG</u> <u>ESGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIDHSGST</u> <u>NYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT</u> <u>AADTAVYYCAAWFGEWDYYYGMDV</u> <u>WGQGTTVTVSS</u>
48	HC_5T4-226	VH_CD R1	GGSFSGYY

49	HC_5T4-226	VH_CD R2	IDHSGST
50	HC_5T4-226	VH_CD R3	AAWFGELWDYYYGMDV
51	LC_5T4-226	VL	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS</u> <u>SFLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP</u> <u>ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ</u> <u>QRSNWPLTFGQGTRLEIK</u>
52	LC_5T4-226	VL_CDR 1	QSVSSF
	LC_5T4-226	VL_CDR 2	DAS
53	LC_5T4-226	VL_CDR 3	QQRSNWPLT
54	VH_huCD3- H1L1_CDR1	VH_CD R1	GFTFNTYA
55	VH_huCD3- H1L1_CDR2	VH_CD R2	IRSKYNNYAT
56	VH_huCD3- H1L1_CDR3	VH_CD R3	VRHGNFGNSYVSWFAY
57	VH_huCD3- H1L1	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGTLLTVSS
58	VL_huCD3- H1L1_CDR1	VL_CDR 1	TGAVTTSNY
	VL_huCD3- H1L1_CDR2	VL_CDR 2	GTN
59	VL_huCD3- H1L1_CDR3	VL_CDR 3	ALWYSNLWV
60	VL_huCD3- H1L1	VL	<u>QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAV</u> <u>TTSNYANWVQQTPGQAFRGLIGGTNKRA</u> <u>PGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESI</u> <u>YFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL</u>
61	VH CDR1- T31P HC_T31P CDR1	VH_CD R1	GFTFNPYA
62	VH T31P полноразмерн ая последователь ность HC_T31P	VH	<u>EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF</u> <u>NPYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN</u> <u>NYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ</u> <u>MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS</u> <u>WFAYWGQGTLLTVSS</u>
63	VH CDR1- T31M HC_T31M CDR1	VH_CD R1	GFTFNMYA

64	VH T31M полноразмерная последовательность HC_T31M	VH	<u>EVKLVESGGGLVQP</u> <u>GGSLRLSCAASGFTF</u> <u>NMYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY</u> NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYL QMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGTLVTVSS
65	VH CDR2- N57E HC_N57E CDR2	VH_CD R2	IRSKYNEYAT
66	VH N57E полноразмерная последовательность HC_N57E	VH	<u>EVKLVESGGGLVQP</u> <u>GGSLRLSCAASGFTF</u> NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN <u>EYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ</u> MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGTLVTVSS
67	VH_huCD3- H1L1- H101G_CDR3 HC_H101G CDR3	VH_CD R3	VRGGNFGNSYVSWFAY
68	VH_huCD3- H1L1-H101G HC_H101G	VH	<u>EVKLVESGGGLVQP</u> <u>GGSLRLSCAASGFTF</u> NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRGGNFGNSYVS <u>WFAYWGQGTLVTVSS</u>
69	VH CDR3- H101N HC_H101N CDR3	VH_CD R3	VRNGNFGNSYVSWFAY
70	VH H101N полноразмерная последовательность HC_H101N	VH	<u>EVKLVESGGGLVQP</u> <u>GGSLRLSCAASGFTF</u> NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRNGNFGNSYVS <u>WFAYWGQGTLVTVSS</u>
71	VH CDR3- G105P HC_G105P CDR3	VH_CD R3	 VRHGNFPNSYVSWFAY
72	VH G105P полноразмерная последовательность HC_G105P	VH	<u>EVKLVESGGGLVQP</u> <u>GGSLRLSCAASGFTF</u> NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFPNSYVSW <u>FAYWGQGTLVTVSS</u>
73	VH CDR3- S110A HC_S110A CDR3	VH_CD R3	VRHGNFGNSYVAWFAY

74	VH S110A полноразмерная последовательность HC_S110A	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVA <u>WFAYWGQGTLVTVSS</u>
75	VH CDR3-S110G HC_S110G CDR3	VH_CD R3	VRHGNFGNSYVGWFAY
76	VH S110G полноразмерная последовательность HC_S110G	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVG <u>WFAYWGQGTLVTVSS</u>
77	VH CDR3-Y114V HC_Y114V CDR3	VH_CD R3	VRHGNFGNSYVSWFAV
78	VH Y114V полноразмерная последовательность HC_Y114V	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS <u>WFAYWGQGTLVTVSS</u>
79	VH CDR3-Y114M HC_Y114M CDR3	VH_CD R3	VRHGNFGNSYVSWFAM
80	VH Y114M полноразмерная последовательность HC_Y114M	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS <u>WFAMWGQGTLVTVSS</u>
81	VH CDR3-Y114R HC_Y114R CDR3	VH_CD R3	VRHGNFGNSYVSWFAR
82	VH Y114R полноразмерная последовательность HC_Y114R	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS <u>WFARWGQGTLVTVSS</u>
83	HC_5T4-A1	VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTF <u>TNFGMNWVKQGPGEGLKWMGWINTNT</u> <u>GEPRYAEFEKGRFAFSLETTASTAYLQIN</u> NLKNEDTATYFC <u>ARDWDGAYFFDYWGQ</u> GTTLTVSS

84	LC_5T4-A1	VL	<u>SIVMTQTPKFL</u> VSAGDRV <u>TITCKASQSV</u> <u>SNDVAWYQQKPGQSPKLLINFATNRYTG</u> VPNRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLALY <u>FCQQDYSSPWTFGGG</u> TKLEIK
85	HC_5T4-A3	VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFT <u>FNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKS</u> <u>NNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYL</u> <u>QMNNLKTEDTAMYVCVRQWDYDVRAM</u> <u>NYWGQGTSTVTVSS</u>
86	LC_5T4-A3	VL	DIVMTQSHIFMSTSVGDRV <u>SITCKASQDV</u> <u>DTAVAWYQQKPGQSPKLLIWASTRLTG</u> VPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADY <u>FCQQYSSYPYTFGGG</u> TKLEIK
87	HC_5T4-H8	VH	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSE <u>TGYMHVVKQSHGKSLEWIGRINPNNG</u> <u>VTLYNQKFKD KAILTVDKSSTTAYMELR</u> <u>SLTSEDSAVYYCARSTMITNYVMDYWG</u> <u>QVTSVTVSS</u>
88	LC_5T4-H8	VL	SIVMTQTPTFLLVSAGDRV <u>TITCKASQSV</u> <u>SNDVAWYQQKPGQSP</u> TLISY <u>TSSRYAG</u> VPDRFIGSGYGTDFTFTISTLQAEDLAVYF <u>CQQDYNSPPTFGGG</u> TKLEIK
89	IgG1-Fc	Констан тный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
90	IgG1- Fc_F405L	Констан тный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF LLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

91	IgG1-Fc_FEA	Констан тный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
92	IgG1- Fc_FEAL	Констан тный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
93	IgG1- Fc_FEAR	Констан тный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
94	IgG1- Fc_K409R	Констан тный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
95	Каппа	Констан тный	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

96	Лямбда	Констан тный	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT PSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
97	b12_VH	VH	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGY</u> <u>RFSNFIHWVRQAPGQRFWMGWINPY</u> <u>NGNKEFSAKFQDRVTFTADTSANTAYME</u> <u>LRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQD</u> <u>NYYMDVWGKGTTIVVSS</u>
98	b12_VL	VL	<u>EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSHISRS</u> <u>RRVAWYQHKPGQAPRLVIHGVSNRASGI</u> <u>SDRFGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYC</u> <u>QVYGASSYTFGQGTKLERK</u>
99	5T4ECDHis	ORF	<u>MPGGCSRGAAGDGRRLRLARLALVLLG</u> <u>WVSSSSPTSSASSFSSAPFLASAVSAQPP</u> <u>LPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLTEV</u> <u>PTDLPAYVRNLFLTGNQLAVLPAGAFAR</u> <u>RPPLAEL AALNLSGSRLDEVRAFAEHL</u> <u>SLRQLDL SHNPLADLSPFAFGSNASVSA</u> <u>PSPLVELILNHIVPPEDERQNRSEGMVV</u> <u>AALLAGRALQGLRRLELASNHFLYLPRD</u> <u>VLAQLPSLRHLDLSNNSLVSLTYVSFRNL</u> <u>THLESLHLEDNALKVLHNGTLAELQLP</u> <u>HIRVFLDNNPWVCDCHMADMVTWLKET</u> <u>EVVQGKDRLTCAYPEKMRNRVLLELNS</u> <u>ADLDCDPIPPSLQTSHHHHHHHH</u>
100	5T4ECD91- FcRbHis	ORF	<u>MPGGCSRGAAGDGRRLRLARLALVLLG</u> <u>WVSSSSPTSSASSFSSAPFLASAVSAQPP</u> <u>LPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLTEV</u> <u>PTDLP AAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFP</u> <u>PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPE</u> <u>VQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIR</u> <u>VVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALP</u> <u>APIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELS</u> <u>SRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAE</u> <u>DNYKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSE</u> <u>WQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRS</u> <u>PGKHHHHHHHH</u>
101	CD3E27-GSKa	ORF	<u>MWWRLWWLLLLLLLLLWPMVWAQDGN</u> <u>EEMGGITQTPYKVSISGTTVILTGGGGSG</u> <u>GGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERAT</u> <u>LSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLI</u> <u>YDASN RATGIPARFSGSGTDFTLTISSL</u> <u>EPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGRLEIK</u> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL</u> <u>NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV</u> <u>TEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKV</u> <u>YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE</u>
102	HC_574-059 HC_5T4-207 HC_5T4-226	VH- CDR3 C- конц.	YYGMDV

103	HC_5T4-207 HC_5T4-226	VH- CDR-2	IDHSX ₁ ST; X ₁ представляет собой G или E
104	HC_5T4-207 HC_5T4-226	VH- CDR-3	AX ₂ WFGELX ₃ X ₄ YYYGMDV; X ₂ представляет собой A или G, X ₃ представляет собой W или Y, X ₄ представляет собой D или H
105	HC_5T4-207 HC_5T4-226	VL- CDR-1	QSVSSX ₅ ; X ₅ представляет собой Y или F

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны толковаться как ограничивающие.

Примеры

Пример 1 - Получение антител 5T4 и материалов для скрининга

Экспрессирующие конструкции для 5T4

Были созданы следующие конструкции с оптимизированными кодонами для экспрессии различных полноразмерных вариантов 5T4: 5T4 человека (*Homo sapiens*) (учетный номер Uniprot Q13641), 5T4 яванского макака (*Macaca fascicularis*) (учетный номер Uniprot. Q4R8Y9) и 5T4 курицы (*Gallus gallus*) (учетный номер Uniprot. R4GM46). Кроме того, были созданы следующие конструкции с оптимизированными кодонами для различных вариантов внеклеточного домена 5T4 (ECD): ECD 5T4 человека (ак 1-355 из учетного номера Uniprot No. Q13641) с С-концевой His-меткой (5T4ECDHis) (SEQ ID NO: 99) и ECD 5T4 человека (ак 1-91), слитого с доменом Fc кролика и С-концевой His-меткой (5T4ECD91-FcRbHis). В SEQ ID NO: 99 аминокислотные остатки 1-31 представляют собой сигнальный пептид; следовательно, зрелый белок 5T4ECDHis соответствует аминокислотным остаткам 32-363 из SEQ ID NO: 99. Аналогичным образом, аминокислотные остатки 1-31 SEQ ID NO: 100 представляют собой сигнальный пептид, а зрелый белок 5T4ECD91-FcRbHis соответствует аминокислотным остаткам 32-327 из SEQ ID NO: 100.

Конструкции содержали подходящие сайты рестрикции для клонирования и оптимальную последовательность Козак (GCCGCCACC) (Kozak, M., Gene 1999; 234 (2): 187-208). Полноразмерные оптимизированные по кодонам конструкции 5T4 человека и 5T4 яванского макака клонировали в экспрессирующем векторе млекопитающих pcDNA3.3 (Invitrogen). Полноразмерные кодон-оптимизированные конструкции 5T4 курицы клонировали в pSB, векторе, экспрессирующем в млекопитающих, содержащем концевые инверторные повторы Sleeping Beauty, фланкирующие кассету экспрессии, состоящую из промотора CMV и сигнала полиА HSV-TK.

Получение клеточных линий HEK-293F, транзитивно экспрессирующих полноразмерные 5T4 человека, яванского макака или курицы

Клетки Freestyle™ 293-F (субклон НЕК-293, адаптированный к суспензионному росту и химически определенной среде Freestyle [НЕК-293F]) получали в Invitrogen (кат. № R790-07) и трансфицировали конструкциями с оптимизированными кодонами, описанными выше, с использованием 293fectin (Invitrogen, кат. № 12347-019) в соответствии с инструкциями производителя.

Очистка His-меченного 5T4

5T4ECDHis (зрелый белок SEQ ID NO: 99) экспрессировали в клетках НЕК-293F, как описано выше. 5T4ECD91-FcRbHis экспрессировали с использованием платформы экспрессии Expi293F (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США, кат. № A14527) в основном так, как описано производителем.

His-tag позволяет проводить очистку с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом. В этом процессе хелатор, закрепленный на хроматографической смоле, заряжается катионами Co^{2+} . Надосадочные жидкости, содержащие His-меченый белок, инкубировали со смолой в периодическом режиме (т.е. в растворе). Белок, меченный His, прочно связывается с гранулами смолы, в то время как другие белки, присутствующие в надосадочной жидкости культуры, не связываются или связываются слабо по сравнению с белками, меченными His. После инкубации гранулы извлекали из надосадочной жидкости и помещали в колонку. Колонку промывали для удаления слабосвязанных белков. Затем прочно связанные His-меченые белки элюировали буфером, содержащим имидазол, который конкурирует за связывание His с Co^{2+} . Элюент удаляли заменой буфера на обессоливающей колонке.

Иммунизация

Для получения антител IgG1-5T4-207 и IgG1-5T4-226 трансгенных мышей HCo17-BalbC (Bristol-Myers Squibb, Нью-Йорк, Нью-Йорк, США) иммунизировали попеременно внутрибрюшинно (IP) и подкожно (SC) 20 мкг белок 5T4ECDHis в адьювантной системе Sigma (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США, кат. № S6322) с интервалом 14 дней. Всего было проведено 8 иммунизаций: 4 IP и 4 SC.

Для выработки антител IgG1-5T4-076 и IgG1-5T4-059, трансгенных мышей HCo12-BalbC (IgG1-5T4-076) и HCo20-BalbC (IgG1-5T4-059) (Bristol-Myers Squibb) попеременно иммунизировали IP и ПК с 20 мкг белка 5T4ECDHis в адьювантной системе Sigma с интервалом 14 дней. Всего было проведено 8 иммунизаций: 4 IP и 4 SC.

Для получения антитела IgG1-5T4-085 трансгенных мышей HCo17-BalbC иммунизировали попеременно IP и SC 20 мкг белка 5T4ECDHis и 20 мкг зрелого белка 5T4ECD91-FcRbHis в адьювантной системе Sigma с интервалом 14 дней. Всего было проведено 8 иммунизаций: 4 IP и 4 SC.

Для генерации антител IgG1-5T4-106 и IgG1-5T4-127, HCo12-BalbC (IgG1-5T4-106) и HCo17-BalbC (IgG1-5T4-127) трансгенных мышей иммунизировали попеременно IP и SC 20 мкг 5T4ECD91-FcRbH - зрелый белок в адъювантной системе Sigma с интервалом 14 дней. Всего было проведено 8 иммунизаций: 4 IP и 4 SC.

Мышей, по меньшей мере, с двумя последовательными титрами специфических антител к 5T4 в технологии антиген-специфического скрининга Fluorometric Micro Volume Assay Technology (FMAT), как описано ниже, бустировали 10 мкг 5T4ECDHis или 10 мкг 5T4ECD91-FcRbHis (в PBS, введенном внутривенно) и спленоциты и клетки лимфоузлов этих мышей сливали через 3-4 дня.

Гомогенный антиген-специфический скрининг-анализ

Присутствие антител 5T4 в сыворотке иммунизированных мышей или в надосадочной жидкости культуры гибридомы или трансфектомы HuMAb (человеческое моноклональное антитело) определяли с помощью анализов гомогенного антиген-специфического скрининга с использованием FMAT (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США). Для этого использовалась комбинация 4 клеточных анализов.

Сыворотку от иммунизированных мышей или образцы надосадочной жидкости культуры гибридомы или трансфектомы анализировали на связывание человеческих антител с клетками НЕК-293F, транзиторно экспрессирующими 5T4 человека, клетками НЕК-293F, транзиторно экспрессирующими 5T4 яванского макака, покрытыми стрептавидином частицами полистирола (0,5% масс./об.; 6,7 мкм; SpheroTech, Лейк-Форест, Иллинойс, США, кат. № SVP-60-5), покрытыми 5T4ECD91-FcRBHis, и клетками дикого типа НЕК-293 (отрицательный контроль).

Образцы добавляли к клеткам для связывания с 5T4. Впоследствии связывание HuMAb детектировали с использованием флуоресцентного конъюгата (AffiniPure Goat Anti-Human IgG Fc gamma-Alexa Fluor® 647; Jackson ImmunoResearch, кат. 109-605-098). IgG1-5T4-H8-F405L использовали в качестве положительного контроля, а IgG человека ChromPure, цельную молекулу (Jackson ImmunoResearch, кат. 009-000-003) использовали в качестве отрицательного контроля. Образцы сканировали с использованием ImageXpress Velos (Molecular devices, LLC, Саннивейл, Калифорния, США), и для считывания использовали общую флуоресценцию. Образцы признавали положительными, если количество импульсов было выше 50 и количество импульсов x флуоресценция было, по меньшей мере, в три раза выше, чем у отрицательного контроля.

Получение гибридомы HuMAb

Мышей HuMAb с достаточным развитием антиген-специфического титра (описанным выше) умерщвляли и собирали селезенку и лимфатические узлы,

фланкирующие брюшную аорту и полую вену. Слияние спленоцитов и клеток лимфатических узлов с линией клеток миеломы мыши (клетки SP2.0) осуществляли путем электрослияния с использованием системы электрослияния CytoPulse CEEF 50 (Celectis, Париж, Франция), по существу, в соответствии с инструкциями производителя. Затем субклонировали антиген-положительные первичные лунки с использованием системы ClonePix (Genetix, Гемпшир, Великобритания). С этой целью специфические гибридомы с первичными лунками засеивали в полутвердую среду, состоящую из 40% CloneMedia (Genetix, Гемпшир, Великобритания) и 60% HyQ 2x полной среды (Hyclone, Уолтем, США). Субклоны повторно тестировали на связывание 5T4 в соответствии с анализом антиген-специфического связывания, как описано выше, и сканировали с использованием системы IsoCyte (Molecular Devices). Уровни IgG измеряли с использованием системы Octet (ForteBio, Менло-Парк, США), чтобы выбрать лучший продуцирующий клон на первичную лунку для дальнейшего размножения. Дальнейшее размножение и культивирование полученных гибридом HuMAb проводили на основе стандартных протоколов (например, как описано в Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006).

Анализ последовательности вариабельных доменов антитела 5T4 и клонирование в экспрессирующих векторах

Тотальную РНК получали из $2\text{--}5 \times 10^6$ клеток гибридомы, а 5'-RACE-комплементарную ДНК (кДНК) получали из 100 нг общей РНК, используя набор для амплификации кДНК SMART RACE (Clontech), в соответствии с инструкциями производителя. Кодрующие области VH и VL были амплифицированы с помощью ПЦР и клонированы непосредственно, в рамке считывания, в экспрессирующих векторах p33G1f и p33Карра (векторах на основе pcDNA3.3 с оптимизированными по кодонам IgG1m (f) человека и константными доменами каппа, соответственно) путем безлигазного клонирования (Aslanidis, C. and P.J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990;18(20): 6069-74). Вариабельные домены из этих экспрессирующих векторов секвенировали, и CDR аннотировали в соответствии с определениями IMGT (Lefranc MP. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999 и Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)). Клоны с правильной открытой рамкой считывания (ORF) экспрессировали и тестировали на связывание с антигеном. Ведущую панель заказывали в виде последовательностей с оптимизированными кодонами (GeneArt, Thermo Fisher Scientific) и получали с использованием системы экспрессии Expi293 в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Fisher Scientific). Антитела в этих надосадочных жидкостях очищали и использовали для функциональной характеристики. Последовательности

полученных ведущих клонов показаны в таблице выше.

Контрольные антитела 5Т4

В некоторых сравнительных примерах использовали антитела против 5Т4 (IgG1-5Т4-Н8, IgG1-5Т4-А3 и IgG1-5Т4-А1), которые были ранее описаны в WO2007/106744. Кодировующие последовательности антител с оптимизированными кодонами были синтезированы и клонированы в экспрессирующих векторах pCDNA3.3 (Thermo Fisher Scientific).

Антитело IgG1-b12

В некоторых примерах антитело b12, специфичное к HIV-1 gp120 (Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5; 230 (3): 812-23) использовали в качестве отрицательного контроля. Кодировующие последовательности антитела с оптимизированными кодонами для этого контрольного антитела и синтезировали и клонировали в экспрессирующие векторы pCDNA3.3 (Thermo Fisher Scientific). Последовательность области вариабельной тяжелой цепи (VH) и последовательность области вариабельной легкой цепи (VL) включены в настоящее описание как SEQ ID NO: 97 и 98, соответственно.

Пример 2 - Определение аффинности связывания специфических антител к 5Т4 с помощью биослойной интерферометрии

Аффинность антител 5Т4 к рекомбинантному белку 5Т4 определяли с использованием безмаркерной биослойной интерферометрии на приборе Octet HTX (ForteBio, Портсмут, Великобритания). Антитела 5Т4 (1 мкг/мл) иммобилизовали в течение 600 секунд на биосенсорах Capture против человеческого IgG Fc (ForteBio). После измерения исходного уровня (100 с) ассоциация (200 с) и диссоциация (1000 с) человеческого 5Т4ECDHis (зрелый белок с SEQ ID NO: 99) или рекомбинантного белка 5Т4 яванского макака (Cusabio; кат. № CSB-MP024093MOV) в разбавителе для образцов (ForteBio) определяли с использованием серии 2-кратных разведений (от 100 до 1,56 нМ), начиная с 3,58 мкг/мл (100 нМ) 5Т4ECDHis человека или 3,99 мкг/мл (100 нМ) 5Т4 яванского макака, при встряхивании 1000 об/мин при 30 °С. Данные проанализировали с помощью программного обеспечения Data Analysis v9.0.0.12 (ForteBio). Значения контрольных лунок, содержащих только разбавитель образца, во время стадий ассоциации и диссоциации вычитали из значений лунок, содержащих антиген, для каждого антитела отдельно. Ось Y выравнивали по последним 10 секундам исходного уровня, и применяли выравнивание с межшаговой коррекцией по диссоциации, а также фильтрация Савицкого-Голея. Ответы <0,05 нМ были исключены из анализа. Данные были подогнаны с использованием модели 1: 1 и глобального полного соответствия с временем ассоциации 200 с и временем диссоциации 1000 с или 50 с в качестве окна интереса. По умолчанию

использовали соответствие с полным временем диссоциации (1000 с) в качестве окна интереса. На основании значения R2 и визуального контроля соответствия время диссоциации 50 с было использовано в качестве окна интереса для IgG1-5T4-127-FEAR.

В таблице 1 показаны константа скорости ассоциации k_a (1/Ms), константа скорости диссоциации k_d (1/s) и константа равновесной диссоциации K_D (M) антител 5T4 к человеческому 5T4ECDHIs, определенные с помощью биослойной интерферометрии. Диапазон аффинностей антител к 5T4 человека измеряли в диапазоне от $1,3 \times 10^{-9}$ - $2,7 \times 10^{-8}$ M. Ответ IgG1-5T4-085-FEAR был ниже 0,05 нм, что не позволило правильно подобрать данные (низкие значения R2 для этих выравниваний). Более того, ответ IgG1-5T4-076-FEAR не мог быть аппроксимирован должным образом. Эти данные выделены курсивом.

В таблице 2 показаны константа скорости ассоциации k_a (1/Ms), константа скорости диссоциации k_d (1/s) и константа равновесной диссоциации K_D (M) для 5T4 яванского макака, определенные с помощью биослойной интерферометрии. Диапазон аффинностей антител к 5T4 яванского макака был измерен в диапазоне от $1,1 \times 10^{-9}$ до $4,1 \times 10^{-8}$ M. Ответы IgG1-5T4-085-FEAR, IgG1-5T4-106-FEAR и IgG1-5T4.-H8-FEAR были ниже 0,05 нм, что препятствовало правильной аппроксимации данных (низкие значения R2 для этих соответствий). Более того, ответ IgG1-5T4-076-FEAR не мог быть аппроксимирован должным образом. Эти данные выделены курсивом.

Таблица 1: Аффинность связывания моноспецифических бивалентных антител 5T4 с внеклеточным доменом 5T4 человека, определенная с помощью безмаркерной биослойной интерферометрии.

Антитело	Скорость ассоциации k_a (1/Ms)	Скорость диссоциации k_d (1/s)	K_D (M)
IgG1-5T4-059-FEAR	2,1E+05	3,2E-04	1,5E-09
<i>IgG1-5T4-076-FEAR</i>	<i>Не применимо</i>		
<i>IgG1-5T4-085-FEAR</i>	<i>Ответ < 0,05 нм</i>		
IgG1-5T4-106-FEAR	2,1E+05	1,2E-03	5,5E-09
IgG1-5T4-127-FEAR	5,8E+05	1,6E-02	2,7E-08
IgG1-5T4-207-FEAR	2,7E+05	6,8E-04	2,6E-09
IgG1-5T4-226-FEAR	3,3E+05	8,1E-04	2,5E-09
IgG1-5T4-H8-FEAR	2,2E+05	2,9E-04	1,3E-09

Таблица 2: Аффинность связывания моноспецифических двухвалентных антител 5Т4 с внеклеточным доменом 5Т4 яванского макака, определенная с помощью безмаркерной биослойной интерферометрии.

Антитело	Скорость ассоциации k_a (1/Ms)	Скорость диссоциации k_d (1/s)	K_D (M)
IgG1-5T4-059-FEAR	1,6E+05	2,8E-04	1,8E-09
IgG1-5T4-076-FEAR	Не применимо		
IgG1-5T4-085-FEAR	Ответ < 0,05 нм		
IgG1-5T4-106-FEAR	Ответ < 0,05 нм		
IgG1-5T4-127-FEAR	3,7E+05	1,5E-02	4,1E-08
IgG1-5T4-207-FEAR	1,4E+05	8,7E-04	6,3E-09
IgG1-5T4-226-FEAR	1,4E+05	1,5E-03	1,1E-08
IgG1-5T4-H8-FEAR	Ответ < 0,05 нм		

Пример 3 - Перекрестное блокирование антител 5Т4, определенное с помощью биослойной интерферометрии

Анализ перекрестного блокирования антител (анализ количественного определения связывания эпитопа) выполняли с использованием биослойной интерферометрии на приборе Octet HTX (ForteBio). Антитела 5Т4 (20 мкг/мл в 10 mM натрий-ацетатном буфере pH 6,0, ForteBio) иммобилизовали на аминореактивных биосенсорах 2-го поколения (AR2G) (ForteBio) в соответствии с инструкциями производителя. После измерения исходного уровня (100 с) в разбавителе образцов (ForteBio) биосенсоры, содержащие иммобилизованные антитела, загружали в течение 500 с 5Т4ECDHis человека (зрелый белок SEQ ID NO: 99) 100 нМ (3,6 мкг/мл). Затем определяли ответ ассоциации второго антитела 5Т4 (10 мкг/мл) в течение 500 с. Биосенсоры регенерировали трехкратным 5-секундным воздействием 10 mM глицина, pH 2,5, с последующим добавлением разбавителя образца, и измерение повторяли с новым набором вторых антител 5Т4, начиная с исходного этапа. Каждый биосенсор использовали четыре раза. Измерения проводили при 30°C с использованием шейкера со скоростью 1000 об/мин. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Data Analysis v9.0.0.12 (ForteBio). Ось Y совмещали со стадией ассоциации, и применяли фильтрацию Савицкого-Голея. Реакцию разбавителя образца на стадии ассоциации вычитали из реакции ассоциации второго антитела, чтобы скорректировать диссоциацию 5Т4ECDHis от иммобилизованного антитела. Скорректированные ответы ассоциации наносили на график в формате матрицы. В целом, ответы > 0,1 нм считались парами неблокирующих антител (белый цвет), а ответы между -0,1 и 0,1 нм считались парами блокирующих антител (темно-серый). Для некоторых пар антител второе антитело показало первоначальный положительный ответ, за которым последовало уменьшение сигнала. Это

считалось вытеснением антитела (светло-серый), то есть второе антитело вытесняет взаимодействие между первым антителом и антигеном (Abdiche YN, Yeung AY, Ni I, Stone D, Miles A, Morishige W, et al. (2017) Antibodies Targeting Closely Adjacent or Minimally Overlapping Epitopes Can Displace One Another. PLoS ONE 12(1): e0169535. doi:10.1371/journal.pone.0169535). В некоторых случаях кривые данных требовали визуального осмотра экспертом, чтобы присвоить парам антител свойства блокирования, неблокирования или вытеснения.

Эксперименты по перекрестному блокированию были выполнены для антител IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-076-FEAR, IgG1-5T4-085-FEAR, IgG1-5T4-106-FEAR, IgG1-5T4-127-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR и антител предшествующего уровня техники IgG1-5T4-H8-FEAR, IgG1-5T4-A1-F405L и IgG1-5T4-A3-F405L. Результаты представлены в таблице 3.

Ни одно из антител (кроме самого IgG1-5T4-A1-F405L) не блокировало связывание IgG1-5T4-A1-F405L с 5T4ECDHis. Антитела IgG1-5T4-076-FEAR, IgG1-5T4-085-FEAR, IgG1-5T4-127-FEAR, IgG1-5T4-106-FEAR, IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR (а также само IgG1-5T4-H8-FEAR) блокировали связывание IgG1-5T4-H8-FEAR с 5T4ECDHis. Антитела IgG1-5T4-076-FEAR, IgG1-5T4-085-FEAR и IgG1-5T4-127-FEAR (а также само IgG1-5T4-A3-F405L) также блокировали связывание IgG1-5T4-A3-F405L с 5T4ECDHis, тогда как антитела IgG1-5T4-106-FEAR и IgG1-5T4-H8-FEAR не блокировали связывание IgG1-5T4-A3-F405L с 5T4ECDHis. Антитела IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR показали вытеснение антител в комбинации с IgG1-5T4-A3-F405L, что более подробно описано в Примере 4.

Таблица 3: Перекрестное блокирование антител, определенное с помощью биослойной интерферометрии.

	A1	A3	076	085	127	106	H8	059	207	226
A1	-0,01	0,76	0,36	0,72	0,87	0,85	0,89	0,91	0,86	0,86
A3	0,69	0,01	0,00	0,00	0,01	0,57	0,50	*	*	*
076	0,04	0,00	-0,01	-0,02	-0,02	-0,02	0,00	-0,02	0,05	0,05
085	0,07	-0,01	-0,01	-0,01	0,00	-0,01	-0,01	-0,04	0,08	0,07
127	0,15	-0,01	-0,02	-0,01	-0,01	-0,01	-0,02	-0,05	0,16	0,16
106	0,79	0,56	-0,03	-0,04	-0,02	-0,02	-0,02	-0,03	-0,03	-0,02
H8	0,64	0,49	-0,02	-0,02	-0,01	-0,01	0,00	-0,02	-0,01	-0,01
059	0,96	*	0,00	-0,02	-0,10	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01
207	1,29	*	1,22	1,03	1,29	-0,01	-0,01	-0,02	-0,02	-0,02
226	1,56	*	1,47	1,35	1,51	-0,02	-0,01	-0,02	-0,02	-0,02

Первый столбец показывает иммобилизованные антитела, а первый ряд показывает антитела в растворе. Показаны откорректированные ответы ассоциации антител в растворе. Перекрестное блокирование антител обозначен темно-серым цветом, замещающие комбинации антител обозначены светло-серым цветом и звездочкой. Неблокирующие комбинации антител не помечены (прозрачный фон).

Пример 4 - Вытеснение антителом IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR в комбинации с IgG1-5T4-A3-F405L

Вытеснение антител было продемонстрировано с помощью биослойной интерферометрии на приборе Octet HTX (ForteBio). IgG1-5T4-A3-F405L (20 мкг/мл в 10 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 6,0, ForteBio) иммобилизовали на аминореактивных биосенсорах 2-го поколения (AR2G) (ForteBio) в соответствии с инструкциями производителя. После измерения исходного уровня (100 с) в разбавителе образцов (ForteBio) биосенсоры, содержащие иммобилизованные антитела IgG1-5T4-A3-F405L, нагружали в течение 500 с 5T4 человекаECDHis (зрелый белок SEQ ID NO: 99) 100 нМ (3,6 мкг/мл). Затем определяли ответ ассоциации второго антитела 5T4 (IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR или IgG1-5T4-226-FEAR; 10 мкг/мл) или разбавителя образца

(буферный контроль) для 500 с. Эксперимент проводили при 30 °C, используя шейкер со скоростью 1000 об/мин. Данные анализировали с использованием программного обеспечения для анализа данных v9.0.0.12 (ForteBio). Ответ буферного контроля вычитали из ответов вторых антител, чтобы скорректировать диссоциацию человеческого 5T4ECDHis от иммобилизованного IgG1-5T4-A3-F405L, ось Y выравнивали с этапом ассоциации и применяли фильтрацию Савицкого-Голея.

Как показано на Фигуре 1, IgG1-5T4-A3-F405L не демонстрировало связывания, что указывает на перекрестное блокирование (самоблокирование) с IgG1-5T4-A3-F405L. IgG1-5T4-H8-FEAR показало связывание с 5T4ECDHis и, следовательно, отсутствие перекрестного блокирования с IgG1-5T4-A3-F405L. IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR первоначально показали положительный ответ (что указывает на связывание с комплексом IgG1-5T4-A3-F405L-5T4ECDHis вместо перекрестного блокирования с IgG1 -5T4-A3-F405L), за которым следовало снижение ответа, которое упало ниже ответа самоблокировки IgG1-5T4-A3-F405L. Это демонстрирует потерю массы из комплекса IgG1-5T4-A3-F405L-5T4ECDHis, указывая на то, что IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR вызывают диссоциацию человеческого 5T4ECDHis от IgG1. -5T4-A3-F405L при связывании с комплексом. Этот феномен был описан как замещение антител и указывает на то, что эпитопы тесно прилегают или минимально перекрываются (Abdiche YN, Yeung AY, Ni I, Stone D, Miles A, Morishige W, et al. (2017) Antibodies Targeting Closely Adjacent or Minimally Overlapping Epitopes Can Displace One Another. PLoS ONE 12(1): e0169535. doi:10.1371/journal.pone.0169535)). Это указывает на то, что антитела IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR связываются с отдельным эпитопом на 5T4 по сравнению с IgG1-5T4-A3-F405L.

Пример 5 - Одновременное связывание антител 5T4 с мембраносвязанным 5T4, измеренное с помощью проточной цитометрии

Связывание антител IgG1-5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR с мембраносвязанным 5T4 в присутствии IgG1-5T4-A1-F405L и IgG1-5T4-A3-F405L оценивали с помощью проточной цитометрии. IgG1-5T4-H8-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR были конъюгированы с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки SK-OV-3 (50000 клеток на состояние), которые экспрессируют около 20000 молекул 5T4 на клетку, инкубировали со смесями 10 мкг/мл неконъюгированных антител 5T4 (IgG1-5T4-H8-FEAR, IgG1-5T4-A1-F405L, IgG1-5T4-A3-F405L, IgG1-b12, IgG1-5T4-207-FEAR или IgG1-5T4-226-FEAR) и 2 мкг/мл FITC-конъюгированных антител 5T4 (IgG1-5T4-H8-FEAR-

FITC, IgG1-5T4-207-FEAR-FITC и IgG1-5T4-226-FEAR-FITC). В таблице 4 представлен обзор протестированных комбинаций. После 30 мин инкубации при 4 °C клетки центрифугировали при 1200 об/мин в течение 5 мин и надосадочную жидкость отбрасывали. Клетки ресуспендировали в 100 мкл FACS-буфера с добавлением 1: 4000 Торго-3-йода (Molecular Probes). Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) сигнала FITC измеряли с помощью проточного цитометра (FACS Fortessa, BD Biosciences). Процент связывания рассчитывали по следующей формуле:

$$\frac{([MFI \text{ клеток с Ab-FITC и неконъюгированным Ab} - MFI \text{ клеток без Ab-FITC или неконъюгированного Ab}] * 100)}{}$$

(MFI клеток с Ab-FITC и изотипическим контролем - MFI клеток без Ab-FITC или неконъюгированного Ab)

На Фигуре 2 показано, что связывание IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC, IgG1-5T4-207-FEAR-FITC и IgG1-5T4-226-FEAR-FITC блокировалось в присутствии их неконъюгированного аналога. Однако связывание IgG1-5T4-207-FEAR-FITC и IgG1-5T4-226-FEAR-FITC с мембраносвязанным 5T4 все еще наблюдалось в присутствии неконъюгированных IgG1-5T4-A1-F405L, IgG1-5T4-A3-F405L или IgG1-b12, и было сопоставимо со связыванием IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC с мембраносвязанным 5T4 в присутствии неконъюгированных IgG1-5T4-A1-F405L, IgG1-5T4-A3-F405L или IgG1-b12. Это демонстрирует, что антитела IgG1-5T4-H8-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR связываются с отдельным эпитопом на 5T4 по сравнению с антителами IgG1-5T4-A1-F405L и IgG1-5T4-A3-F405L.

Таблица 4: Обзор комбинаций антител, используемых в эксперименте проточной цитометрии.

	FITC-меченное антитело (2 мкг/мл)	Неконъюгированное антитело (10 мкг/мл)
1	IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC	IgG1-5T4-H8-FEAR
2	IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC	IgG1-5T4-A3-F405L
3	IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC	IgG1-5T4-207-FEAR
4	IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC	IgG1-5T4-226-FEAR
5	IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC	IgG1-5T4-A1-F405L
6	IgG1-5T4-H8-FEAR-FITC	IgG1-b12
7	IgG1-5T4-207-FEAR-FITC	IgG1-5T4-H8-FEAR
8	IgG1-5T4-207-FEAR-FITC	IgG1-5T4-A3-F405L
9	IgG1-5T4-207-FEAR-FITC	IgG1-5T4-207-FEAR
10	IgG1-5T4-207-FEAR-FITC	IgG1-5T4-226-FEAR
11	IgG1-5T4-207-FEAR-FITC	IgG1-5T4-A1-F405L
12	IgG1-5T4-207-FEAR-FITC	IgG1-b12
13	IgG1-5T4-226-FEAR-FITC	IgG1-5T4-H8-FEAR
14	IgG1-5T4-226-FEAR-FITC	IgG1-5T4-A3-F405L
15	IgG1-5T4-226-FEAR-FITC	IgG1-5T4-207-FEAR

16	IgG1-5T4-226-FEAR-FITC	IgG1-5T4-226-FEAR
17	IgG1-5T4-226-FEAR-FITC	IgG1-5T4-A1-F405L
18	IgG1-5T4-226-FEAR-FITC	IgG1-b12

Пример 6 - Связывание антител 5T4 с клетками НЕК-293, трансфицированными человеческим или куриным 5T4

Связывание антител 5T4 с клетками НЕК-293, временно трансфицированными полноразмерным человеческим или куриным 5T4 (полученным, как описано в примере 1), анализировали с помощью проточной цитометрии. Клетки (5×10^4 клеток/лунку) инкубировали в полистирольных 96-луночных круглодонных планшетах (Greiner bio-one, кат. № 650180) с серийными разведениями антител 5T4 (диапазон от 0,01 до 10 мкг/мл с 3-кратными стадиями разведения) в 50 мкл PBS/0,1% BSA/0,02% азида (окрашивающий буфер) при 4 °C в течение 30 мин. После двукратной промывки в буфере для окрашивания клетки инкубировали в 50 мкл R-фикоэритрина (PE)-конъюгированного козьего F(ab')₂ против IgG человека (1: 500 в буфере для окрашивания; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, ПА, кат. № 109-116-098) при 4 °C в течение 30 мин. Клетки дважды промывали в буфере для окрашивания, ресуспендировали в 20 мкл буфера для окрашивания и анализировали на скрининге iQue (Intellicyt Corporation, США). Кривые связывания анализировали нелинейной регрессией (сигмоидальная доза-реакция с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

На Фигуре 3А показано дозозависимое связывание IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR, IgG1-5T4-059-FEAR и IgG1-5T4-A3-F405L с клетками НЕК-293, трансфицированными полноразмерным 5T4 человека. На Фигуре 3В показано, что хотя наблюдали дозозависимое связывание IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR с клетками НЕК-293, трансфицированными полноразмерным куриным 5T4, IgG1-5T4 -A3-F405L показало минимальное связывание с клетками НЕК-293, трансфицированными полноразмерным куриным 5T4. Антитело отрицательного контроля, IgG1-b12-K409R, не обнаруживало связывания с клетками НЕК-293, трансфицированными полноразмерным человеческим или куриным 5T4 в концентрации 10 мкг/мл.

Пример 7 - Способность интернализации антител 5T4 в опухолевых клетках

Были проведены эксперименты, чтобы охарактеризовать способность к интернализации моновалентных антител 5T4. Внутриклеточную доставку полезной нагрузки и результирующую цитотоксичность использовали для считывания интернализации антител 5T4 при связывании с мишенью. Биспецифические,

конъюгированные с токсином антитела, которые распознают 5T4 с одним Fab-плечом, в то же время узнавая нерелевантный антиген (HIV-1 gp120, который не экспрессируется на опухолевых клетках) с помощью второго Fab-плеча, были получены путем контролируемого обмена Fab-плеча неконъюгированных антител 5T4 с (HIV-1 gp120-специфическими) антителами IgG1-b12, которые были конъюгированы с агентом, разрушающим микротрубочки, дуостатином-3. Полученные биспецифические конъюгированные с дуостатином-3 антитела несут 1 молекулу токсина на антитело (соотношение лекарственное средство-антитело равно 1). Серийные разведения (0,00152-10 мкг/мл, 3-кратные) биспецифических антител, конъюгированных с дуостатином-3, которые моновалентно связывают 5T4, добавляли к MDA-MB-468 (линия клеток рака молочной железы, ATCC, клон HTB-132) или HCC1954 (линия клеток рака молочной железы, ATCC, клон CRL-2338), высеванные в 96-луночные планшеты для культивирования тканей с плоским дном (5000 клеток/лунку; Greiner-bio-one, Нидерланды, кат. № 655180). Клетки инкубировали в течение 5 дней при 37°C, после чего жизнеспособность клеток оценивали с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega, США, кат. № G7570) в соответствии с инструкциями производителя. Кривые цитотоксичности анализировали с использованием нелинейной регрессии (сигмоидальная доза-реакция с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

На фигуре 4 показана цитотоксическая способность биспецифических антител, конъюгированных с дуостатином-3, которые моновалентно связывают 5T4 в клетках MDA-MB-468 (A) или HCC1954 (B). BsIgG1-5T4-H8-FEARxb12-vcDuo3 обладал высокой способностью вызывать цитотоксичность, что указывает на эффективную способность антитела к интернализации. Напротив, bsIgG1-5T4-076-FEARxb12-vcDuo3, bsIgG1-5T4-085-FEARxb12-vcDuo3 и bsIgG1-5T4-127-FEARxb12-vcDuo3 не вызывают какой-либо цитотоксичности; Кривые доза-ответ были аналогичны кривым для несвязывающегося контрольного антитела IgG1-b12-vcDuo3. Это указывает на плохую интернализацию этих антител при связывании с мембраносвязанным 5T4. BsIgG1-5T4-059-FEARxb12-vcDuo3, bsIgG1-5T4-106-FEARxb12-vcDuo3, bsIgG1-5T4-207-FEARxb12-vcDuo3, и bsIgG1-5T4-226-FEARxb12-vcDuo3 индуцировали среднюю клеточную токсичность в обоих протестированных клеточных линиях, что указывает на то, что этих моновалентные эти моновалентные 5T4 антитела индуцировали интернализацию, но в меньшей степени, чем bsIgG1-5T4-H8-FEARxb12-vcDuo3.

Пример 8 - Гуманизированные антитела против CD3 для получения

биспецифических антител CD3x5T4

Получение гуманизированного антитела IgG1-huCD3-H1L1 описано в Примере 1 WO2015/001085. IgG1-huCD3-H1L1 обозначается в данном документе как «IgG1-huCD3». Антитело IgG1-huCD3-H1L1-FEAL является его вариантом с аминокислотными заменами в домене Fc, которые предотвращают взаимодействия с рецепторами IgG Fc (рецепторы Fc гамма [FcγR]) и комплементом, в дополнение к мутации, которая позволяет генерировать биспецифические антитела посредством контролируемой замены Fab-плеча: L234F, L235E, D265A и F405L, как описано в данном документе выше. Ранее было продемонстрировано, что эти мутации не влияют на целевое связывание антител, в которые они введены (см., например, US 2015/0337049).

Создание гуманизированного антитела IgG1-huCD3-H1L1-H101G описано в Примере 2 WO2017/009442. IgG1-huCD3-H1L1-H101G будет обозначаться как «IgG1-huCD3-H101G». Антитело IgG1-huCD3-H101G-FEAL является его вариантом с аминокислотными заменами L234F, L235E, D265A и F405L, как описано в данном документе выше.

Пример 9 - Определение аффинности связывания CD3 с использованием биослойной интерферометрии

Аффинность связывания выбранных антител против CD3, включая IgG1-huCD3 и IgG1-huCD3-H101G, определяли, как описано в Примере 7 WO2017/009442.

Вкратце, аффинность связывания выбранных антител CD3 в формате IgG1-huCD3-FEAL с рекомбинантным растворимым CD3ε (CD3E27-GSKa) (зрелый белок с SEQ ID NO: 101) определяли с помощью биослойной интерферометрии на ForteBio Octet HTX (ForteBio). Биосенсоры, основанные на принципе захвата антителами к Fc-фрагменту IgG человека (ForteBio, кат. № 18-5060) загружали в течение 600 с hlgG (1 мг/мл). После базового измерения (200 с) определяли ассоциацию (1000 с) и диссоциацию (2000 с) CD3E27-GSKa с использованием диапазона концентраций CD3E27-GSKa от 27,11 мкг/мл - 0,04 мкг/мл (1000 нМ - 1,4 нМ) с трехкратным разбавлением (разбавитель образца, ForteBio, кат. № 18-5028). Для расчетов использовали теоретическую молекулярную массу CD3E27-GSKa на основе аминокислотной последовательности, т.е. 27,11 кДа. Эксперименты проводились при встряхивании 1000 об/мин и температуре 30 °C. Каждое антитело тестировали как минимум в двух независимых экспериментах. Данные анализировали с помощью программного обеспечения ForteBio Data Analysis Software v8.1 с использованием модели 1: 1 и глобального полного соответствия с временем ассоциации 1000 с и временем диссоциации 100 с. Следы данных были скорректированы путем вычитания эталонной кривой (антитело на биосенсоре, измерение только с разбавителем

образца), ось Y была выровнена по последним 10 с базовой линии, и была применена межступенчатая коррекция, а также фильтрация Савицкого-Голея. Следы данных с ответом $<0,05$ нм были исключены из анализа.

В таблице 5 показаны константа скорости ассоциации k_a (1/Ms), константа скорости диссоциации k_d (1/s) и константа равновесной диссоциации K_D (M) для рекомбинантного CD3ε, определенные с помощью биослойной интерферометрии. IgG1-huCD3-FEAL показало относительно высокую (K_D : 15 нМ) аффинность связывания с рекомбинантным CD3ε по сравнению с IgG1-huCD3-H101G-FEAL (K_D : 638 нМ).

Таблица 5: Аффинность связывания моноспецифических двухвалентных антител к CD3 с рекомбинантным CD3ε, определенная с помощью безмаркерной биослойной интерферометрии

Антитело	Скорость ассоциации k_a (1/Mc)	Скорость диссоциации k_d (1/c)	K_D (нМ)
IgG1-huCD3-FEAL	2,7E+05	4,0E-03	15
IgG1-huCD3-H101G-FEAL	3,0E+04	2,0E-02	683

Пример 10 - Получение биспецифических антител с помощью 2-МЕА-индуцированного обмена Fab-плеча

Биспецифические антитела были получены *in vitro* с использованием технологии платформы DuoBody®, т.е. 2-МЕА-индуцированного обмена Fab-плеча, как описано в WO2011147986, WO2011131746 и WO2013060867 (Genmab) и Labrijn et al. (Labrijn et al., PNAS 2013, 110: 5145-50; Gramer et al., MAbs 2013, 5: 962- 973). Чтобы обеспечить получение биспецифических антител этим способом, были созданы молекулы IgG1, несущие единственную мутацию в домене CH3: в одном родительском антителе IgG1 мутацию F405L (т.е. антител CD3), в другом родительском антителе IgG1 - мутацию K409R (т.е. антител к 5T4 или контрольных, специфичных к HIV-1 gp120). В дополнение к этим мутациям родительские антитела IgG1 включали замены, которые приводят к тому, что домен Fc не может взаимодействовать с рецепторами Fc IgG (рецепторы Fc гамма) и комплементом: L234F, L235E, D265A (FEA).

Для создания биспецифических антител два родительских антитела смешивали в равных массовых количествах в буфере PBS (фосфатно-солевой буфер; 8,7 мМ HPO_4^{2-} , 1,8 мМ H_2PO_4^- , 163,9 мМ Na^+ , 140,3 мМ Cl^- , pH 7,4). 2-меркаптоэтиламин-HCl (2-МЕА) добавляли до конечной концентрации 75 мМ и реакционную смесь инкубировали при 31 °C в течение 5 часов. 2-МЕА удаляли диализом в буфер PBS с использованием кассет Slide-A-Lyzer с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя, чтобы обеспечить повторное окисление

межцепочечных дисульфидных связей и образование интактных биспецифических антител.

В примерах были использованы следующие антитела:

CD3 антитела

IgG1-huCD3-FEAL (имеющее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 60).

IgG1-huCD3-H101G-FEAL (имеющее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 60)

5T4 антитела

IgG1-5T4-207-FEAR (имеющее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 44)

IgG1-5T4-226-FEAR (имеющее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 51)

IgG1-5T4-059-FEAR (имеющее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9)

IgG1-5T4-076-FEAR (имеющее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 16)

IgG1-5T4-085-FEAR (имеющее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 23)

IgG1-5T4-106-FEAR (имеющее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 30)

IgG1-5T4-127-FEAR (имеющее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 37)

IgG1-5T4-H8-FEAR (на основе 5T4 антитела H8 от Wyeth (WO 2007/106744 и US2010/0173382); имеющее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 88)

IgG1-5T4-A1-F405L (на основе антитела A1 5T4 от Wyeth (WO 2007/106744 и US8044178); имеющее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 84)

IgG1-5T4-A1-FEAR (на основе антитела A1 5T4 от Wyeth (WO 2007/106744 и US8044178); имеющее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 84)

IgG1-5T4-A3-F405L (на основе антитела A3 5T4 от Wyeth (WO 2007/106744 и US8759495); имеющее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 86)

IgG1-5T4-A3-FEAR (на основе антитела A3 5T4 от Wyeth (WO 2007/106744 и US8759495); имеющее последовательности VH и VL, указанные в SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 86)

Биспецифические антитела

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR
 bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR
 bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR
 bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR
 bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-076-FEAR
 bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-085-FEAR
 bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-127-FEAR
 bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR
 bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR
 bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-H8-FEAR
 bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR
 bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR
 bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR
 bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR
 bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR
 bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-H8-FEAR
 bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR
 bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR
 bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR

Биспецифические антитела, меченные флуоресцеинизотиоцианатом (FITC)

bsIgG1-b12-FEALx5T4-059-FEAR-FITC
 bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR-FITC
 bsIgG1-b12-FEALx5T4-226-FEAR-FITC
 bsIgG1-5T4-A1-F405Lxb12-FEAR-FITC
 bsIgG1-5T4-A3-F405Lxb12-FEAR-FITC

Конъюгированные с дуостатином-3 биспецифические антитела

BsIgG1-5T4-H8-FEARxb12-vcDuo3
 bsIgG1-5T4-076-FEARxb12-vcDuo3
 bsIgG1-5T4-085-FEARxb12-vcDuo3
 bsIgG1-5T4-127-FEARxb12-vcDuo3
 BsIgG1-5T4-059-FEARxb12-vcDuo3

bsIgG1-5T4-106-FEARxb12-vcDuo3

bsIgG1-5T4-207-FEARxb12-vcDuo3

bsIgG1-5T4-226-FEARxb12-vcDuo3.

Несвязывающие контрольные антитела

IgG-b12 - это антитело, специфичное к HIV-1 gp120 (Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5; 230 (3): 812-23), который используется в некоторых примерах в качестве отрицательного, не связывающегося, контрольного второго плеча для биспецифических антител.

IgG1-b12-F405L представляет собой его вариант с заменой F405L.

IgG1-b12-FEAL является его вариантом с заменами, которые приводят к тому, что домен Fc не может взаимодействовать с рецепторами Fc IgG (рецепторами Fc гамма) и комплементом, в дополнение к мутации, которая позволяет генерировать биспецифические антитела с помощью контролируемых замен Fab-плечей: L234F, L235E, D265A и F405L.

IgG1-b12-K409R представляет собой его вариант с заменой K409R.

IgG1-b12-FEAR представляет собой вариант этого варианта с заменами, которые приводят к тому, что домен Fc не может взаимодействовать с рецепторами Fc IgG (рецепторами Fc гамма) и комплементом, в дополнение к мутации, которая позволяет получать биспецифические антитела через контролируемые Fab- замена плеча: L234F, L235E, D265A и K409R.

Пример 11 - Связывание биспецифических антител CD3x5T4 с 5T4 яванского макака и человека, экспрессируемых в клетках НЕК-293

Связывание биспецифических моновалентных антител CD3x5T4 и моноспецифических двухвалентных антител 5T4 с плазматической мембраной клеток НЕК-293, транзитивно трансфицированных 5T4 человека или 5T4 яванского макака (*Macaca fascicularis*) (полученным, как описано в примере 1), анализировали с помощью проточной цитометрии.

Клетки (3×10^4 клеток/лунку) инкубировали в полистирольных 96-луночных круглодонных планшетах (Greiner bio-one, кат. № 650180) с серийными разведениями антител (от 0,0137 до 10 мкг/мл с 3-кратными стадиям разведения) в 100 мкл PBS/0,1% BSA/0,02% азида (окрашивающий буфер) при 4°C в течение 30 мин. Эксперименты проводились в технических повторах. После двукратной промывки в буфере для окрашивания клетки инкубировали с 50 мкл вторичного антитела при 4°C в течение 30 мин. В качестве вторичного антитела конъюгированный с FITC козий F(ab')₂ против IgG человека (Southern Biotech, США, кат. № 2043-02), разведенный 1: 200 в буфере для

окрашивания, использовался во всех экспериментах. Клетки дважды промывали в буфере для окрашивания, ресуспендировали в 30 мкл буфера для окрашивания и анализировали на приборе iQue Screener (Intellicyt Corporation, США). Кривые связывания анализировали с использованием нелинейной регрессии (сигмоидальная доза-реакция с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

На Фигуре 5 (I) (левые панели) показано, что биспецифические антитела bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (A), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR (B), bsIgG1-huCD3-H105TG -059-FEAR (C) и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-H8-FEAR (D), которые моновалентно связывают 5T4, демонстрируют дозозависимое связывание с клетками НЕК-293, трансфицированными 5T4 человека, что сопоставимо со связыванием моноспецифических, двухвалентных антител к 5T4 IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR, IgG1-5T4-059-FEAR и IgG1-5T4-H8-FEAR, соответственно.

На фигуре 5 (I) (правые панели) показано, что биспецифические антитела bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (A), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR (B) и bsIgG1-huGCD3-H101 -FEALx5T4-059-FEAR (C), которые моновалентно связывают 5T4, демонстрируют дозозависимое связывание с клетками НЕК-293, трансфицированными 5T4 яванского макака, что сопоставимо со связыванием моноспецифических двухвалентных антител к 5T4 IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR, соответственно. BsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-H8-FEAR и IgG1-5T4-H8-FEAR демонстрируют слабое связывание с 5T4 яванского макака, что соответствует примеру 2 и экспериментам, описанным в WO2007/106744. В качестве отрицательного контроля в эти эксперименты было включено IgG1-b12-K409R (3 мкг/мл), которое не показало связывания с клетками НЕК-293, трансфицированными 5T4 человека или яванского макака.

Во втором эксперименте окрашивание проводили, как описано выше, с небольшими изменениями. Клетки инкубировали с серийными разведениями антител в диапазоне от 0,000128 до 10 мкг/мл с шагом 5-кратного разведения. В качестве вторичного антитела использовали козы F(ab')₂ против IgG человека, конъюгированные с фикоэритрином (PE) (Jackson Immunoresearch, Великобритания, кат. № 109-116-098), разведенные 1: 200 в буфере для окрашивания.

На Фигуре 5 (II) показано, что антитела bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-207-FEAR (A), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR (B), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR (C), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR и IgG1-5T4-106-FEAR (D), bsIgG1-huCD3-

H101G-FEALx5T4-076-FEAR и IgG1-5T4-076-FEAR (E), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-085-FEAR и IgG1-5T4-085-FEAR (F), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-127-FEAR и IgG1-5T4-127-FEAR (G), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR и IgG1-5T4-A1-FEAR (H), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR и IgG1-5T4-A3-FEAR (I) демонстрируют дозозависимое связывание с клетками НЕК-293, трансфицированными 5T4 человека (левые панели), а также клетками НЕК-293 с 5T4 яванского макака (правые панели). Опять же, кривые связывания двухвалентных моноспецифических и биспецифических моновалентных антител демонстрируют сходную тенденцию между 5T4 человека и яванского макака.

Пример 12 - Связывание биспецифических антител CD3x5T4 с 5T4-положительными опухолевыми клетками человека

Связывание биспецифических антител CD3x5T4 с экспрессирующими 5T4 линиями опухолевых клеток человека HeLa (аденокарцинома шейки матки; ATCC, кат. № CCL-2) и MDA-MB-231 (аденокарцинома груди; ATCC, кат. № HTB-26) клеточную линию анализировали методом проточной цитометрии. Ни клетки HeLa, ни MDA-MB-231 не экспрессируют CD3.

Клетки (3×10^4 клеток/лунку) инкубировали в полистирольных 96-луночных круглодонных планшетах (Greiner bio-one, кат. № 650180) с серийными разведениями антител (диапазон от 0,000152 до 3 мкг/мл с 3-кратными стадиями разведения) в 100 мкл PBS/0,1% BSA/0,02% азида (окрашивающий буфер) при 4°C в течение 30 мин. После двукратной промывки в буфере для окрашивания клетки инкубировали с 50 мкл вторичного антитела при 4°C в течение 30 мин. В качестве вторичного антитела козы F(ab')₂ против IgG человека, конъюгированные с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (Southern Biotech, США, кат. № 2043-02), разведенные 1: 400 в буфере для окрашивания, использовали для первого эксперимента. Затем клетки дважды промывали в буфере для окрашивания, ресуспендировали в 120 мкл буфера для окрашивания и анализировали на BD LSRFortessa FACS (BD Biosciences, США). Кривые связывания анализировали с использованием нелинейной регрессии (сигмоидальная доза-реакция с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

На Фигуре 6 (I) (левые панели) показано, что биспецифические антитела к CD3x5T4 bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (A) и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR (B) демонстрируют дозозависимое связывание с клетками HeLa с более высоким максимальным связыванием, чем моноспецифические двухвалентные антитела 5T4 IgG1-5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR. Для bsIgG1-huCD3-H101G-

FEALx5T4-226-FEAR (C) максимальное связывание было таким же, как и у моноспецифического двухвалентного антитела 5T4 IgG1-5T4-226-FEAR на клетках HeLa.

На фигуре 6 (I) (правые панели) показано, что биспецифические антитела к CD3x5T4 bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (A), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR (B) и bsIgG1-hu1G1-hu -FEALx5T4-226-FEAR (C) демонстрируют дозозависимое связывание с клетками MDA-MB-231 с более высоким максимальным связыванием, чем моноспецифические двухвалентные антитела 5T4 IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR и IgG1 -5T4-059-FEAR. Антитело отрицательного контроля, которое было включено в эти эксперименты, IgG1-b12-K409R (3 мкг/мл), не показало связывания с клетками HeLa и MDA-MB-231.

Во втором эксперименте окрашивание проводили, как описано выше, с небольшими изменениями. Клетки инкубировали с серийными разведениями антител в диапазоне от 0,000128 до 10 мкг/мл с шагом 5-кратного разведения. В качестве вторичного антитела использовали козы F(ab')₂ против IgG человека, конъюгированные с фикоэритрином (PE) (Jackson Immunoresearch, Великобритания, кат. № 109-116-098), разведенные 1: 200 в буфере для окрашивания.

На Фигуре 6 (II) и 6 (III) показано, что антитела bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR и IgG1-5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR и IgG1-5T4-106-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-085-FEAR и IgG1-5T4-085-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-127-FEAR и IgG1-5T4-127-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR и IgG1-5T4-A1-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR и IgG1-5T4-A3-FEAR демонстрируют дозозависимое связывание с опухолевыми клетками HeLa и MDA-MB-231. В целом, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR, IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR, IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-106-FEAR, IgG1-5T4-085-FEAR и IgG1-5T4-127-FEAR демонстрируют связывание при более низких концентрациях антител по сравнению с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR, IgG1-5T4-A1-FEAR и IgG1-5T4-A3-FEAR.

Пример 13 - Индукция активации Т-клеток, высвобождения цитокинов и цитотоксичности in vitro биспецифическими антителами CD3x5T4 с использованием очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток

Биспецифические антитела CD3x5T4 тестировали в анализе цитотоксичности in

in vitro с использованием 5T4-положительных линий опухолевых клеток в качестве клеток-мишеней и очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток. Т-клетки были получены из лейкоцитов здоровых доноров человека (Sanquin, Амстердам, Нидерланды) и выделены с использованием коктейля обогащения человеческих Т-клеток RosetteSep (Stemcell Technologies, Франция, кат. № 15061) в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы определить процент жизнеспособных Т-клеток после выделения (либо общих Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток или CD8⁺ Т-клеток), образец выделенных Т-клеток ($2,5 \times 10^5$ клеток на условие) окрашивали в течение 30 минут при 4°C в 96-луночном планшете с U-образными лунками (Cellstar, кат. № 650180) с использованием следующих антител: Pacific Blue-anti-CD3 (eBiosciences, клон OKT3), APC-Cy-anti-CD4 (eBiosciences, клон OKT4), AF700-anti-CD8 (Biolegend, клон RPA-T8) и маркер жизнеспособности FVS 510 (BD Biosciences) в 100 мкл PBS/0,1% BSA/0,02% азида (окрашивающий буфер). Затем клетки дважды промывали в буфере для окрашивания, ресуспендировали в 120 мкл буфера для окрашивания и анализировали на BD LSRFortessa FACS (BD Biosciences, США). Процентное содержание CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ Т-клеток для каждого из доноров, использованных в эксперименте по цитотоксичности, описано в таблице 6.

Таблица 6: Соотношение CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток на донора

Донор	% CD3 ⁺ жизнеспособных клеток	% CD4 ⁺ в CD3 ⁺ клетках	% CD8 ⁺ в CD3 ⁺ клетках
A	91,2	84,2	11,8
B	77,8	78,3	18
C	97,6	78,1	19,6
D	92,6	77,3	15,5
E	99,2	78,4	20,3

Клетки MDA-MB-231 (16000 клеток/лунку) высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном (Greiner-bio-one, Нидерланды, кат. № 655180) и оставляли на 4 часа при 37°C. Т-клетки добавляли к опухолевым клеткам в соотношении Е:Т = 8:1. Добавляли серийные разведения биспецифических антител CD3x5T4 или моноспецифических двухвалентных антител 5T4 (конечная концентрация в диапазоне от 1000 до 0,0128 нг/мл; 5-кратные разведения) и планшеты инкубировали в течение 72 часов при 37 °C. Затем 110 мкл надосадочных жидкостей, содержащих Т-клетки, переносили в 96-луночные культуральные планшеты с U-образным дном (CellStar, кат. № 650180). Планшеты центрифугировали (300 x g) в течение 3 минут при 4°C, после чего 75 мкл надосадочной жидкости переносили в новый планшет для измерения выработки цитокинов, а Т-клетки сохраняли для оценки маркеров активации Т-клеток (описано ниже). Выработку цитокинов, индуцированную биспецифическими антителами CD3x5T4 0,2 мкг/мл,

анализировали с помощью мультиплексного анализа U-plex (MeSo Scale Discovery, США, кат. № K15049K) в соответствии с инструкциями производителя.

Т-клетки окрашивали на Т-клеточные маркеры CD3 (1: 200; eBioscience, клон ОКТ3, конъюгированный с eFluor450), CD4 (1:50; eBioscience, клон ОКТ4, конъюгированный с APC-eFluor780), CD8 (1: 100; Biolegend, клон RPA-T8, конъюгированный с AF700) и маркеры активации Т-клеток CD69 (1:50; BD Biosciences, клон AB2439, конъюгированный с APC), CD25 (1:50; eBioscience, клон BC96, конъюгированный с PE-Cy7) и CD279/PD1 (1:50; Biolegend, клон EH12.2H7, конъюгированный с BV605). Единично окрашенные образцы с гранулами Ultracomp (5 мкл; Invitrogen, кат. № 01-2222-42) использовали для корректировки компенсации проточного цитометра. После 30 мин инкубации при 4°C планшеты трижды промывали PBS/0,1% BSA/0,02% азида (окрашивающий буфер). Клетки ресуспендировали в 120 мкл буфера для окрашивания и анализировали с использованием FACS Fortessa (BD Biosciences). Данные обрабатывали с помощью FlowJo (BD Biosciences).

Параллельно с этим оценивали жизнеспособность опухолевых клеток с помощью резазурина (7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он 10-оксид). Прилипшие опухолевые клетки дважды промывали PBS и инкубировали с 10% резазурином (150 мкл; Life Technologies, Нидерланды, кат. № DAL1100) в среде RPMI-1640 (Lonza, Швейцария, кат. № BE12-115F), содержащей 10% донорской бычьей сыворотки с железом (Life Technologies, Нидерланды, кат. № 10371-029) и пен/стреп (Lonza, кат. № DE17-603E) в течение 4 ч при 37°C. Оптическую плотность измеряли с помощью считывающего устройства для планшетов Envision (PerkinElmer, США). Поглощение обработанных стауроспорином (Sigma-Aldrich, США, кат. № S6942) образцов опухолевых клеток принимали за 0% жизнеспособности, а абсорбцию необработанных образцов опухолевых клеток принимали за 100% жизнеспособности. «Процент жизнеспособных клеток» рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ жизнеспособных клеток} = ([\text{поглощение образца} - \text{поглощение клеток-мишеней, обработанных стауроспорином}] / [\text{поглощение необработанных клеток-мишеней} - \text{поглощение клеток-мишеней, обработанных стауроспорином}]) \times 100.$$

Кривые «доза-ответ», значения EC50 и IC50 анализировали с использованием нелинейной регрессии (сигмоидальная доза-реакция с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

На фигуре 7 (I) показано, что bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1 -10 FEAL-

HUCD4-FEAL, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR индуцировали дозозависимую цитотоксичность (выраженную как снижение % жизнеспособных клеток) в 5T4-положительной линии опухолевых клеток MDA-MB-231. Наблюдались вариации от донора к донору, но Т-клетки обоих доноров вызывали максимальное уничтожение в присутствии 1 мкг/мл биспецифического антитела CD3x5T4. Моноспецифические бивалентные антитела IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR не вызывают цитотоксичности. Значения IC₅₀, рассчитанные по графикам, представлены на Фигуре 7 (II). Значения IC₅₀ для bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR были ниже по сравнению с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR и bsIgG1-huGD4-FEAR-FEAL-10xT4-0HUGG1-huGT4-FEAR, соответственно. Напротив, значение IC₅₀ для bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR было сопоставимо с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR.

На фигуре 8 (I) показано, что bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR, индуцировали опосредованную Т-клетками цитотоксичность (что показано как снижение выживания опухолевых клеток) в клеточной линии MDA-MB-231. Бивалентные моноспецифические антитела IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR, IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-106-FEAR, IgG1-5T4-A1-FEAR и IgG1-5T4-A3-FEAR не индуцировали опосредованную Т-клетками цитотоксичность. Значения IC₅₀, рассчитанные по графикам, представлены на Фигуре 8 (II). Значения IC₅₀ цитотоксичности, опосредованной Т-клетками, индуцированной bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR и bsIgTG1-huCD3-10-FEAR ниже, чем значения IC₅₀ для bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR. Кроме того, значения IC₅₀ опосредованной Т-клетками цитотоксичности, индуцированной bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H105TG4-FEAL -huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR ниже, чем значения IC₅₀ для bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR.

Активацию Т-клеток определяли методом проточной цитометрии путем окрашивания на маркеры активации PD1, CD25 и CD69 (Фигура 9 (I)). Моноспецифические бивалентные антитела IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR и

IgG1-5T4-059-FEAR не индуцируют положительную регуляцию этих маркеров активации Т-клеток, в то время как биспецифические антитела bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-FEAL-huCD3-huCD3-FEAL-huCD3-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR индуцировали дозозависимую активацию PD1, CD25 и CD69. Значения EC50, рассчитанные по графикам, представлены на Фигуре 9 (II). Значения EC50 для положительной регуляции PD1, CD25 и CD69 с помощью bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR были ниже по сравнению с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEALx5T4-207-FEAL-H101G-FEALx5T4-059-FEAR, соответственно. Значения EC50 для для положительной регуляции CD25 и CD69 с помощью bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR были ниже по сравнению с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, в то время как значение EC50 для положительной регуляции PD1 было сравнимо между bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR.

На фигуре 10 (I) показано, что bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A1-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A3-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR, индуцировали активацию Т-клеток (представленную на Фигуре 10 (I) как увеличение % CD69+ Т-клеток в пределах CD4+ и CD8+ Т-клеточных популяций), при инкубации с линией клеток MDA-MB-231, в то время как двухвалентные моноспецифические антитела IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR, IgG1-5T4-059-FEAR, IgG1-5T4-106-FEAR, IgG1-5T4-A1-FEAR и IgG1-5T4-A3-FEAR не индуцировали активацию Т-клеток. Значения EC50 трех маркеров активации Т-клеток показаны на Фигуре 10 (II). В целом, значения EC50 активации Т-клеток (увеличение % CD69+, CD25+ и PD1+ клеток в популяциях CD4+ и CD8+ Т-клеток), индуцированной bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-106-FEAR ниже, чем значения EC50 для bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-A1-FEAR и bsIgG1-huCDT4-FEAL. Кроме того, значения EC50 активации Т-клеток (увеличение % CD69+, CD25+ и PD1+ Т-клеток в популяциях CD4+ и CD8+ Т-клеток), индуцированной bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-106-FEAR ниже, чем значения EC50 для bsIgG1-huCD3-

H101TG-b-FEAL huCD3-H101G-FEALx5T4-A3-FEAR.

Выработку цитокинов IL-10, IL-13 и TNF после воздействия на совместные культуры Т-клеток и клеток MDA-MB-231 0,2 мкг/мл биспецифических антител к CD3x5T4 измеряли в надосадочной жидкости культуры с помощью мультиплексного анализа U-plex. На Фигуре 11 показаны уровни цитокинов в надосадочной жидкости совместных культур Т-лимфоцитов и опухолевых клеток после инкубации с биспецифическими антителами. Эксперименты проводили с использованием Т-клеток от двух разных здоровых доноров; На Фигуре 11А показаны результаты совместного культивирования с Т-клетками, полученными от донора А. На Фигуре 11В показаны результаты совместного культивирования с Т-клетками, полученными от донора В. Биспецифические антитела bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR-H105T4-059-FEAR и bs101GG1-H105T-FEAR и bs101GG1 все индуцировали высвобождение цитокинов, хотя уровни цитокинов в совместных культурах Т-лимфоцитов и опухолевых клеток, инкубированных с биспецифическими антителами к CD3x5T4, содержащими CD3-специфическое плечо IgG1-huCD3-H101G-FEAL, были ниже, чем уровни цитокинов в совместных культурах, которые инкубировали с биспецифическими антителами, содержащими CD3-специфическое Fab-плечо IgG1-huCD3-FEAL. Моноспецифические антитела IgG1-5T4-207-FEAR, IgG1-5T4-226-FEAR и IgG1-5T4-059-FEAR не вызывали высвобождения цитокинов.

Пример 14 - Индукция цитотоксичности in vitro биспецифическими антителами к CD3x5T4 с использованием PBMC или очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток при различных соотношениях эффектора и мишени

Для более детального определения эффективности опосредованного Т-клетками уничтожения биспецифических антител bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, был проведен анализ цитотоксичности, как описано в Пример 13, с различным соотношением эффекторных клеток и клеток-мишеней (Е:Т). Кроме того, в качестве эффекторных клеток использовали либо мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), либо выделенные Т-клетки. Клеточная линия рака яичников SK-OV-3 (9000 клеток/лунку, ATCC, кат. № HTB-77) использовали в качестве линии клеток-мишеней. PBMC выделяли из 40 мл лейкоцитов крови человека (Sanquin) с использованием градиента фикола (Lonza; среда для разделения лимфоцитов, кат. № 17-829E) в соответствии с инструкциями производителя. Т-клетки выделяли, как описано в Примере 13. Для PBMC использовали следующие отношения Е:Т: 1: 2, 1: 1, 2: 1, 4: 1, 8: 1

и 12: 1. Для выделенных Т-клеток использовали следующие соотношения Е:Т: 1: 2, 1: 1, 2: 1, 4: 1 и 8: 1. В каждом эксперименте использовали эффекторные клетки от двух отдельных доноров. В таблице 7 представлен обзор процентного содержания CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ Т-клеток в изолятах PMBC или Т-клеток для каждого из доноров (определяемых, как описано в примере 13).

Таблица 7: Соотношение CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток на донора.

Донор	% CD3 в популяции жизнеспособных клеток	% CD4 ⁺ в CD3 ⁺ клетках	% CD8 ⁺ в CD3 ⁺ клетках
C (PBMCs)	75	56,8	28,9
D (PBMCs)	60	63,2	32
E (T cells)	98,3	59,6	31,6
F (T cells)	97,2	70	26,4

Как показано на Фигуре 12, при использовании эффекторных клеток от двух разных доноров соотношение Е:Т от 4: 1 до 12: 1 приводило к эффективному РВМС-опосредованному уничтожению клеток SK-OV-3 в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR. При соотношении Е:Т 2: 1 и ниже максимальное уничтожение клеток SK-OV-3 не было достигнуто при самой высокой использованной концентрации антител (1000 нг/мл). Аналогичный результат наблюдался, когда выделенные Т-клетки использовали в качестве эффекторных клеток (Фигура 13). Используя эффекторные клетки от двух разных доноров, соотношение Е:Т, равное 4: 1 и 8: 1, привело к максимальному опосредованному Т-клетками уничтожению клеток SK-OV-3 в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR при наивысшей использованной концентрации антител (1000 нг/мл), тогда как более низкие отношения Е:Т были недостаточными для индукции максимального уничтожения. Таким образом, эффективность опосредованного Т-клетками уничтожения, индуцированного bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR, зависит от достаточно высокого отношения Е:Т.

Пример 15 - Противоопухолевая активность биспецифических антител CD3x5T4 в гуманизированной мышинной модели ксенотрансплантата иммунной системы

Противоопухолевую эффективность *in vivo* биспецифических антител к CD3x5T4 bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR оценивали на гуманизированных (получивших инъекцию в хвостовую вену в возрасте 3-4 недель CD34⁺ гематопозитических стволовых клеток [HSC]) мышах NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG-HIS) (полученных из The Jackson Laboratory), которым подкожно

инокулировали опухолевые клетки человека MDA-MB-231. Гуманизация иммунной системы мышей NSG-HIS была подтверждена через 16 недель после трансплантации с помощью проточной цитометрии. Впоследствии мышей NSG-HIS случайным образом распределяли в три группы (по 8 мышей в группе) на основе донора HSC (№ 5239 или № 2328) и процента CD3+ Т-клеток человека в популяции CD45 + человека в периферической крови (средний % hCD45 + и % hCD3+ клеток, соответственно; 42% hCD45 + и 39% hCD3+ для группы PBS, 34% hCD45 + и 25% hCD3+ для группы bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR и 36% hCD45 + и 29% hCD3+ для bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR). 5x10⁶ клеток MDA-MB-231 (в 100 мкл PBS) вводили подкожно (SC) в бок мышам; это было указано в исследовании как день 0. На 14, 18, 21 и 25 день мышам вводили внутривенно (IV) либо 0,5 мг/кг антитела, либо PBS. Группы лечения представлены в таблице 8. Рост опухоли оценивали дважды в неделю (начиная с 14 дня) с помощью штангенциркуля. Объем опухоли (мм³) был рассчитан по измерениям штангенциркуля как 0,52 x (длина) x (ширина) ².

Результаты показаны на Фигуре 14. На фигуре 14А показано, что как bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR (p <0,01), так и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (p <0,05) эффективно ингибировали рост опухоли на основе статистического анализа Манна-Уитни на 43 день по сравнению с контрольной группой. Кроме того, статистический анализ кривых выживаемости без опухолей (график Каплана-Мейера с использованием размера опухоли <500 мм³ в качестве порогового значения) с использованием теста Мантла-Кокса показал, что разница в выживаемости без опухолей была статистически различной, показывая увеличение выживания без возникновения опухоли у животных, получавших bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR (p <0,001) или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR (p <0,001), по сравнению с необработанными животными (Фигура 14В).

Таблица 8. Группы обработки.

Антитело	Доза	Дни обработки	Животных на группу
PBS	-	14, 18, 21, 25	8
bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR	0.5 мг/кг	14, 18, 21, 25	8
bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR	0.5 мг/кг	14, 18, 21, 25	8

Пример 16 Определение вклада аминокислотных остатков 5T4 в связывание антител с использованием аланинового сканирования.

Дизайн библиотеки

Была синтезирована библиотека с одиночными заменами на аланин в 5T4 человека (Uniprot ID Q13641) (GeneArt, Thermo Fisher Scientific), в которой все аминокислотные остатки во внеклеточном домене 5T4 человека были индивидуально мутированы на аланин, за исключением положений, уже содержащих аланин или цистеин. Чтобы минимизировать вероятность структурного нарушения антигена, цистеины не подвергались мутации. Библиотеку клонировали в экспрессирующем векторе pMAC, содержащем кассету экспрессии CMV/TK-polyA, ген устойчивости к ампициллину и точку начала репликации pBR322.

Изготовление и скрининг библиотеки

5T4 дикого типа и аланиновые мутанты экспрессировали индивидуально в клетках FreeStyle HEK293 в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Fisher Scientific, кат. № 12347-019). Через день после трансфекции клетки собирали. Приблизительно 80 000 клеток инкубировали с 20 мкл FITC-конъюгированного антитела (3 мкг/мл; в буфере FACS (PBS [Lonza, кат. № BE17-517] + 0,1% [масс./об.] BSA [Roche, кат. № 10735086001] + 0,02% [масс./об.] азида натрия [NaN₃; EMELCA Bioscience, кат. № 41920044-3]); Таблица 9) при комнатной температуре в течение 40 мин. Затем клетки дважды промывали центрифугированием с использованием 150-180 мкл буфера FACS. Клетки ресуспендировали в 30 мкл буфера FACS и хранили при 4°C до анализа проточной цитометрией с использованием скринера iQue (Intellicyt Corporation).

Весь эксперимент был проведен дважды, что дало дублирование измерений.

Таблица 9: Антитела, используемые для определения вклада аминокислотных остатков 5T4 в связывание антител с использованием сканирования аланина. Антитела, моновалентно связывающиеся с 5T4, метили с помощью FITC (Thermo Fisher Scientific, кат. № 46425), перед проведением эксперимента. IgG1-5T4-A1-F405L и IgG1-5T4-A3-F405L являются суррогатными антителами A1 и A3, соответственно, которые были клонированы в основную цепь IgG1 человека, содержащую мутации F405L. Следовательно, суррогатное антитело A1 имеет вариабельную область, идентичную таковой у антитела A1, описанного в WO2007106744. Подобным образом суррогатное антитело A3 имеет вариабельную область, идентичную таковой у антитела A3, описанного в WO2007106744. В обоих антителах домен Fc несет замену F405L.

Антитело	Тестируемое или контрольное антитело
bsIgG1-b12-FEALx5T4-059-FEAR-FITC	Тестируемое антитело
bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR-FITC	Тестируемое антитело
bsIgG1-b12-FEALx5T4-226-FEAR-FITC	Тестируемое антитело
bsIgG1-5T4-A3-F405Lxb12-FEAR-FITC	Тестируемое антитело
bsIgG1-5T4-A1-F405Lxb12-FEAR-FITC	Контрольное антитело,

	используемое для нормализации
--	-------------------------------

Анализ данных

Для каждого образца среднее количество антитела, связанного на клетку, определяли как среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции (gMFI) для жизнеспособной популяции отдельных клеток. На gMFI влияет аффинность антитела к мутанту 5T4 и уровень экспрессии мутанта 5T4 на клетку. Поскольку специфические аланиновые мутации могут влиять на уровень экспрессии мутанта 5T4 на поверхности, и для корректировки различий в экспрессии для каждого мутанта 5T4 в целом, данные для каждого тестируемого антитела были нормализованы по интенсивности связывания контрольного антитела, специфичного к 5T4, не имеющего перекрестной блокировки, используя следующее уравнение:

$$\text{Нормализованное } gMFI_{\text{положение ак}} = \log_{10} \left(\frac{gMFI_{\text{Тестируемое Ab}}}{gMFI_{\text{Контрольное Ab}}} \right)$$

В котором «ак-положение» относится к положению, которое мутировано на аланин; а Z-балл был рассчитан для выражения потери или усиления связывания антител в соответствии со следующим расчетом:

$$Z - \text{балл (кратное изменение)} = \frac{\text{Нормализованное } gMFI_{\text{положение ак}} - \mu}{\sigma}$$

Где μ и σ - среднее и стандартное отклонение нормализованного gMFI, рассчитанного для всех мутантов.

Если gMFI контрольного антитела для конкретного мутанта 5T4 было ниже, чем среднее Ab gMFIControl - 2,5 x SD среднего Ab gMFIControl (для всех мутантов), данные исключались из анализа (предполагалось, что уровни экспрессии для этих мутантов 5T4 было недостаточно, чтобы делать выводы). Так было с аминокислотой W в положении 296 (SEQ ID NO: 1).

Результаты

На Фигуре 15 показаны результаты связывания тестируемых антител с вариантами 5T4 человека с одиночными аланиновыми мутациями в ECD: положения с 32 по 355 (согласно SEQ ID NO: 1). Результаты показывают, что антитело bsIgG1-b12-FEALx5T4-059-FEAR-FITC показало потерю связывания, когда аминокислоты R в положении 73, T в положении 74, Y в положении 92, R в положении 94, N в положении 95 или F в положении 138 из 5T4 человека были мутированы в аланин. Это свидетельствует о том, что связывание антитела IgG1-5T4-059-04-FEAR, по меньшей мере, зависит от аминокислотных остатков R73, T74, Y92, R94, N95, F138 5T4 человека (SEQ ID NO: 1),

антитело bsIgG1-b12-FEALx5T4- 207-FEAR-FITC продемонстрировало потерю связывания, когда аминокислоты S в положении 69, R в положении 73, Y в положении 92, R в положении 94, F в положении 111, F в положении 138, D в положении 148 5T4 человека мутировали на аланин. Это свидетельствует о том, что связывание антитела IgG1-5T4-207-FEAR, по меньшей мере, зависит от аминокислот S69, R73, Y92, R94, F111, F138 и D148 5T4 человека (SEQ ID NO: 1), антитело bsIgG1-b12-FEALx5T4- 226-FEAR-FITC продемонстрировало потерю связывания, когда аминокислоты R в положении 73, Y в положении 92, R в положении 94, F в положении 111, F в положении 138, L в положении 144 или D в положении 148 5T4 человека мутировали на аланин. Это свидетельствует о том, что связывание антитела IgG1-5T4-226-FEAR, по меньшей мере, зависит от аминокислотных остатков R73, Y92, R94, F111, F138, L144 и D148 5T4 человека (SEQ ID NO: 1), антитело bsIgG1-5T4-A3- F405Lxb12-FEAR-FITC продемонстрировало потерю связывания, когда аминокислоты D в положения 60, Q в положения 61, D в положения 88, L в положения 89, Y в положения 92, F в положения 111, P в положения 115, L в положения 117, F в положении 138, D в положении 148 или N в положении 152 5T4 человека были мутированы в аланин. Это свидетельствует о том, что связывание антитела IgG1-5T4-A3-FEAR, по меньшей мере, зависит от аминокислотных остатков D60, Q61, D88, L89, Y92, F111, P115, L117, F138, D148 и N152 5T4 человека (SEQ ID NO: 1).

Некоторые аминокислоты могут косвенно участвовать в связывании. Например, мутация гидрофобного остатка в аланин может влиять на локальную укладку и влиять на расположение непосредственно взаимодействующих остатков (Zhao et al., 2014 Structure 22, 612-620). На основании структурных данных (кристаллическая структура 5T4 человека 4сnm; банк данных белков RCSB) следующие остатки скрыты и, следовательно, предположительно косвенно способствуют связыванию:

- антитело bsIgG1-b12-FEALx5T4-059-04-FEAR-FITC: F138,
- антитело bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR-FITC: F111, F138, D148,
- антитело bsIgG1-b12-FEALx5T4-226-FEAR-FITC: F111, F138, L144, D148,
- антитело bsIgG1-5T4-A3-F405Lxb12-FEAR-FITC: L89, F111, L117, F138, D148, N152.

Поскольку непосредственно с антителом могут взаимодействовать только открытые на поверхности остатки, ожидается, что следующие остатки будут напрямую взаимодействовать:

- антитело bsIgG1-b12-FEALx5T4-059-FEAR-FITC: R73, T74, Y92, R94 и N95,
- антитело bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR-FITC: S69, R73, Y92 и R94,
- антитело bsIgG1-b12-FEALx5T4-226-FEAR-FITC: R73, Y92 и R94,

- антитело bsIgG1-5T4-A3-F405Lxb12-FEAR-FITC: D60, Q61, D88, Y92 и P115.

В совокупности эти результаты предполагают, что антитела IgG1-5T4-059, IgG1-5T4-207 и IgG1-5T4-226 все связываются путем прямого взаимодействия с аминокислотными остатками R73, Y92 и R94. Результаты также показывают, что каждое из антител IgG1-5T4-059, IgG1-5T4-207 и IgG1-5T4-226 связывается с эпитопом, который отличается от эпитопа, связанного с IgG1-5T4-A3, но частично перекрывается с ним. Это соответствует поведению вытеснения, описанному в Примерах 3 и 4.

Пример 17: Индукция активации Т-клеток и цитотоксичности биспецифическими антителами CD3x5T4 в клеточных линиях разных этиологий in vitro.

Биспецифические антитела CD3x5T4 тестировали в анализе цитотоксичности in vitro с использованием линий опухолевых клеток поджелудочной железы и рака шейки матки в качестве клеток-мишеней и очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток. Для каждой этиологии (рак поджелудочной железы и рак шейки матки) были отобраны две репрезентативные клеточные линии. Линии опухолевых клеток, использованные в анализе цитотоксичности in vitro, приведены в таблице 10. Т-клетки были получены из лейкоцитов доноров человека (Sanquin, Амстердам, Нидерланды) и выделены с использованием коктейля обогащения человеческих Т-клеток RosetteSep (Stemcell Technologies, Франция, кат. № 15061) в соответствии с инструкциями производителя. Для каждой клеточной линии, по меньшей мере, три разных донора были протестированы в анализе цитотоксичности in vitro и анализе активации Т-клеток, как обобщено в таблице 10.

Таблица 10: Линии опухолевых клеток, используемые для анализа цитотоксичности in vitro

Опухолевая клеточная линия	источник	Клон ATCC №	цитотокс. (n)	Т-клеточная активация (n)
BxPC-3	Поджелудочная железа	CRL-1687	3	3
PANC-1	Поджелудочная железа	CRL-1469	9	4
Ca Ski	Шейка матки	CRL-1550	5	3
SiHa	Шейка матки	HTB-35	3	3

Опухолевые клетки (16000 клеток/лунку) высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном (Greiner Bio-One, Нидерланды, кат. № 655180) и оставили на 4 часа при 37°C. Т-клетки добавляли к опухолевым клеткам в соотношении Е: Т = 4: 1. Добавляли серийные разведения bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR или контрольных антител (bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR, bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR)

(конечная концентрация варьировалась от 5000 до 0,0128 нг/мл; 5-кратные разведения) и планшеты инкубировали при 37°C в течение 72 ч. Затем 110 мкл надосадочных жидкостей, содержащих Т-клетки, переносили в 96-луночные культуральные планшеты с круглым дном (CellStar, кат. № 650180) и центрифугировали (300 x g) при 4°C в течение 3 мин. Т-клетки окрашивали на маркеры Т-клеток путем инкубации с CD3-eFluor450 (1:200; eBioscience, клон ОКТ3), CD4-APC-eFluor780 (1:50; eBioscience, клон ОКТ4), CD8-AF700 (1:100; Biolegend, клон RPA-T8) и маркеры активации Т-клеток CD69-APC (1:50; BD Biosciences, клон AB2439), CD25-PE-Cy7 (1:50; eBioscience, клон BC96) и CD279/PD1-BV605 (1:50; Biolegend, клон EH12.2H7), разведенный в 50 мкл PBS/0,1% BSA/0,02% азида (буфер для окрашивания). Единично окрашенные образцы с гранулами Ultracompr (5 мкл; Invitrogen, кат. № 01-2222-42) использовали для корректировки компенсации проточного цитометра. После 30 мин инкубации при 4°C планшеты трижды промывали буфером для окрашивания. Клетки ресуспендировали в 120 мкл буфера для окрашивания и анализировали с использованием FACS Fortessa (BD Biosciences). Данные обрабатывались с помощью FlowJo (версия 10, BD Biosciences).

Параллельно с этим оценивали жизнеспособность опухолевых клеток с помощью резазурина (7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он 10-оксид). Прилипшие опухолевые клетки дважды промывали PBS и инкубировали с 10% резазурином (150 мкл; Life Technologies, Нидерланды, кат. № DAL1100) в среде RPMI-1640 (Lonza, Швейцария, кат. № BE12-115F) с добавлением 10% донорской бычьей сыворотки с железом (Life Technologies, Нидерланды, кат. № 10371-029) и пен/стреп (Lonza, кат. № DE17-603E) при 37°C в течение 4 часов. Оптическую плотность измеряли с помощью считывающего устройства для планшетов Envision (PerkinElmer, США). Поглощение обработанных стауроспорином (Sigma-Aldrich, США, кат. № S6942) клеток принимали за жизнеспособность 0%, а поглощение необработанных клеток принимали за 100% жизнеспособности. «Процент жизнеспособных клеток» рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ жизнеспособных клеток} = \left(\frac{[\text{поглощение образца} - \text{поглощение клеток-мишеней, обработанных стауроспорином}]}{[\text{поглощение необработанных клеток-мишеней} - \text{поглощение клеток-мишеней, обработанных стауроспорином}]} \right) \times 100.$$

Кривые цитотоксичности, кривые активации Т-клеток, значения IC50 (цитотоксичность) и EC50 (активация Т-клеток) анализировали с использованием нелинейной регрессии (сигмоидальная доза-ответ с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

На Фигуре 16 (I) показано, что bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR

индуцировало цитотоксичность в ряде клеточных линий разных этиологий, в то время как контрольные биспецифические антитела (bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR, bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR), нацеленные только на опухолевые клетки или Т-клетки, не проявляли никакой цитотоксичности. На Фигуре 16 (II) показаны средние значения IC50 для каждой из клеточных линий, протестированных с разными донорами (по меньшей мере, n = 3). На Фигуре 17 (I) показана активация Т-клеток, индуцированная bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR в ряде клеточных линий с различными этиологиями, измеренная с помощью по положительной регуляции CD69 на CD4+ и CD8+ Т-клетках (% CD69+ клеток в популяции CD4+ или CD8+). Контрольные биспецифические антитела (bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR, bsIgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR), нацеленные только на опухолевые клетки или Т-клетки, не вызывали какой-либо активации Т-клеток. На Фигуре 17 (II) показаны средние значения EC50 для каждой из клеточных линий, протестированных с разными донорами (по меньшей мере, n = 3).

Эти данные показывают, что bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR может специфически индуцировать опосредованную Т-клетками цитотоксичность и активацию Т-клеток при раке поджелудочной железы и шейки матки, в то время как контрольные биспецифические антитела bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEGAR и bs b12-FEALx5T4-207-FEAR не вызывают активацию Т-клеток и цитотоксичность, опосредованную Т-клетками.

Список литературы

1. Zhao et al., 2014 Structure 22, 612-620
2. Southall et al., 1990 Br J Cancer 61, 89-95
3. Stern and Harrop, 2017 Cancer Immunol Immunother 66, 415-426; Southall et al., 1990 Br J Cancer 61, 89-95
4. Damelin et al., 2011 Cancer Res 71, 4236-4246; Carsberg et al., 1996 Int J Cancer 68, 84-92
5. Carsberg et al., 1996 Int J Cancer 68, 84-92
6. Kagermeier-Schenk et al., 2011 Dev Cell 21, 1129-1143
7. Eisen, et al., 2014 Curr Oncol Rep 16, 370
8. Stern and Harrop, 2017 Cancer Immunol Immunother 66, 415-426; Scurr et al., 2017 JAMA Oncol 12, 10
9. Scurr et al., 2017 JAMA Oncol 12, 10)
10. WO2007106744
11. WO03038098
12. WO2011048369

13. WO2013041687
14. WO2017072207
15. Abdiche YN, Yeung AY, Ni I, Stone D, Miles A, Morishige W, et al. (2017) Antibodies Targeting Closely Adjacent or Minimally Overlapping Epitopes Can Displace One Another. PLoS ONE 12(1): e0169535. doi:10.1371/journal.pone.0169535)
16. WO 2007/059782; Genmab A/S
17. Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)
18. Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90
19. Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24
20. Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)
21. Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)
22. Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)
23. Lefranc MP. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999
24. Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)
25. Abdiche YN, Malashock DS, Pinkerton A, Pons J. Exploring blocking assays using Octet, ProteOn, and Biacore biosensors. Anal Biochem. 2009; 386(2): 172-180)
26. WO92/22653
27. EP0629240
28. Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689 (1991)
29. Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277
30. WO2007106744
31. Shaw et al. (2002), Biochem. J. 363: 137-45, WO98/55607
32. WO06/031653
33. Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)
34. WO 2011/131746; Genmab A/S
35. WO/2002/020039; Trion Pharma/Fresenius Biotech
36. WO9850431; Genetech
37. WO2011117329; Roche
38. EP1870459; Amgen
39. WO2009089004; Amgen
40. US201000155133; Chugai

41. WO2010129304; Oncomed
42. WO2007110205; EMD Serono
43. WO 2010/015792; Regeneron
44. WO11143545; Pfizer/Rinat
45. WO2012058768; Zymeworks/Merck
46. WO2011028952; Xencor
47. WO 2009/080254; Roche
48. WO2008003116; F-Star
49. US 7,262,028; Crucell/Merus
50. US 7,612,181; Abbott
51. WO20100226923; Unilever, Sanofi Aventis
52. US007951918; Biogen Idec
53. CN 102250246; Changzhou Adam Biotech Inc
54. WO2012025525; Roche
55. WO2012025530; Roche
56. WO2008157379; Macrogenics
57. WO2010/080538; Macrogenics
58. WO 2008/119353
59. WO 2011/131746
60. WO2015001085
61. Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. (276):6591-604)
62. Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)
63. US 6,077, 835
64. WO 00/70087
65. Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)
66. WO 00/46147
67. Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986)
68. Wigler et al., Cell 14, 725 (1978)
69. Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)
70. US 5,589,466
71. US 5,973,972
72. Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)
73. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995
74. Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed.,

Marcel Dekker, Inc., New York, 1978

- 75. US 4,699,880
- 76. Kozak, M., *Gene* 1999;234(2):187-208)
- 77. Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., eds.

Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006)

- 78. Aslanidis, C. and P.J. de Jong, *Nucleic Acids Res* 1990;18(20): 6069-74
- 79. Lefranc MP. *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 27, 209-212, 1999
- 80. Brochet X. *Nucl. Acids Res.* 36, W503-508 (2008)
- 81. WO2007/106744
- 82. WO2015/001085
- 83. WO2017/009442
- 84. WO2011147986,
- 85. WO2011131746
- 86. WO2013060867
- 87. Labrijn et al., *PNAS* 2013, 110: 5145-50
- 88. Gramer et al., *MAbs* 2013, 5: 962- 973
- 89. Barbas, CF. *J Mol Biol.* 1993 Apr 5; 230(3):812-23
- 90. WO2007/106744
- 91. US 2015/0337049

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, включающее, по меньшей мере, одну антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4 (гликопротеин трофобластов), при этом антитело способно блокировать связывание с 5T4 антитела, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9 [059].

2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело блокирует связывание с 5T4 антитела, выбранного из группы, состоящей из:

a) антитела, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44 [207],

b) антитела, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51 [226]; и

c) антитела, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9 [059].

3. Антитело по п. 1 или 2, отличающееся тем, что указанное антитело блокирует связывание с 5T4 антитела, выбранного из группы, состоящей из:

a) антитела, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44 [207]; и

b) антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51 [226].

4. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что 5T4 представляет собой 5T4 человека (*Homo sapiens*), например, последовательность зрелого полипептида SEQ ID NO: 1.

5. Антитело по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что 5T4 представляет собой 5T4 яванского макака (*Macaca fascicularis*), такую как последовательность зрелого полипептида SEQ ID NO: 2.

6. Антитело по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что 5T4 представляет собой 5T4 курицы (*Gallus gallus*), такой как последовательность зрелого полипептида SEQ ID NO: 3.

7. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что 5T4 представляет собой 5T4 человека, такой как зрелый полипептид SEQ ID NO: 1, и 5T4 яванского макака, такой как зрелый полипептид SEQ ID NO: 2.

8. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что 5T4 представляет собой 5T4 человека, такой как последовательность зрелого полипептида SEQ ID NO: 1, 5T4 яванского макака, такая как последовательность зрелого полипептида SEQ ID NO: 2 и 5T4 курицы, такой как последовательность зрелого полипептида SEQ ID NO: 3.

9. Антитело по любому из предшествующих пп., где указанное антитело способно связывать 5T4 человека, 5T4 яванского макака и/или 5T4 курицы, с аффинностью связывания, которая соответствует значению KD $1E-7$ М или меньше, например, $5E-8$ М или меньше, $1E-8$ М или меньше, $5E-9$ М или меньше, или такое как $1E-9$ М или меньше, например, с аффинностью связывания, соответствующим значению KD , которое находится в диапазоне от $1E-7$ до $5E-10$ М, например, в диапазоне от $1E-7$ до $1E-9$ М, например, от $5E-8$ до $5E-10$ М, от $5E-8$ до $1E-9$ М, например, от $1E-8$ до $5E-10$ М, $1E-8$ до $1E-9$ М или от $1E-8$ до $5E-9$ М.

10. Антитело по п. 9, отличающееся тем, что аффинность связывания определяется биослойной интерферометрией, необязательно, как указано в примере 2 в данном документе.

11. Антитело по любому из пп. 9 и 10, отличающееся тем, что аффинность связывания определяют с использованием биослойной интерферометрии, включающей стадии:

I) Иммобилизации антитела в количестве 1 мкг/мл в течение 600 секунд на биосенсоре, основанном на принципе захвата антителами к Fc-фрагменту IgG человека;

II) Определения ассоциации в течение периода времени 200 секунд и диссоциации в течение периода времени 1000 секунд 5T4ECDH α (зрелый белок SEQ ID NO: 99) или 5T4 яванского макака (зрелый белок SEQ ID NO: 2 или рекомбинантный белок 5T4 яванского макака (Cusabio; кат. № CSB-MP024093MOV), используя серии 2-кратных разведений в диапазоне от 100 нМ до 1,56 нМ.

III) Сравнение проводили с данными, полученными в контрольном буфере (0 нМ).

12. Антитело по любому из пп. 9-11, отличающееся тем, что аффинность связывания определяют с использованием антитела, определенного в любом из предшествующих пп., которое представляет собой моноспецифическое двухвалентное антитело, такое как антитело, которое представляет собой полноразмерный IgG1.

13. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанное антитело распознает эпитоп или область связывания антитела или сайт связывания на 5T4, где указанная область связывания антитела, сайт связывания или эпитоп распознается любым из антител, выбранных из группы, состоящей из :

a) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9 [059],

b) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16 [076],

c) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23 [085],

d) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30 [106],

e) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 37 [127],

f) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44 [207]; и

g) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51 [226].

14. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанное антитело связывается с областью связывания антитела, участком связывания или эпитопом на 5T4, которые не являются областью связывания антитела, участком связывания или эпитопом, связанным с ним, или отличаются от области связывания антитела, участка связывания или эпитопа, связанного антителом, выбранным из группы, состоящей из:

a) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 87, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 88 [H8],

b) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность,

указанную в SEQ ID NO: 83, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 84 [A1]; и

с) антитела, включающего область VH, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 85, и область VL, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 86 [A3].

15. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что связывание указанного антитела с 5T4 блокируется связыванием с 5T4 антитела, включающего переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 85 и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 86 [A3].

16. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанное антитело демонстрирует вытеснение антитела, связанного с 5T4ECDHis (зрелый белок SEQ ID NO: 99), где указанное антитело, связанное с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 85, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 86 [A3].

17. Антитело по п. 14 или 15, отличающееся тем, что перекрестное блокирование или способность антитела, определенного в любом из предшествующих пп., блокировать связывание другого антитела с 5T4 определяется анализом сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS), например, в анализе, проведенном, как описано в Примере 5.

18. Антитело по любому из пп. 14-16, отличающееся тем, что перекрестное блокирование или способность антитела, определенного в любом из предшествующих пп., блокировать связывание другого антитела с 5T4, определяется как способность неконъюгированного антитела блокировать связывание конъюгированного антитела и, необязательно, определяется с помощью процедуры, включающей стадии:

i) Предоставления набора образцов, где каждый образец включает смесь клеток аденокарциномы яичника человека SK-OV-3, антитело, которое связывается с 5T4 и конъюгировано с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), и избыток неконъюгированного антитела, нацеленного на 5T4,

ii) Инкубирования образцов в течение 30 минут при 4°C, а затем центрифугирования образцов,

iii) Удаления надосадочной жидкости из каждого образца и ресуспендирования клеток в буфере и определение средней интенсивности флуоресценции (MFI) FITC с использованием проточного цитометра; и

iv) Расчет процента связывания следующим образом:

Разница в MFI между клетками, инкубированными со смесью FITC-конъюгированных антител и неконъюгированных антител, и клетками, инкубированными без FITC-конъюгированных или неконъюгированных антител, умноженная на 100 и затем разделенная на разницу в MFI между клетками, инкубированными со смесью FITC-конъюгированного антитела и антитела IgG-b12 и клетками, инкубированными без FITC-конъюгированных или неконъюгированных антител.

19. Антитело по любому из пп. 14-17, отличающееся тем, что способность указанного антитела блокировать связывание другого антитела с 5T4 или замещать другое антитело, связанное с 5T4ECDHis (зрелый белок SEQ ID NO: 99), определяется с помощью биослойной интерферометрии, как, например, в анализе, описанном в Примере 3.

20. Антитело по любому из пп. 14-18, отличающееся тем, что способность антитела блокировать связывание другого антитела с 5T4 или замещать другое антитело, связанное с 5T4, определяется с помощью биослойной интерферометрии в процедуре, включающей стадии:

i) Иммобилизации антитела по любому из предшествующих пп. в количестве 20 мкг/мл в 10 mM натрий-ацетатном буфере на активированном аминокреактивном биосенсоре 2-го поколения,

ii) Гашения биосенсора иммобилизованным антителом в этанолаmine pH 8,5,

iii) Погружения биосенсора с иммобилизованным антителом в композицию, содержащую 3,6 мкг/мл (100 nM) человеческого 5T4ECDHis (зрелый белок SEQ ID NO: 99), на период времени 500 секунд, и затем

iv) Погружения биосенсора с иммобилизованным антителом и 5T4ECDHis в композицию, содержащую 10 мкг/мл другого антитела, нацеленного на 5T4, и определение ответа ассоциации в течение периода времени 500 секунд;

при этом стадии i) -iv) выполняются при температуре 30 °C и встряхивании со скоростью 1000 об/мин.

21. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанное антитело связывается с эпитопом или областью связывания антитела на человеческом 5T4, содержащей аминокислотные остатки R73, Y92 и R94; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

22. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанное антитело связывается с эпитопом или областью связывания антитела на

человеческом 5T4, содержащей аминокислотные остатки S69, R73, Y92 и R94; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

23. Антитело по любому из пп. 1-21, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с эпитопом или областью связывания антитела на человеческом 5T4, содержащей аминокислотные остатки R73, T74, Y92, R94 и N95; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

24. Антитело по любому из пп. 21 - 23, отличающееся тем, что указанные аминокислотные остатки непосредственно участвуют в связывании антитела.

25. Антитело по любому из пп. 21-24, отличающееся тем, что один или несколько из следующих дополнительных аминокислотных остатков участвуют в связывании антитела, например, косвенно участвуют в связывании, например, воздействуя на сворачивание белка и/или позиционируя один или несколько аминокислотных остатков, непосредственно участвующих в связывании антитела: L89, F111, L117, F138, L144, D148, N152; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

26. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанное антитело связывается с эпитопом или областью связывания антитела на 5T4 человека, в котором аминокислотные остатки R73, Y92 и R94 непосредственно участвуют в связывании антитела, и где один или несколько аминокислотных остатков F111, F138, L144 и D148 косвенно участвуют в указанном связывании; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

27. Антитело по любому из пп. 1-25, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с эпитопом или областью связывания антитела на человеческом 5T4, в котором аминокислотные остатки S69, R73, Y92 и R94 непосредственно участвуют в связывании антитела, и где один или большее количество аминокислотных остатков F111, F138 и D148 косвенно участвует в указанном связывании; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

28. Антитело по любому из пп. 1-25, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с эпитопом или областью связывания антитела на человеческом 5T4, в котором аминокислотные остатки R73, T74, Y92, R94 и N95 непосредственно участвуют в связывании антитела, и где аминокислотный остаток F138 косвенно участвует в указанном связывании; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

29. Антитело по любому из пп. 21-28, отличающееся тем, что аминокислотные

остатки, содержащиеся в указанном эпитопе или связывающей области антитела, и, возможно, один или несколько дополнительных аминокислотных остатков идентифицируются путем аланинового сканирования 5T4 человека, имеющего указанную аминокислотную последовательность. в SEQ ID NO: 1 или последовательности зрелого полипептида SEQ ID NO: 1.

30. Антитело по п. 29, отличающееся тем, что аланиновое сканирование выполняется, как изложено или по существу, как изложено в примере 16 в данном документе.

31. Антитело по пп. 29-30, отличающееся тем, что аланиновое сканирование выполняется с помощью процедуры, включающей стадии:

i) экспрессии мутантных полипептидов 5T4 человека, в которых все аминокислотные остатки во внеклеточном домене 5T4 человека (соответствующие аминокислотным остаткам 32-355 SEQ ID NO: 1), за исключением цистеинов и аланинов, индивидуально замещены аланином, и полипептидов 5T4 дикого типа (аминокислотные остатки 32-355 SEQ ID NO: 1) индивидуально в клетках эмбриональной почки человека, например, клетках HEK 293, так что для каждого мутанта или 5T4 дикого типа предоставляется образец, содержащий 70-90 000 клеток, например, 80 000 клеток,

ii) Инкубации клеток в каждом образце с 20 мкл указанного антитела, конъюгированного с антителом, конъюгированным с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (3 мкг/мл; в буфере FACS) в течение 40 минут при комнатной температуре, с последующей промывкой каждого образца дважды в 150-180 мкл Буфер FACS (фосфатно-солевой буферный раствор + 0,1% [масс./об.] BSA + 0,02% [масс./об.] азида натрия) и ресуспендирование клеток в каждом образце в 30 мкл буфера FACS,

iii) Определения для каждого образца среднего количества связанного антитела на клетку, как среднего геометрического интенсивности флуоресценции (gMFI) для жизнеспособной популяции единичных клеток в указанном образце и нормализации данных для каждого тестируемого антитела против интенсивности связывания неперекрестно-блокирующего 5T4-специфического контрольного антитела с использованием уравнения:

$$\text{Нормализованное } gMFI_{\text{положение ак}} = \log_{10} \left(\frac{gMFI_{\text{Тестируемое Аб}}}{gMFI_{\text{Контрольное Аб}}} \right)$$

где «положение ак» относится к положению, в котором произошла мутация на аланин,

где Z-балл рассчитывается для выражения потери или усиления связывания антитела в соответствии с расчетом:

$$Z - \text{балл(кратное изменение)} = \frac{\text{Нормализованное } gMFI_{\text{положение ак}} - \mu}{\sigma}$$

где μ и σ - среднее и стандартное отклонение, соответственно, нормализованного gMFI, рассчитанного для всех мутантов,

где данные исключаются из анализа, если gMFI контрольного антитела для конкретного мутанта 5T4 ниже, чем среднее gMFIControl Ab - 2,5 x SD среднего gMFIControl Ab (от всех мутантов); и необязательно

где данные исключаются из анализа, если остаток связывается с Z-баллом чуть ниже -1,5 (например, между -1,5 и -1,8, например, между -1,5 и -1,7 или например, между -1,5 и -1,6) и прогнозируется, что этот остаток будет погружен и пространственно отделен от большинства остатков, которые, как предполагается, будут экспонироваться на поверхности и для которых определяется потеря связывания или снижение связывания.

32. Антитело по п. 31, отличающееся тем, что неперекрестное блокирующее 5T4-специфическое контрольное антитело на стадии iv) представляет собой биспецифическое антитело, включающее

- антигенсвязывающую область, которая содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 83, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 84 [A1];
- и

- антигенсвязывающую область, которая содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 97, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 98 [B12].

33. Антитело по любому из пп. 1-20, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с 5T4 таким образом, что происходит потеря связывания или связывание снижается, если любой один или несколько аминокислотных остатков R73, Y92 и R94 заменен/заменены аланином; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

34. Антитело по любому из пп. 1-20 и 33, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с 5T4 таким образом, что происходит потеря связывания или связывание снижается, если один или несколько аминокислотных остатков S69, R73, Y92 и R94 замещен/замещены аланином; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

35. Антитело по любому из пп. 1-20 и 33, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с 5T4 таким образом, что происходит потеря связывания или связывание снижается, если любой один или несколько аминокислотных остатков R73, T74, Y92, R94 и N95 замещен/замещены аланином; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

36. Антитело по любому из пп. 1-20 и 33-35, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с 5T4 так, что происходит потеря связывания или связывание уменьшается, если любой один или несколько аминокислотных остатков: L89, F111, L117, F138, L144, D148, N152 замещен/замещены аланином; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

37. Антитело по любому из пп. 1-20 и 33-36, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с 5T4 таким образом, что происходит потеря связывания или связывание уменьшается, если любой один или несколько аминокислотных остатков R73, Y92, R94, F111, F138, L144 и D148 замещен/замещены аланином; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

38. Антитело по любому из пп. 1-20 и 33-36, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с 5T4 таким образом, что происходит потеря связывания или связывание уменьшается, если любой один или несколько аминокислотных остатков S69, R73, Y92, R94, F111, F138 и D148 замещен/замещены аланином; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

39. Антитело по любому из пп. 1-20 и 33-36, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с 5T4 таким образом, что происходит потеря связывания или связывание уменьшается, если любой один или несколько аминокислотных остатков R73, T74, Y92, R94, N95 и F138 замещен/замещены аланином; нумерация каждого аминокислотного остатка приводится относительно его положения в SEQ ID NO: 1.

40. Антитело по любому из пп. 33-39, отличающееся тем, что эффект замены аланина определяют путем аланинового сканирования полипептида, содержащего аминокислотные остатки 32-355 SEQ ID NO: 1.

41. Антитело по любому из пп. 33-39, отличающееся тем, что эффект замены аланина определяется с помощью процедуры, изложенной или по существу такой, как изложено в примере 16 в данном документе.

42. Антитело по любому из пп. 33-39, отличающееся тем, что потерю связывания определяют как Z-балл связывания ниже 1,5; Z-балл, необязательно, рассчитывается, как изложено или по существу как указано в Примере 16 в данном документе.

43. Антитело по п. 42, отличающееся тем, что эффект замены аланина определяют с помощью процедуры, включающей стадии:

i) экспрессии мутантных полипептидов 5T4 человека, в которых все аминокислотные остатки во внеклеточном домене 5T4 человека (соответствующие аминокислотным остаткам 32-355 SEQ ID NO: 1), за исключением цистеинов и аланинов,

индивидуально замещены аланином, и полипептидов 5T4 дикого типа индивидуально в эмбриональных клетках почки человека, например, клетках НЕК 293, так что для каждого мутанта или 5T4 дикого типа предоставляется образец, содержащий 70-90 000 клеток, например, 80 000 клеток,

ii) Инкубации клеток в каждом образце с 20 мкл указанного антитела, конъюгированного с антителом, конъюгированным с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (3 мкг/мл; в буфере FACS) в течение 40 минут при комнатной температуре, с последующей промывкой каждого образца дважды в 150-180 мкл Буфер FACS (фосфатно-солевой буферный раствор + 0,1% [масс./об.] BSA + 0,02% [масс./об.] азида натрия) и ресуспендирование клеток в каждом образце в 30 мкл буфера FACS,

iii) Определения для каждого образца среднего количества связанного антитела на клетку, как среднего геометрического интенсивности флуоресценции (gMFI) для жизнеспособной популяции единичных клеток в указанном образце и нормализации данных для каждого тестируемого антитела против интенсивности связывания перекрестно-блокирующего 5T4-специфического контрольного антитела с использованием уравнения:

$$\text{Нормализованное } gMFI_{\text{положение ак}} = \log_{10} \left(\frac{gMFI_{\text{Тестируемое Ab}}}{gMFI_{\text{Контрольное Ab}}} \right)$$

где «положение aa» относится к положению, в котором произошла мутация на аланин,

где Z-балл рассчитывается для выражения потери или усиления связывания антитела в соответствии с расчетом:

$$Z - \text{балл(кратное изменение)} = \frac{\text{Нормализованное } gMFI_{\text{положение ак}} - \mu}{\sigma}$$

где μ и σ - среднее и стандартное отклонение, соответственно, нормализованного gMFI, рассчитанного для всех мутантов,

где данные исключаются из анализа, если gMFI контрольного антитела для конкретного мутанта 5T4 ниже, чем среднее gMFIControl Ab - 2,5 x SD среднего gMFIControl Ab (от всех мутантов); и необязательно

где данные исключаются из анализа, если остаток связывается с Z-баллом чуть ниже -1,5 (например, между -1,5 и -1,8, например, между -1,5 и -1,7 или например, между -1,5 и -1,6) и прогнозируется, что этот остаток будет погружен и пространственно отделен от большинства остатков, которые, как предполагается, будут экспонироваться на поверхности и для которых определяется потеря связывания или снижение связывания.

44. Антитело по п. 43, отличающееся тем, что перекрестное блокирующее

5T4-специфическое контрольное антитело на стадии iii) представляет собой биспецифическое антитело, включающее

- антигенсвязывающую область, которая содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 83, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 84 [A1];

и

- антигенсвязывающую область, которая содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 97, и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 98 [B12].

45. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанное антитело обладает пониженной способностью к интернализации, о чем свидетельствует пониженная цитотоксичность при конъюгировании с цитотоксическим фрагментом по сравнению с антителом, включающим переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 87 и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 88 [H8].

46. Антитело по п. 45, отличающееся тем, что цитотоксичность определяют с использованием процедуры, изложенной в примере 7, например, процедуры, включающей стадии:

- i) Обеспечения моновалентного антитела, содержащего первое плечо Fab антитела, как определено в любом из предшествующих пп., и второе плечо Fab, которое способно связываться с gp120, вирусным белком HIV (HIV-1 gp120) и конъюгировано с дуостатином-3,

- ii) Контакта клеток рака молочной железы MDA-MB-468 (клон ATCC HTB-132) или HCC1954 (клон ATCC CRL-1338) с указанным моновалентным антителом в течение 5 дней при 37 °C; и

- iii) Определения жизнеспособности клеток.

47. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, состоящей из:

- a) переменной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, 7 и 8 [059],

- b) переменной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 13, 14 и 15 [076],

- c) переменной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 20, 21 и 22 [085],

- d) переменной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности

CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 27, 28 и 29 [106],

е) варибельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 34, 35 и 36 [127],

ф) варибельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 41, 42 и 43 [207],

г) варибельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 48, 49 и 50 [226], и

h) варибельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 содержат в общей сложности не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или большинство 10 аминокислотных замен по сравнению с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, определенными в любом из пунктов от а) до г).

48. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает варибельную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, состоящей из:

а) варибельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, 7 и 8 [059],

б) варибельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 41, 42 и 43 [207],

с) варибельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 48, 49 и 50 [226]; и

д) варибельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 содержат в общей сложности не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или большинство 10 аминокислотных замен по сравнению с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, определенными в любом из пунктов от а) до с).

49. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, 7 и 8. [059].

50. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает варибельную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, состоящей из: варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 41, 42 и 43 [207].

51. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, состоящей из: переменной области тяжелой цепи (VH), содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 48, 49 и 50 [226].

52. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), выбранные из группы, включающей:

a) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 10, AAS и SEQ ID NO: 11, соответственно [059],

b) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 13, 14 и 15, соответственно; и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 17, DAS и SEQ ID NO: 18, соответственно [076],

c) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 20, 21 и 22, соответственно; и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 24, DAS и SEQ ID NO: 25, соответственно [085],

d) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 27, 28 и 29, соответственно; и переменную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 31, DVS и SEQ ID NO: 32, соответственно [106],

e) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 34, 35 и 36, соответственно; и переменной области легкой цепи (VL), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 38, DAS и SEQ ID NO: 39, соответственно [127],

f) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 41, 42 и 43, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 45, DAS и SEQ ID NO: 46, соответственно [207],

g) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно, и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 52, DAS и SEQ ID NO: 53, соответственно [226]; и

h) область вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL), каждая область содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 содержат в общей сложности не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или самое большее 10 аминокислотных замен по сравнению с последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3, определенными в любом из пунктов от а) до g).

53. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что шесть определяющих комплементарность областей (CDR) антигенсвязывающей области (областей), способных связываться с 5Т4, содержат в целом не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или самое большее 10 аминокислотных замен по сравнению с

i) последовательностями CDR SEQ ID NO: 6, 7, 8, 10, AAS и SEQ ID NO: 11 [059],

ii) последовательностями CDR SEQ ID NO: 41, 42, 43, 45, DAS и SEQ ID NO: 46 [207]; или

iii) последовательностями CDR SEQ ID NO: 48, 49, 50, 52, DAS и SEQ ID NO: 53 [226].

54. Антитело по любому из пп. 22-29, отличающееся тем, что 1, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 из указанных аминокислотных замен является/являются консервативными аминокислотными заменами.

55. Антитело по любому из предшествующих пп., в котором антитело содержит одну или две вариабельные области тяжелой цепи, в которых определяющая комплементарность область 3 (CDR3) содержит шесть последовательных аминокислотных остатков последовательности, представленной в SEQ ID NO: 102 (YYGMDV) [059, 207, 226].

56. Антитело по п. 55, отличающееся тем, что указанные шесть последовательных аминокислотных остатков представляют собой наибольшее количество С-концевых аминокислотных остатков в CDR3.

57. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5Т4, включает одну или две вариабельные области (VH) тяжелой цепи, содержащие последовательность CDR1 SEQ ID NO: 41 (GGSFSGYY), последовательность CDR2 SEQ ID NO: 103 (IDHSX1ST) и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 104 (AX2WFGELX3X4YYYGMDV) и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность CDR1 SEQ ID

NO: 105 (QSVSSX5), последовательность CDR2 DAS и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 46 (QQRSNWPLT), и где X1 представляет собой G или E, X2 представляет собой A или G, X3 представляет собой W или Y, X4 представляет собой D или H и X5 представляет собой Y или F [207, 226].

58. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, 7, и 8, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 10, AAS и SEQ ID NO: 11, соответственно [059].

59. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 41, 42 и 43, соответственно, и переменной области легкой цепи (VL), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 45, DAS и SEQ ID NO: 46, соответственно [207].

60. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно, и переменной области легкой цепи (VL), включающей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 52, DAS и 53, соответственно [226].

61. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, состоящей из:

а) переменной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 5 [059],

б) переменной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 12 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 12 [076],

с) переменной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 19 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей

мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 19 [085],

d) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 26 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 26 [106],

e) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 33 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 33 [127],

f) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 40 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 40 [207]; и

g) вариабельной области тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 47 [226].

62. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, при, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 5 [059].

63. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 40 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, при, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 40 [207].

64. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, при, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной

последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 47 [226].

65. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), выбранные из группы, включающей:

а) переменную область тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи (VL), включающей последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 9 [059],

б) переменную область тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 12 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 12, и переменную область легкой цепи (VL), включающей последовательность SEQ ID NO: 16 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 16 [076],

в) переменную область тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 19 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи (VL), включающей последовательность SEQ ID NO: 23 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 23 [085],

г) переменную область тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 26 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи (VL), включающей последовательность SEQ ID NO: 30 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по

меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 30 [106],

е) вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 33 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающей последовательность SEQ ID NO: 37 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 37 [127],

ф) вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 40 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 40, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающей последовательность SEQ ID NO: 44 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 44 [207],

г) вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающей последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 47, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающей последовательность SEQ ID NO: 51 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 51 [226].

66. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), выбранные из группы, включающей:

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность SEQ ID NO: 9 [059],

б) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую

последовательность SEQ ID NO: 16 [076],

с) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 19, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность SEQ ID NO: 23 [085],

d) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 26, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность SEQ ID NO: 30 [106],

e) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 33, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность SEQ ID NO: 37 [127],

f) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 40, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность SEQ ID NO: 44 [207]; и

g) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 47, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность SEQ ID NO: 51 [226].

67. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой полноразмерное антитело, такое как полноразмерное антитело IgG1.

68. Антитело по любому из предшествующих пп., которое представляет собой моновалентное антитело.

69. Антитело по любому из предшествующих пп., которое представляет собой бивалентное антитело.

70. Антитело по любому из предшествующих пп., которое является моноспецифическим антителом.

71. Антитело по любому из предшествующих пп., которое является биспецифическим антителом.

72. Антитело по любому из предшествующих пп., содержащее антигенсвязывающую область антитела, которое связывается с CD3, например, CD3ε человека (эпсилон), например, CD3ε человека (эпсилон), как указано в SEQ ID NO: 4.

73. Антитело по п. 72, отличающееся тем, что антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, включает:

варибельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 54, 55 и 56, соответственно; [анти-CD3 дикого типа (SP34/гуманизированный SP34, WO2015001085 (Genmab)) - последовательности VH

CDR];

и, необязательно

вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 58, GTN и 59, соответственно [анти-CD3 дикого типа, последовательности CDR VL].

74. Антитело по п. 72 или 73, отличающееся тем, что антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, включает:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую последовательность SEQ ID NO: 57, или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 57 [полноразмерная последовательность анти-CD3 - VH дикого типа];

и, необязательно

вариабельную область легкой цепи (VL), включающую последовательность SEQ ID NO: 60 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 60, [полноразмерная последовательность анти-CD3 - VL дикого типа].

75. Антитело по любому из пп. 72-74, отличающееся тем, что указанное антитело имеет более низкую аффинность связывания CD3ε человека, чем антитело, имеющее антигенсвязывающую область, содержащую последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 57, и последовательность VL, как приведена в SEQ ID NO: 60 [последовательности VH и VL анти-CD3 дикого типа (гуманизированные SP34, WO2015001085 (Genmab))], предпочтительно, где указанная аффинность, по меньшей мере, в 5 раз ниже, например, по меньшей мере, в 10 раз ниже, например, по меньшей мере, в 20 раз ниже, по меньшей мере, в 30 раз ниже, по меньшей мере, в 40 раз ниже, по меньшей мере, в 45 раз ниже или, например, по меньшей мере, в 50 раз ниже.

76. Антитело по любому из пп. 72-74, отличающееся тем, что указанная антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, с константой равновесной диссоциации KD в диапазоне 200-1000 нМ, например, в диапазоне 300-1000 нМ, в диапазоне 400 - 1000 нМ, в диапазоне 500 - 1000 нМ, в диапазоне 300 - 900 нМ, в диапазоне 400 - 900 нМ, в диапазоне 400 - 700 нМ, в диапазоне 500 - 900 нМ, в диапазоне 500-800 нМ, в диапазоне 500-700 нМ, в диапазоне 600-1000 нМ, в диапазоне 600-900 нМ, в диапазоне 600-800 нМ или в пределах диапазонов 600 - 700 нМ.

77. Антитело по п. 72 или 75, отличающееся тем, что указанная

антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, с константой равновесной диссоциации KD в диапазоне 1-100 нМ, например, в диапазоне 5-100 нМ, в диапазоне 10-100 нМ, в диапазоне от 1 до 80 нМ, в диапазоне от 1 до 60 нМ, в диапазоне от 1 до 40 нМ, в диапазоне от 1 до 20 нМ, в диапазоне от 5 до 80 нМ, в диапазоне от 5 до 60 нМ, в диапазоне от 5 до 40 нМ, в диапазоне от 5 до 20 нМ, в диапазоне от 10 до 80 нМ, в диапазоне от 10 до 60 нМ, в диапазоне от 10 до 40 нМ или в диапазоне от 10 до 20 нМ.

78. Антитело по любому из пп. 72-77, отличающееся тем, что

область связывания антигена, которая связывается с CD3, включает область варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность CDR1, последовательность CDR2 и последовательность CDR3,

варибельная область тяжелой цепи (VH) по сравнению с областью варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащей последовательность, указанную в SEQ ID NO: 57, имеет аминокислотную замену в одной из последовательностей CDR, причем замена находится в положении выбранные из группы, состоящей из: T31, N57, H101, G105, S110 и Y114, положения пронумерованы в соответствии с последовательностью SEQ ID NO: 57 [VH_huCD3-H1L1]; и

варибельная область легкой цепи (VL) дикого типа содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 58, GTN и SEQ ID NO: 59, соответственно.

79. Антитело по п. 72, отличающееся тем, что CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH) антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3, содержат в общей сложности не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен по сравнению с CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 57.

80. Антитело по п. 72 или 73, отличающееся тем, что аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH) антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3, имеют идентичность последовательностей, по меньшей мере, на 95%, например, по меньшей мере, 96% идентичности последовательностей, по меньшей мере, 97% идентичности последовательностей, по меньшей мере, 98% идентичности последовательностей или, по меньшей мере, 99% идентичности последовательностей с аминокислотными последовательностями CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH) дикого типа, где идентичность последовательностей вычисляется на основе выравнивания аминокислотной последовательности, состоящей из последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH) антигенсвязывающей области, которая связывается с CD, с аминокислотной последовательностью, содержащей

последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH) дикого типа.

81. Антитело по пп. 72-74, отличающееся тем, что антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит мутацию, выбранную из группы, состоящей из: T31M, T31P, N57E, H101G, H101N, G105P, S110A, S110G, Y114M, Y114R, Y114V.

82. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что когда указанное антитело представляет собой биспецифическое антитело, которое лишено или имеет пониженную Fc-опосредованную эффекторную функцию («инертное» антитело), и включает антигенсвязывающую область антитела, которое связывает к CD3, и антитело:

а) способно опосредовать зависящую от концентрации цитотоксичность клеток SK-OV-3 при использовании очищенных PBMC или Т-клеток в качестве эффекторных клеток, например, при анализе, как описано в Примере 14 в данном документе,

б) способно опосредовать зависящую от концентрации цитотоксичность клеток MDA-MB-231 при использовании очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток, например, при анализе, как описано в Примере 13 в данном документе,

с) способно активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии опухолевых клеток MDA-MB-231; например, при анализе, как описано в Примере 13 в данном документе,

д) способно активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии опухолевых клеток BxPC-3, PANC-1, Ca Ski и/или SiHa; например, при анализе, как описано в Примере 17 в данном документе,

е) способно вызывать цитотоксичность опухолевых клеток BxPC-3, PANC-1, Ca Ski и/или SiHa при использовании очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток, например, при анализе, как описано в примере 17 в данном документе; и/или

ф) демонстрирует противоопухолевую активность, такую как замедленное разрастание опухоли, в модели мышинового ксенотрансплантата с восстановлением гуманизированных иммунных гемопоэтических стволовых клеток, такой как NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, инокулированная опухолевыми клетками человека MDA-MB-231; например, при определении, как описано в Примере 15.

83. Антитело по п. 82, отличающееся тем, что способность антитела опосредовать зависящую от концентрации цитотоксичность клеток SK-OV-3 определяют в анализе цитотоксичности *in vitro*, включающем стадии:

i) выделения мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) или Т-клеток из лейкоцитов здоровых доноров,

ii) предоставления

первого набора образцов, где каждый образец содержит РВМС и клетки аденокарциномы яичника человека SK-OV-3, и где отношения РВМС: клетки SK-OV-3 в указанных образцах составляют 1: 2, 1: 1, 2: 1, 4: 1, 8: 1 и 12: 1; и

второго набора образцов, где каждый образец содержит Т-клетки и клетки аденокарциномы яичника человека SK-OV-3, и где соотношения Т-клетки: клетки SK-OV-3 в указанных образцах составляют 1: 2, 1: 1, 2: 1, 4: 1 и 8: 1

iii) добавления антитела к каждому набору образцов в концентрациях от 0,0128 нг/мл до 1000 нг/мл и инкубация образцов в течение 72 часов при 37 °С; и затем

iv) оценки жизнеспособности клеток SK-OV-3 с использованием резазурина (7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он 10-оксид).

84. Антитело по п. 82, отличающееся тем, что способность активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии опухолевых клеток MDA-MB-231 определяют с помощью анализа, включающего стадии:

i) Выделения Т-клеток из лейкоцитов здоровых доноров человека,
ii) Предоставления набора образцов, каждый из которых содержит Т-клетки и клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, и где соотношение Т-клетки: клетки MDA-MB-231 в указанных образцах составляет 8:1,

iii) добавления антитела к набору образцов в концентрациях от 0,0128 нг/мл до 1000 нг/мл и инкубация образцов в течение 72 часов при 37 °С,

iv) окрашивания Т-клеток флуоресцентно мечеными антителами против маркеров активации Т-клеток, таких как антитела CD69-APC, CD25-PE-Cy7 и CD279/PD1-BV604, путем инкубации с указанными антителами в течение 30 минут при 4 °С; и

v) анализа образцов методом проточной цитометрии.

85. Антитело по п. 82, отличающееся тем, что активацию Т-клеток *in vitro* в присутствии опухолевых клеток ВхРС-3, PANC-1, Ca Ski и/или SiHa определяют с помощью процедуры, включающей стадии:

i) Предоставления Т-клеток, выделенных из лейкоцитов здоровых доноров человека,

ii) Предоставления набора образцов, где каждый образец содержит указанные Т-клетки и опухолевые клетки ВхРС-3, PANC-1, Ca Ski или SiHa, и где соотношение Т-клетки: опухолевые клетки в указанных образцах составляет 4: 1,

iii) добавления антитела к набору образцов в концентрациях от 0,0128 нг/мл до 5000 нг/мл (например, 5-кратные разведения) и инкубация образцов в течение 72 часов при 37 °С,

iv) сбора из каждого образца 110 мкл надосадочной жидкости, содержащего Т-

клетки, и окрашивание Т-клеток флуоресцентно мечеными антителами против Т-клеточных маркеров, таких как CD3-eFluor450, CD4-APC-eFluor780, DC8-AF700, и антителами против маркеров Т-клеток, такие как антитела 69-APC, CD25-PE-Cy7 и CD279/PD1-BV604, путем инкубации с указанными антителами в течение 30 минут при 4 °С; и

v) анализа образцов методом проточной цитометрии.

86. Антитело по п. 82, отличающееся тем, что способность индуцировать цитотоксичность опухолевых клеток ВхРС-3, PANC-1, Ca Ski и/или SiHa определяют с помощью процедуры, включающей стадии:

i) Предоставления Т-клеток, выделенных из лейкоцитов здоровых доноров человека,

ii) Предоставления набора тестовых образцов и контрольных образцов, каждый из которых содержит указанные Т-клетки и опухолевые клетки ВхРС-3, PANC-1, Ca Ski или SiHa, которым дали прикрепиться к дну 96-луночного культурального планшета и где соотношение Т-клетки: опухолевые клетки в указанных образцах составляет 4: 1,

iii) добавления антитела к набору тестируемых образцов в концентрациях от 0,0128 нг/мл до 5000 нг/мл (например, 5-кратные разведения), в то время как контрольные образцы остаются необработанными или инкубируются с 5 мкМ стауроспорином, и инкубации всех образцов в течение 72 часов при 37°C,

iv) Инкубации прикрепленных клеток в 10% (масс./масс.) 7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он 10-оксиде (резазурин) в среде RPMI-1640 с добавлением 10% (масс./масс.) донорской бычьей сыворотки с железом и пенициллином/стрептомицином при 37°C в течение 4 часов,

v) Измерения оптической плотности клеток; принятия поглощения клеток, инкубированных со стауроспорином, за 0% жизнеспособности, а необработанных клеток за 100% жизнеспособности и расчета процента жизнеспособных клеток как

$$\times 100 \% \text{ жизнеспособных клеток} = \left(\frac{[\text{поглощение образца} - \text{поглощение клеток, обработанных стауроспорином}]}{[\text{поглощение необработанных клеток} - \text{поглощение клеток, обработанных стауроспорином}]} \right)$$

87. Антитело по любому из пп. 72 и 78-84, отличающееся тем, что антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, включает:

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 61, 55 и 56 [VH CDR1-T31P + VH CDR 2,3] дикого типа, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), включающую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], или

b) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 63, 55 и 56 [VH CDR1-T31M + VH CDR 2,3], соответственно, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно, или

c) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 65 и 56 [VH CDR-N57E + VH CDR 1,3 дикого типа], соответственно, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно, или

d) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 67 [CDR 1,2 VH дикого типа + VH CDR3-H101G], соответственно, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно.

e) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 69 [CDR 1, 2 VH дикого типа + VH CDR3-H101N], соответственно, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно;

f) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 71 [CDR 1,2 VH дикого типа + VH CDR3-G105P], соответственно, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно;

g) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 73 [CDR 1, 2 VH дикого типа + VH CDR3-S110A], соответственно, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59,

соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно, или

h) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 75 [CDR 1,2 VH дикого типа + VH CDR3-S110G], соответственно, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно,

i) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 77 [CDR 1,2 VH дикого типа + VH CDR3-Y114V], соответственно, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно, или

j) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 79 [CDR 1,2 VH дикого типа + VH CDR3-Y114M], соответственно, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно, или

k) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 81 [CDR 1,2 VH дикого типа + VH CDR3-Y114R], соответственно, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно.

88. Антитело по любому из пп. 72 и 78-85, отличающееся тем, что антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, включает варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID. NO: 54, 55 и 67 [CDR 1,2 VH дикого типа + VH CDR3-H101G], соответственно, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1, 2, 3 VL дикого типа], соответственно.

89. Антитело по любому из пп. 72 и 78-85, отличающееся тем, что

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 6, 7 и 8, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL) содержащие последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 10, AAS и SEQ ID NO: 11, соответственно [059];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 67 [CDR 1, 2 VH дикого типа + VH CDR3-H101G], соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно.

90. Антитело по любому из пп. 72 и 78-85, отличающееся тем, что

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 41, 42 и 43, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащие последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 45, DAS и 46, соответственно [207];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 67 [CDR 1, 2 VH дикого типа + VH CDR3-H101G], соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно.

91. Антитело по любому из пп. 47 и 51-59, отличающееся тем, что

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 52, DAS и 53, соответственно [226];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие

последовательности, указанные в SEQ ID NO: 54, 55 и 67 [CDR 1, 2 VH дикого типа + VH CDR3-H101G], соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 58, последовательность GTN и последовательность, указанную в SEQ ID NO: 59, соответственно [CDR 1,2,3 VL дикого типа], соответственно.

92. Антитело по любому из пп. 72 и 78-91, отличающееся тем, что антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, включает последовательность VH и последовательность VL, выбранные из группы, состоящей из:

- a) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 62 [полноразмерная последовательность VH T31P], и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 60 [полноразмерная последовательность дикого типа],
- b) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 64 [полноразмерная последовательность VH T31M], и последовательности VL, указанная в SEQ ID NO: 60,
- c) последовательности VH, указанная в SEQ ID NO: 66 [полноразмерная последовательность VH N57E], и последовательности VL, указанная в SEQ ID NO: 60,
- d) последовательности VH, указанная в SEQ ID NO: 68 [полноразмерная последовательность VH H101G], и последовательности VL, указанная в SEQ ID NO: 60,
- e) последовательности VH, указанная в SEQ ID NO: 70 [полноразмерная последовательность VH H101N], и последовательности VL, указанная в SEQ ID NO: 60,
- f) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 72 [полноразмерная последовательность VH G105P], и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 60,
- g) последовательности VH, указанная в SEQ ID NO: 74 [полноразмерная последовательность VH S110A], и последовательности VL, указанная в SEQ ID NO: 60,
- h) последовательности VH, указанная в SEQ ID NO: 76 [полноразмерная последовательность VH S110G], и последовательности VL, указанная в SEQ ID NO: 60,
- i) последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 78 [полноразмерная последовательность VH Y114V], и последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 60,
- j) последовательности VH, указанная в SEQ ID NO: 80 [полноразмерная последовательность VH Y114M], и последовательности VL, указанная в SEQ ID NO: 60; и
- k) последовательности VH, указанная в SEQ ID NO: 82 [полноразмерная последовательность VH Y114R], и последовательности VL, указанная в SEQ ID NO: 60.

93. Антитело по любому из пп. 72 и 78-92, отличающееся тем, что антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 68 [полноразмерная последовательность VH H101G], и последовательность VL, как указано в SEQ ID NO: 60.

94. Антитело по любому из пп. 78-93, отличающееся тем, что

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 5 [059 - полноразмерная последовательность VH];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 68 [полноразмерная последовательность VH H101G], и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 60.

95. Антитело по любому из пп. 72 и 78-93, отличающееся тем, что

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 40 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 40 [207 - полноразмерная последовательность VH];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 68 [полноразмерная последовательность VH H101G], и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 60.

96. Антитело по любому из пп. 47 и 51-64, отличающееся тем, что

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 47 [226 - полноразмерная последовательность VH];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 68 [полноразмерная последовательность VH H101G], и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 60.

97. Антитело по любому из пп. 72 и 78-94, отличающееся тем, что

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 5 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 5 и легкой области тяжелой цепи (VL), содержащей последовательность SEQ ID NO: 9 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% аминокислотной последовательности идентичности последовательности SEQ ID NO: 9 [059];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 68 [полноразмерная последовательность VH H101G], и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 60.

98. Антитело по любому из пп. 72, 78-93 и 95, отличающееся тем, что

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 40 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 40, и легкой области тяжелой цепи (VL), содержащей последовательность SEQ ID NO: 44 или последовательность, имеющую не менее 90%, не менее 95%, не менее 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 44 [207 - полноразмерные последовательности VH + VL];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 68 [полноразмерная последовательность VH H101G], и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 60.

99. Антитело по любому из пп. 72, 78-93 и 96, отличающееся тем, что

антигенсвязывающая область, способная связываться с 5T4, включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 47 или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 47, и легкой области тяжелой цепи (VL), содержащей последовательность SEQ ID NO: 51 или последовательность, имеющую не менее 90%, не менее 95%, не менее 97% или, по меньшей мере, 99% идентичности по аминокислотной последовательности с последовательностью SEQ ID

NO: 51 [226 - полноразмерные последовательности VH + VL];

и

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 68 [полноразмерная последовательность VH H101G], и последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 60.

100. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что каждая антигенсвязывающая область включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), и каждая из указанных переменных областей содержит три последовательности CDR, CDR1, CDR2. и CDR3, соответственно, и четыре кармашные последовательности, FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно.

101. Антитело по п. 100, отличающееся тем, что антитело включает две константные области тяжелой цепи (CH) и две константные области легкой цепи (CL).

102. Антитело по п. 100 или 101, отличающееся тем, что указанное антитело включает первую и вторую тяжелую цепь, каждая из указанных первой и второй тяжелых цепей включает, по меньшей мере, шарнирную область, область CH2 и CH3, причем в указанной первой тяжелой цепи, по меньшей мере, заменена одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, и в указанной второй тяжелой цепи, по меньшей мере, одна из аминокислот в положениях, соответствующих положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, были заменены, причем указанные замены указанной первой и указанной второй тяжелой цепи находятся в разных положениях, и положения аминокислот пронумерованы согласно нумерации EU.

103. Антитело по любому из пп. 100-102, отличающееся тем, что аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG человека представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи, или наоборот.

104. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, и где как в первой, так и во второй тяжелой цепи аминокислотные остатки в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU представляет собой F и E, соответственно.

105. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, и где как в первой, так и во второй

тяжелой цепи аминокислотный остаток в положении, соответствующем положению D265 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации EU, представляет собой А.

106. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что

а) антигенсвязывающая(ие) область(и), способная связываться с 5Т4, является гуманизированной и/или

б) антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, если присутствует, гуманизирована.

107. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что

а) антигенсвязывающая(ие) область(и), способная связываться с 5Т4, является/являются человеческими, и/или

б) антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, если присутствует, является человеческой.

108. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что

а) антигенсвязывающая(ие) область(и), способная связываться с 5Т4, является/являются химерными, и/или

б) антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, если присутствует, является химерной.

109. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанное антитело содержит первую и, необязательно, вторую тяжелую цепь, и где первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь, если она присутствует, модифицированы/модифицированы таким образом, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с идентичным немодифицированным антителом.

110. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанное антитело содержит легкую цепь каппа (κ).

111. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанное антитело содержит легкую цепь лямбда (λ).

112. Антитело по любому из предшествующих пп., отличающееся тем, что указанное антитело содержит легкую цепь лямбда (λ) и легкую цепь каппа (κ); например, антитело с тяжелой цепью и легкой лямбда-цепью, которые содержат связывающую область, способную связываться с CD3, и тяжелую цепь и легкую каппа-цепь, которые содержат связывающую область, способную связываться с 5Т4.

113. Иммуноконъюгат или конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий антитело по любому из предшествующих пп. и терапевтическую составляющую, такую как цитотоксический агент, химиотерапевтическое лекарственное

средство, цитокин, иммунодепрессант, антибиотик или радиоизотоп.

114. Нуклеотидная конструкция, содержащая

a) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4, как определено в любом из пп. 1-113, и/или

b) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4, как определено в любом из пп. 72-113.

115. Нуклеотидная конструкция по п. 114, дополнительно включающая

a) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в любом из пп. 72-113; и/или

b) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в любом из пп. 72-113.

116. Экспрессирующий вектор, включающий

a) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4, как определено в любом из пп. 1-112, и/или

b) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с 5T4, как определено в любом из пп. 1-112.

117. Экспрессирующий вектор по п. 116, дополнительно включающий

a) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в любом из пп. 72-112; и/или

b) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в любом из пп. 72-112.

118. Клетка, содержащая нуклеотидную конструкцию, как определено в любом из пп. 114-115, или экспрессирующий вектор, как определено в пп. 116 или 117, такая как клетка, которая была получена путем трансфекции клетки-хозяина указанной нуклеотидной конструкцией или экспрессирующим вектором, такая как рекомбинантная клетка-хозяин.

119. Клетка по п. 118, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин имеет

человеческое происхождение, например, клетка эмбриональной почки человека (НЕК), такая как клетка НЕК/Expi, или имеет происхождение от грызунов, например, клетка яичника китайского хомячка, например, клетка CHO/N50.

120. Композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-112.

121. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, как определено в любом из пп. 1-112, и фармацевтически приемлемый носитель.

122. Антитело по любому из пп. 1-112 для применения в качестве лекарственного средства.

123. Антитело по любому из пп. 1-112, предназначенное для лечения заболевания.

124. Антитело для применения по п. 122 или 123, отличающееся тем, что заболевание представляет собой онкологическое заболевание.

125. Антитело для применения по п. 124, отличающееся тем, что онкологическое заболевание характеризуется экспрессией 5T4, по меньшей мере, в некоторых опухолевых клетках.

126. Антитело для применения по любому из пп. 122-125, отличающееся тем, что онкологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из рака почки/почек, рака молочной железы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака матки/эндометрия/шейки матки, рака легкого, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, лимфомы, острого миелоидного лейкоза.

127. Способ лечения заболевания, включающий введение антитела, определенного в любом из пп. 1-112, композиции по п.120 или фармацевтической композиции по п.121 нуждающемуся в этом объекту.

128. Способ по п. 127, при этом указанный способ предназначен для лечения онкологического заболевания.

129. Способ по п. 128, отличающийся тем, что онкологическое заболевание выбрано из группы, состоящей из рака почки/почек, рака молочной железы, колоректального рака, рака предстательной железы, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака матки/эндометрия/шейки матки, рака легкого, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, лимфомы, острого миелоидного лейкоза.

130. Способ получения антитела по любому из пп. 1-112, включающий стадии:

а) культивирования клетки-хозяина, содержащей экспрессирующий вектор, как определено в пп. 114 или 117; и

b) и очистки указанного антитела из культуральной среды.

131. Способ получения антитела по любому из пп. 1-112, включающий стадии:

a) Обеспечения антитела, способного связываться с 5T4, путем культивирования клетки-хозяина, содержащей экспрессирующий вектор, как определено в п. 116 или 117, в условиях, позволяющих экспрессию антитела, способного связываться с 5T4, и очистки антитела, способного связываться с 5T4, из культуральной среды;

b) Обеспечения антитела, способного связываться с CD3, путем культивирования клетки-хозяина, включающей экспрессирующий вектор, содержащий

I) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в любом из пп. 72-112; и

II) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, включающую антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в любом из пп. 72-112;

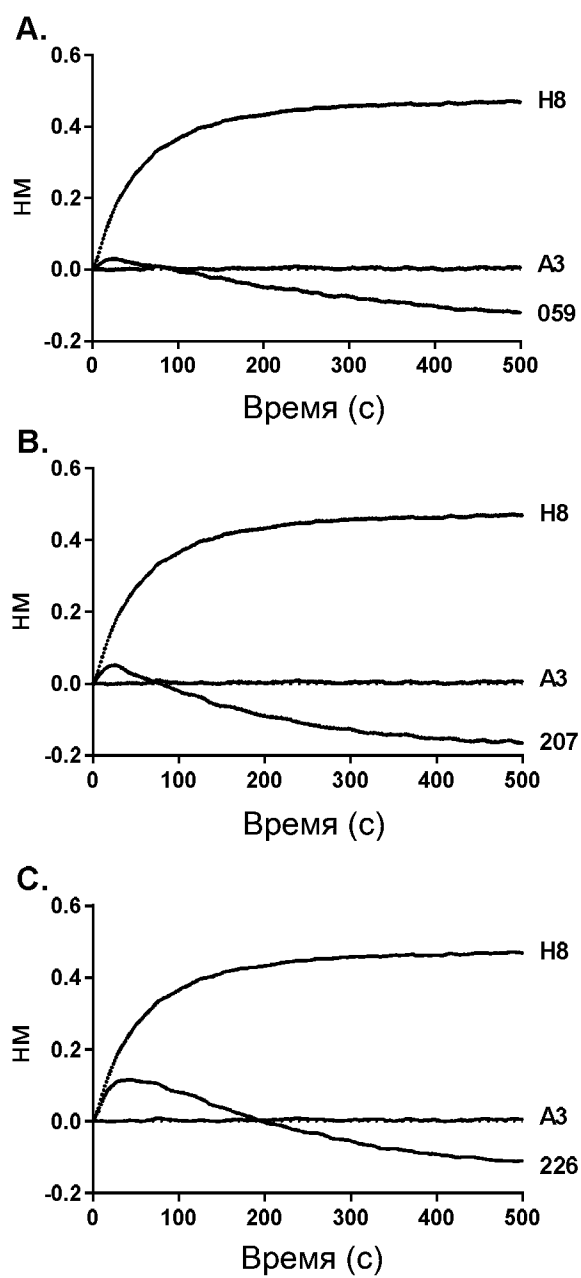
в условиях, позволяющих экспрессию антитела, способного связываться с CD3, и очистки антитела, способного связываться с CD3, из культуральной среды;

c) инкубирования указанного антитела, способного связываться с 5T4, вместе с указанным антителом, способным связываться с CD3, в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы позволить цистеинам в шарнирной области подвергнуться изомеризации дисульфидной связи, и

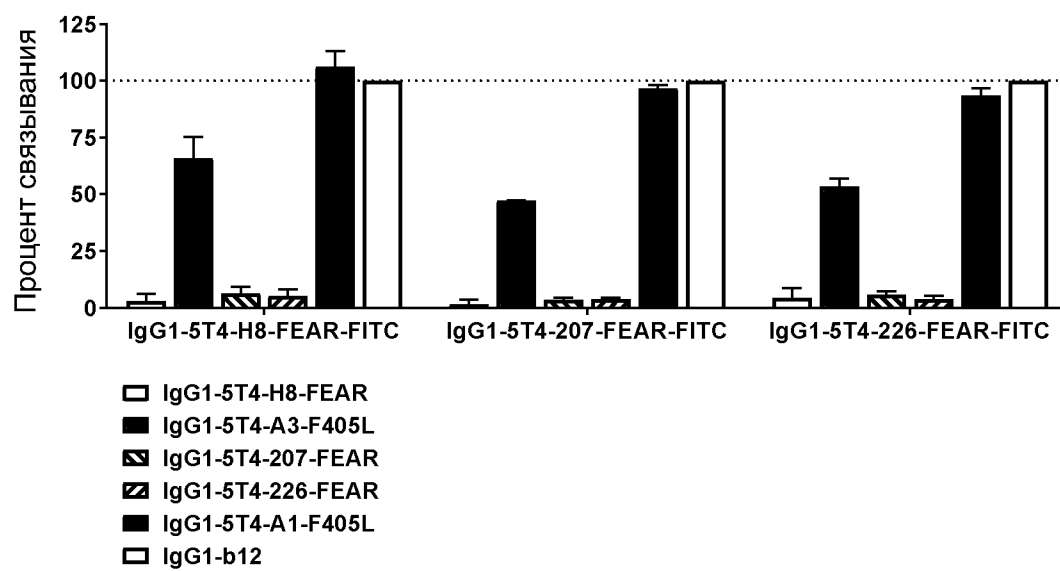
d) получения указанного антитела.

132. Набор, такой как набор для применения в качестве сопутствующей диагностики/для выявления среди группы пациентов тех пациентов, которые имеют склонность к ответу на лечение антителом, определенное в любом из пп. 1-112, или иммуноконъюгатом или конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC), как определено в п. 113, или для прогнозирования эффективности указанного антитела, или иммуноконъюгата, или ADC, при применении для лечения пациента, включающий антитело, определенное в любом из пп. 1-112; и инструкции по применению указанного набора.

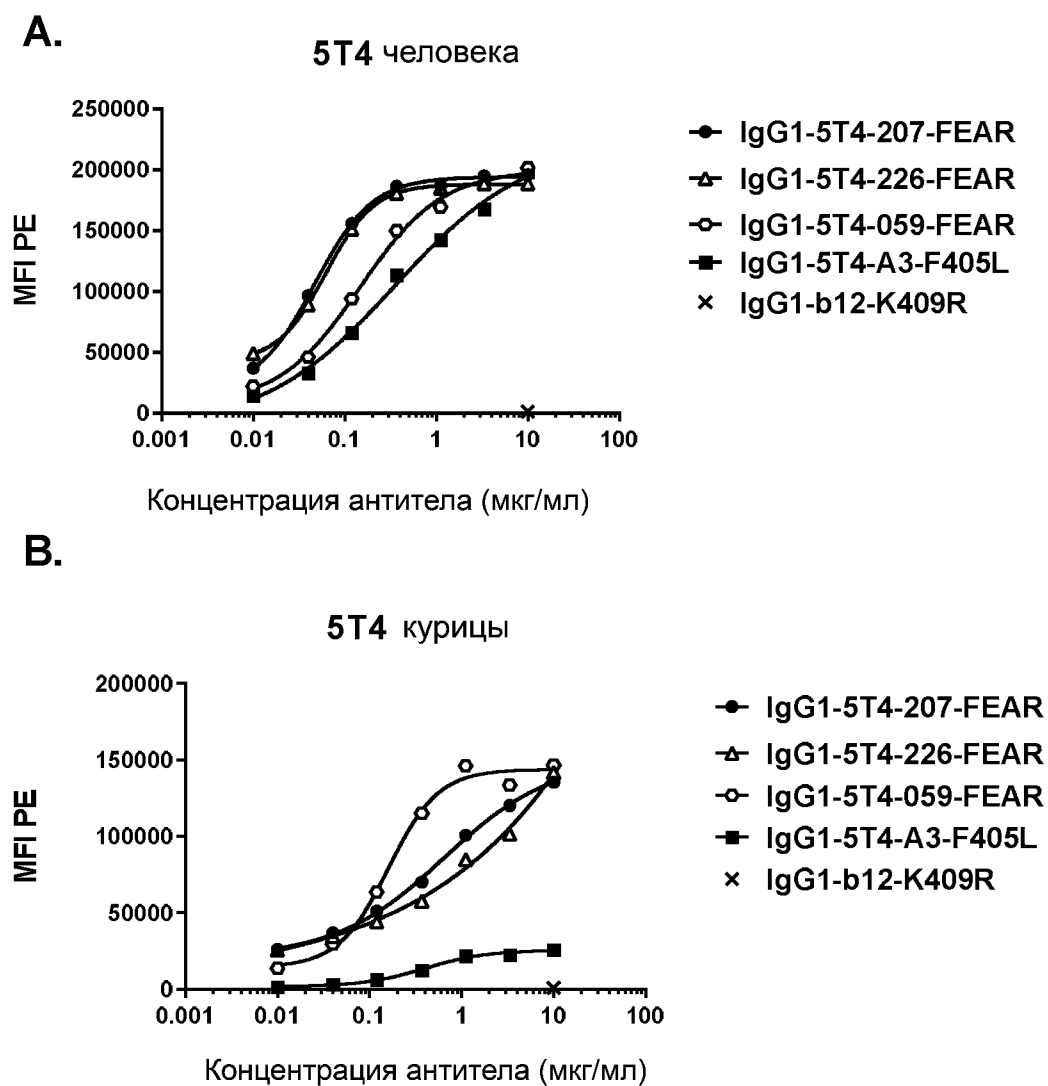
133. Антиидиотипическое антитело, которое связывается с антигенсвязывающей областью, способной связываться с 5T4, определенное в любом из пп. 1-112.



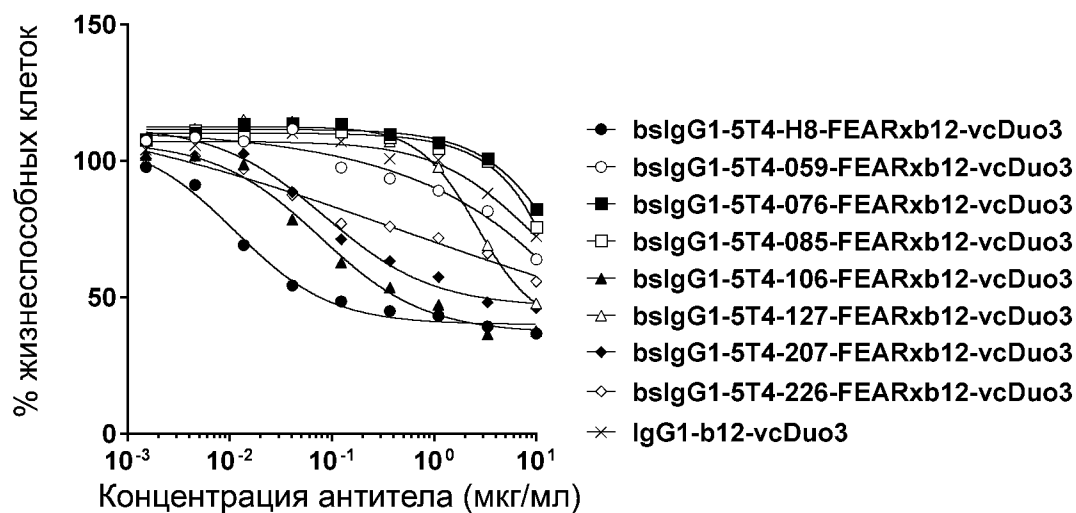
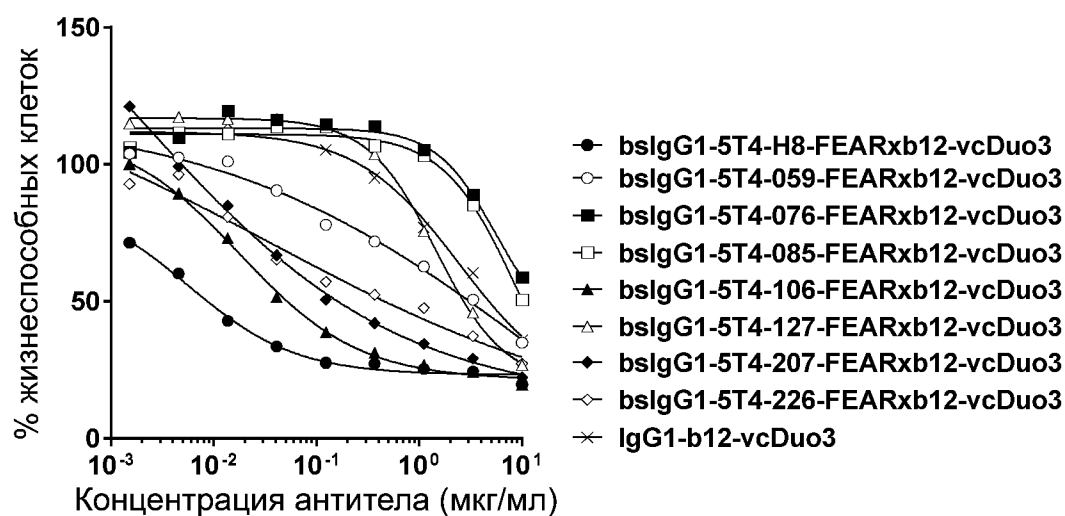
Фиг. 1

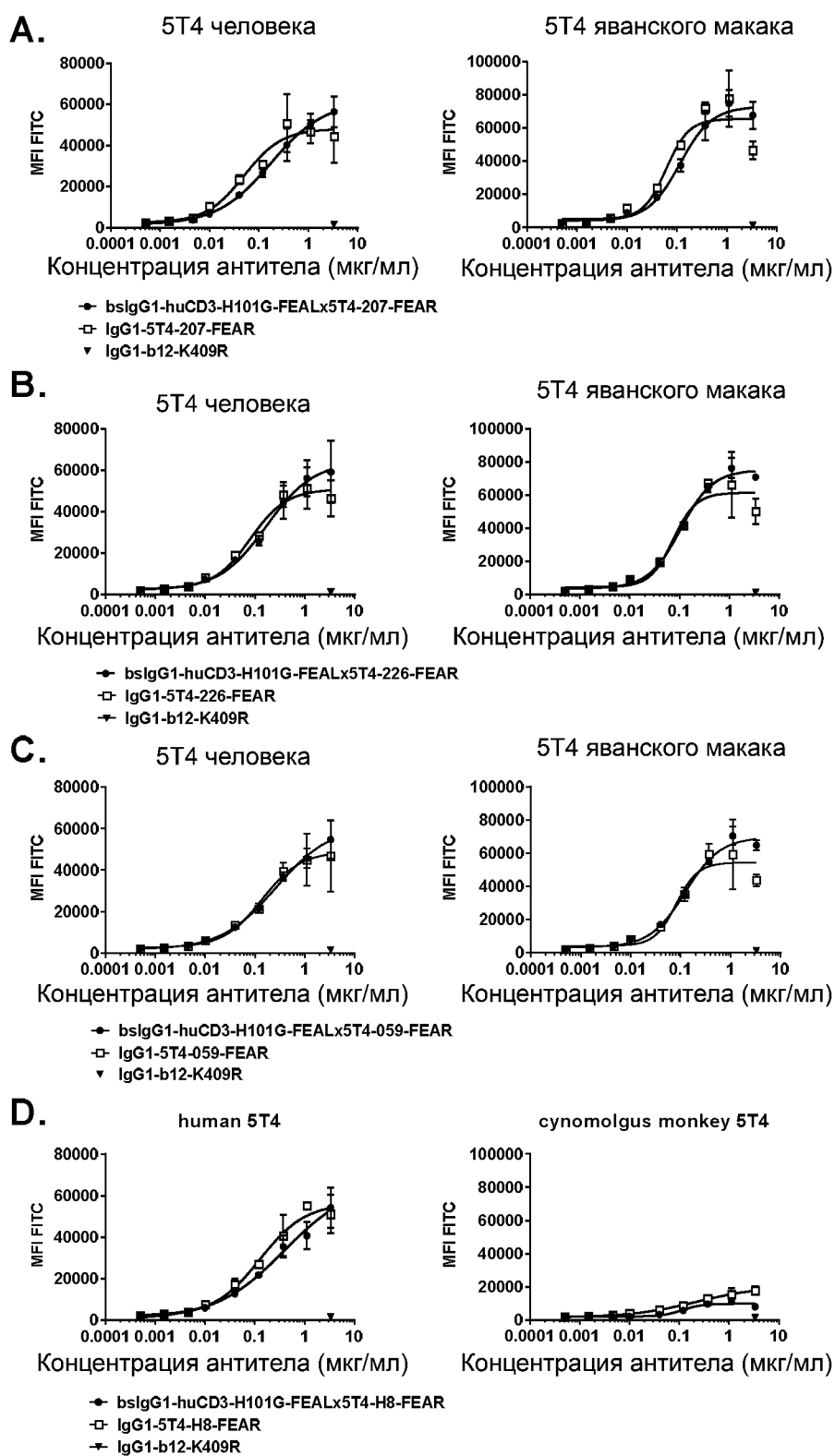


Фиг. 2

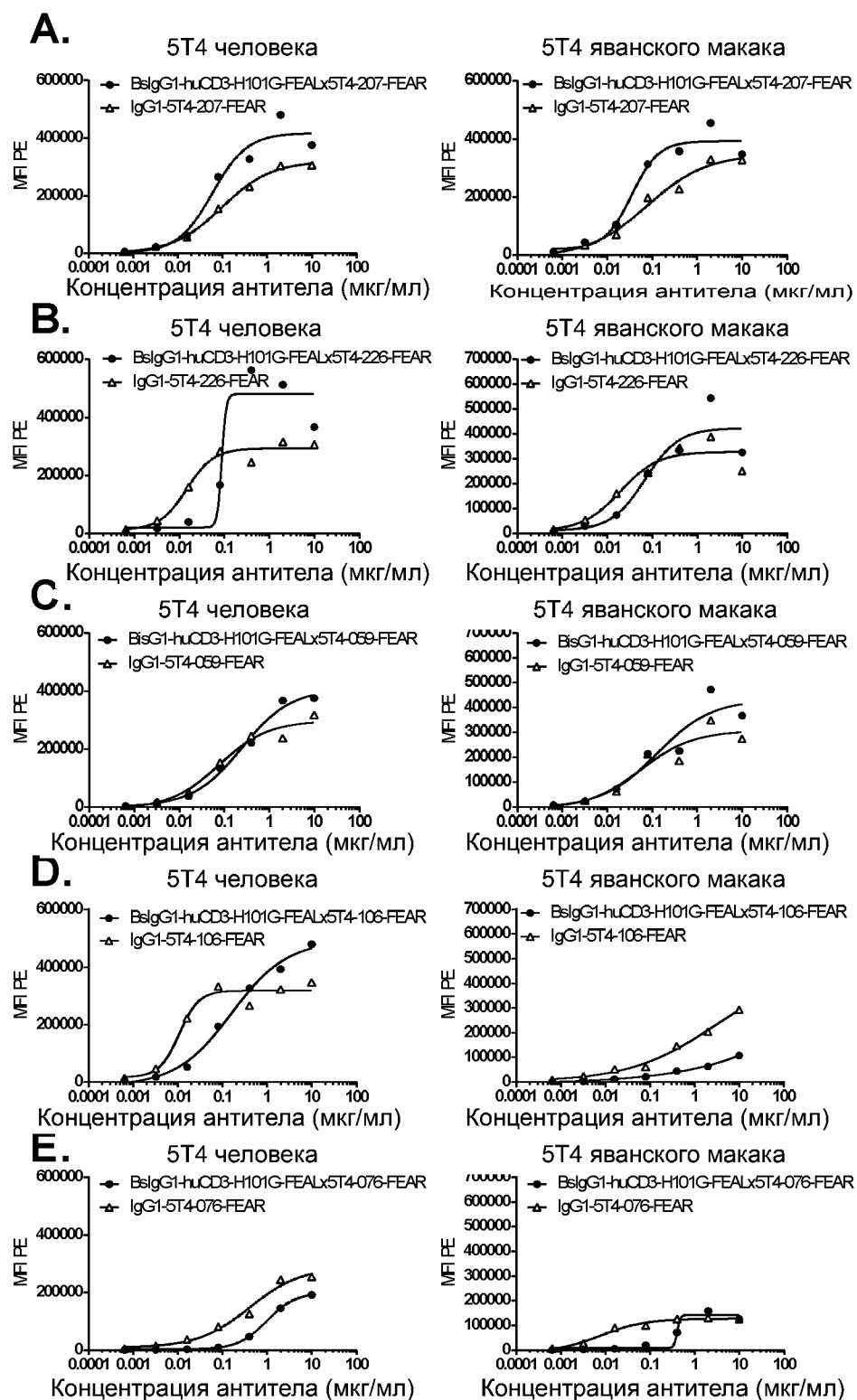


Фиг. 3

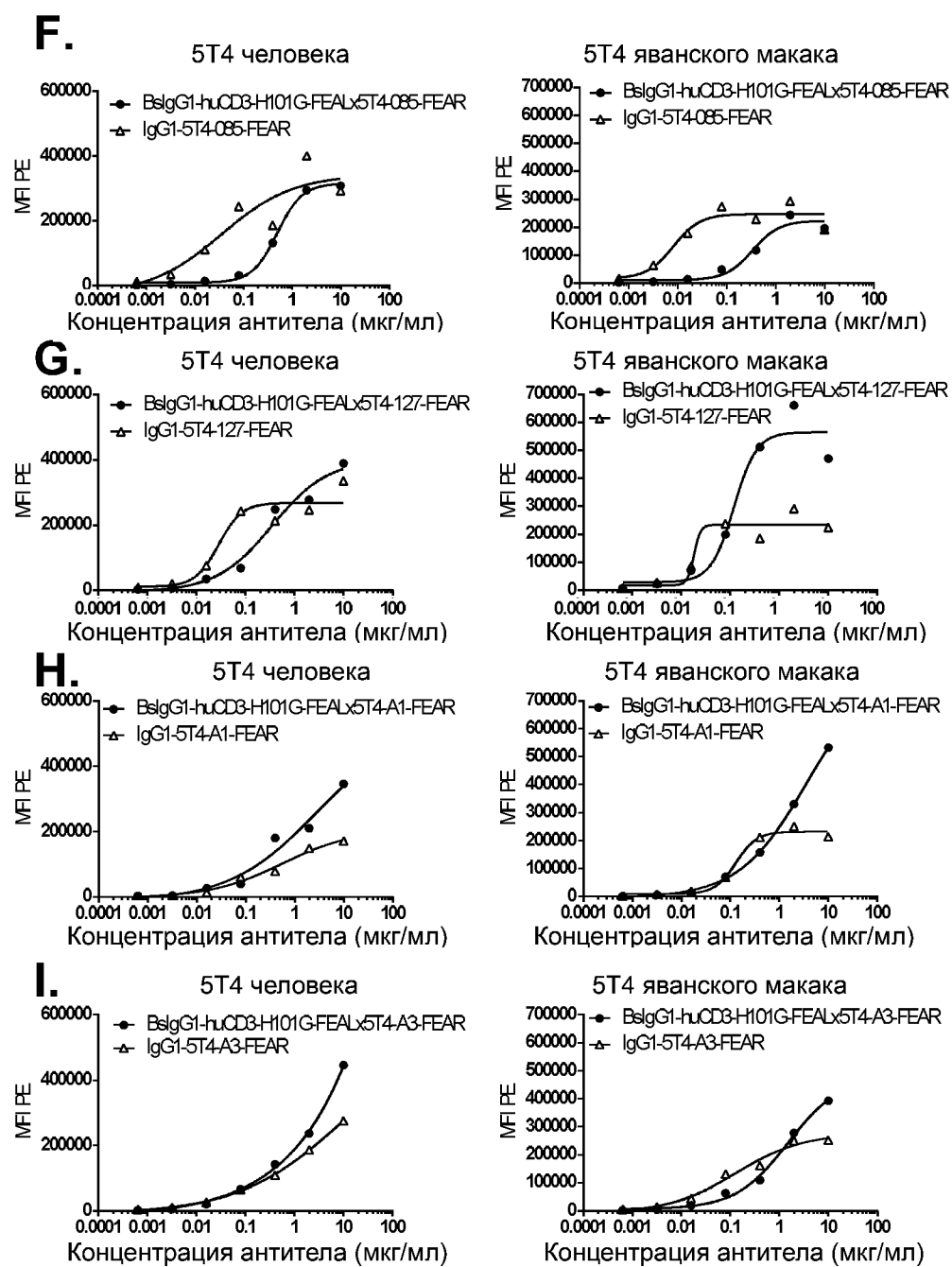
A.**MDA-MB-468****B.****HCC1954****Фиг. 4**



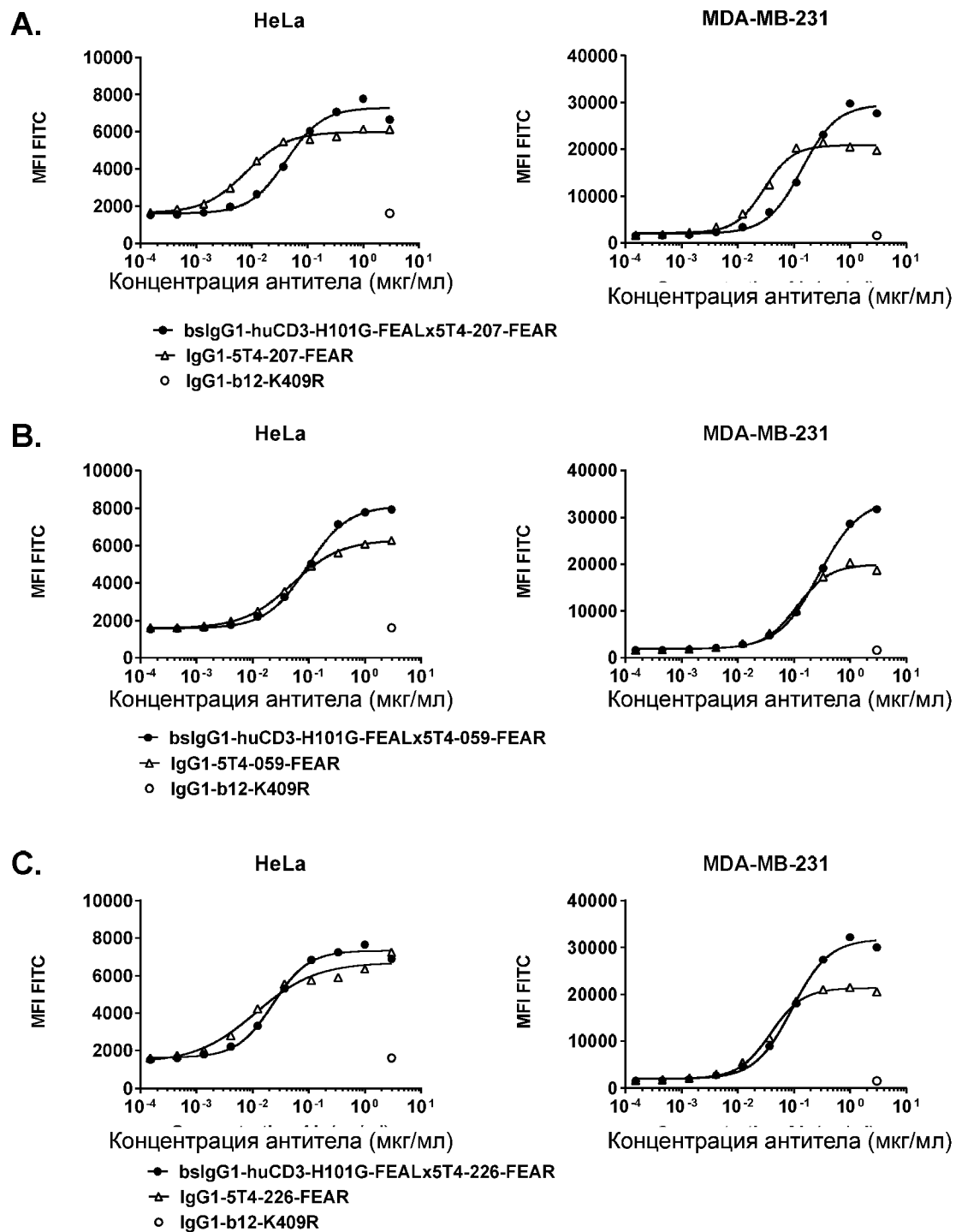
Фиг. 5(1)



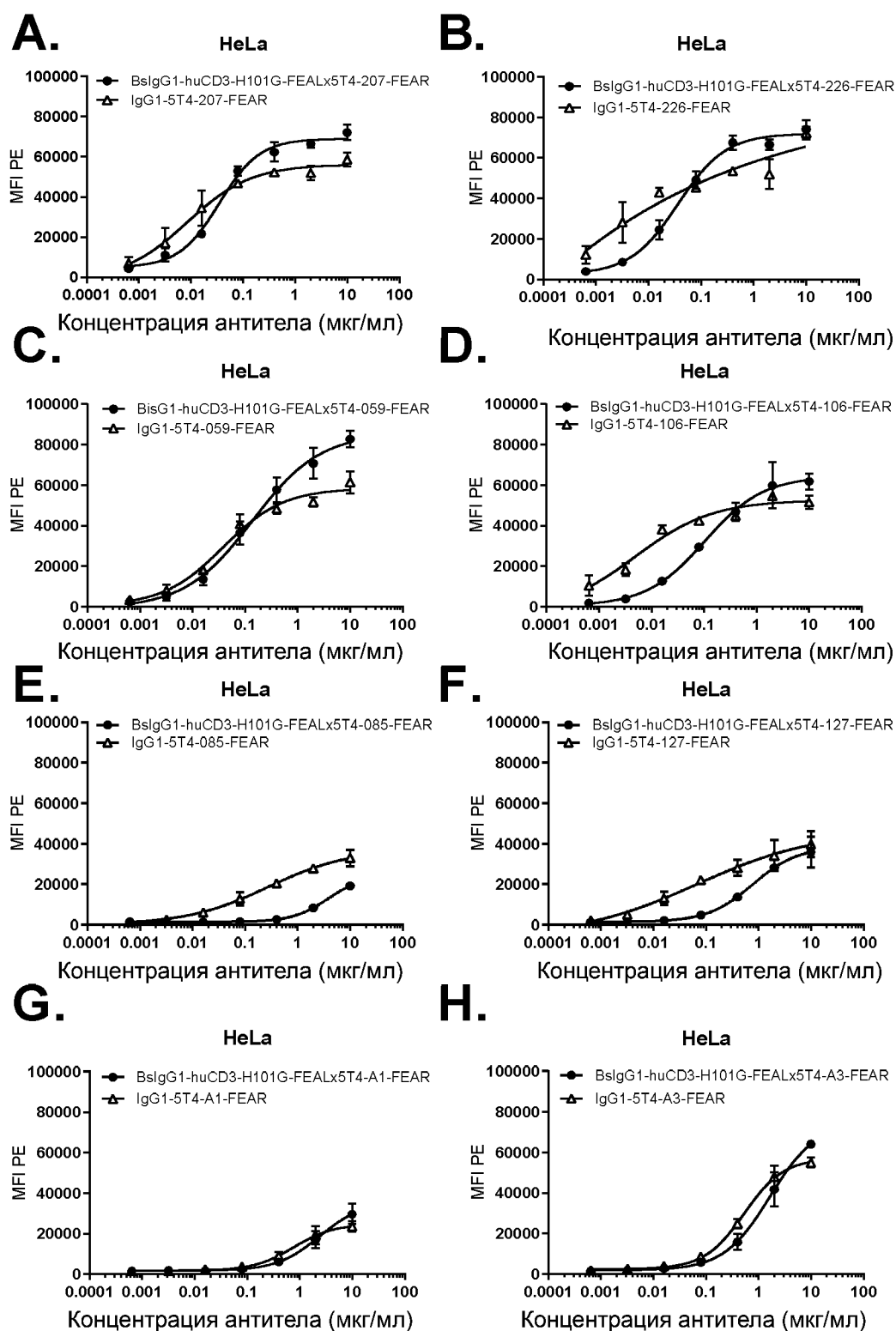
Фиг. 5 (II)



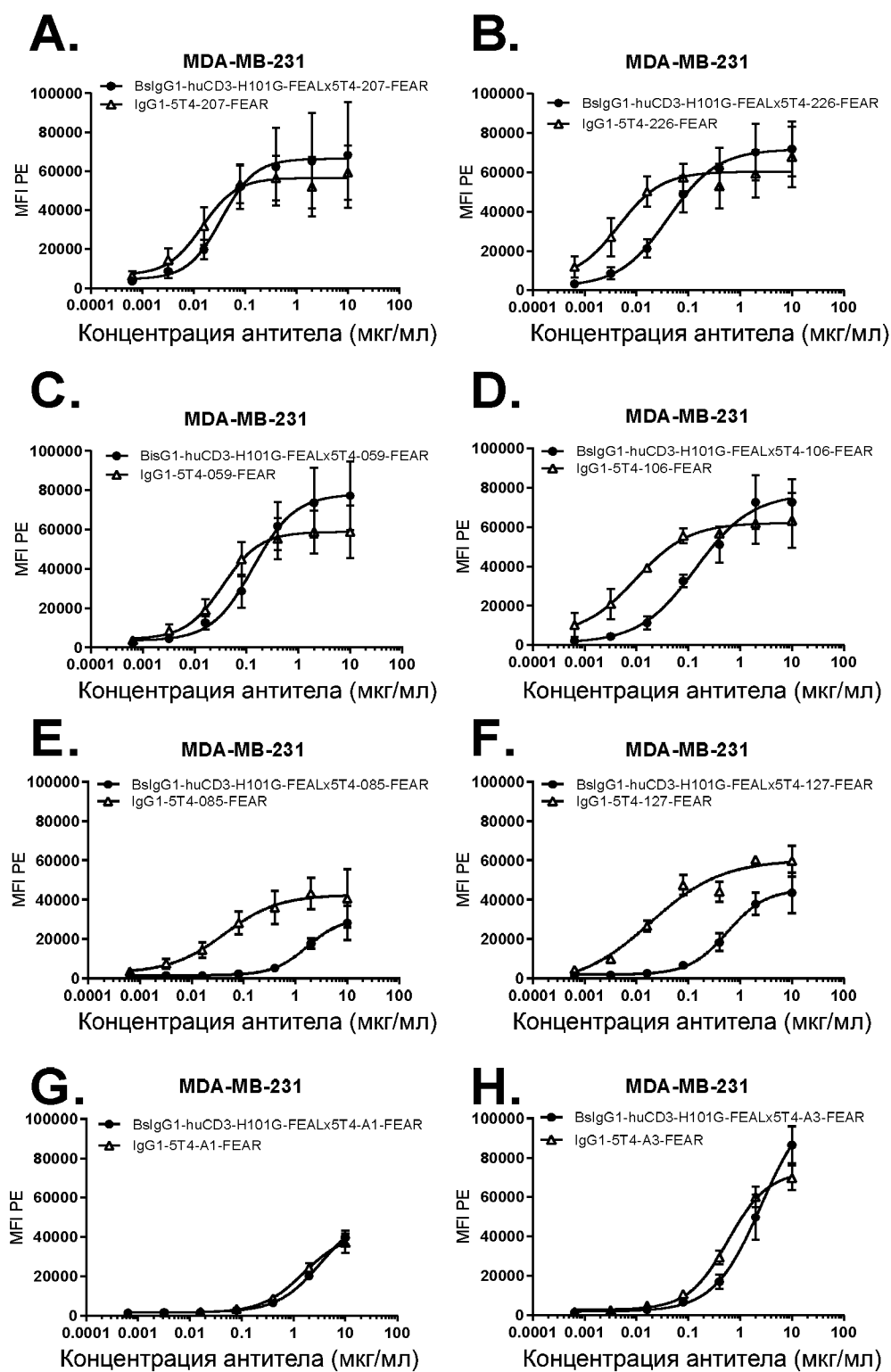
Фиг. 5(II) Продолжение



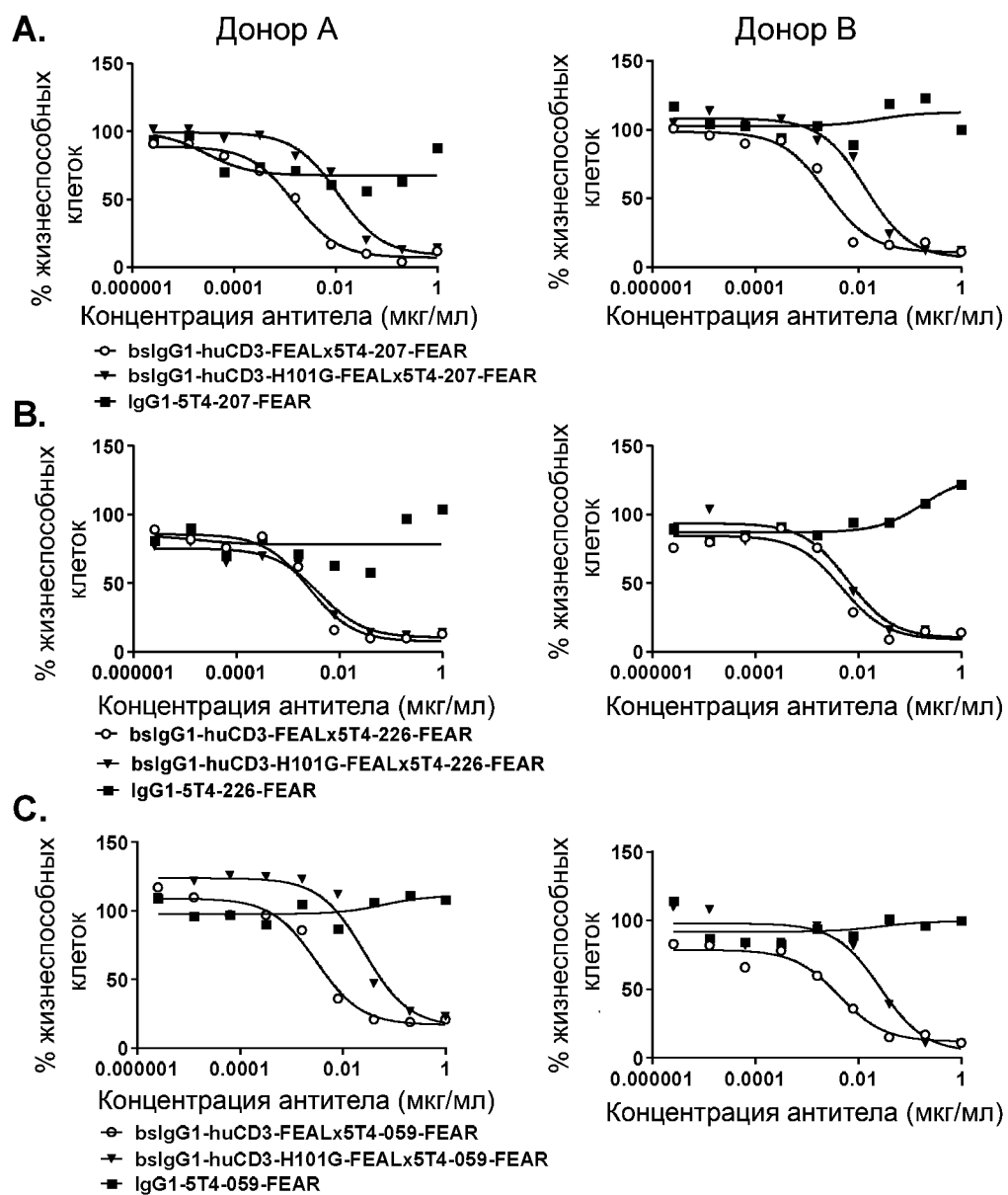
Фиг. 6 (I)



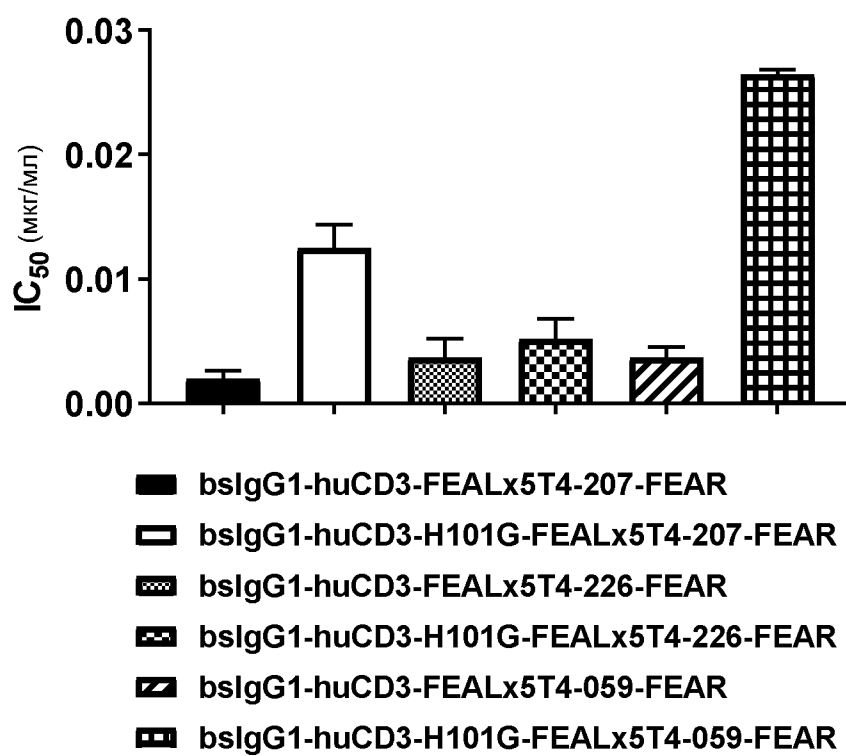
Фиг. 6 (II)



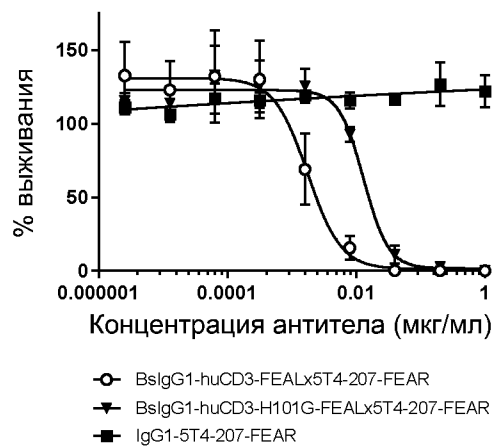
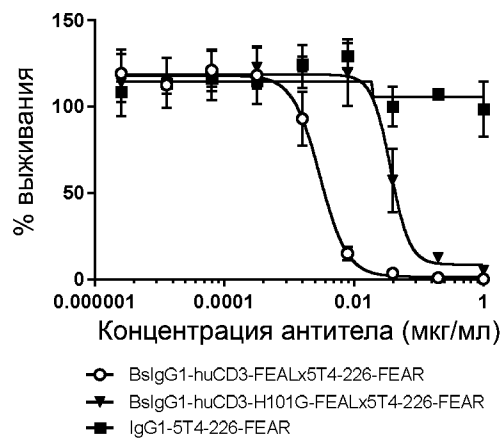
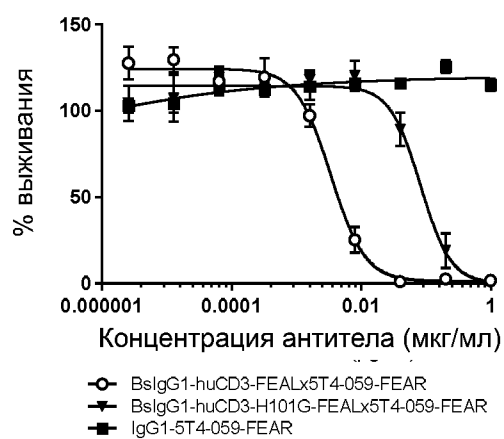
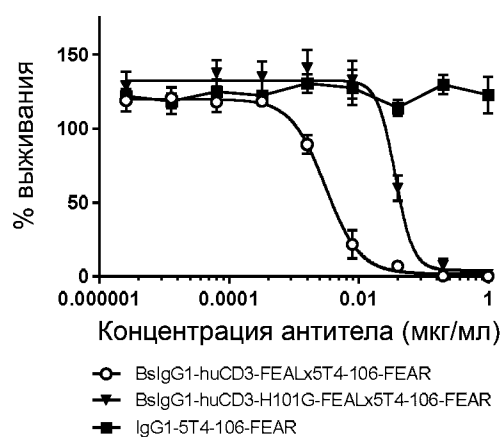
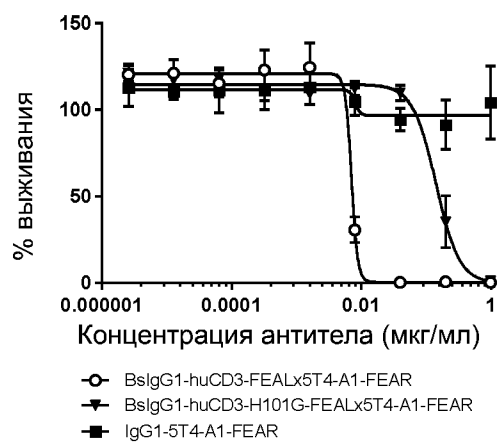
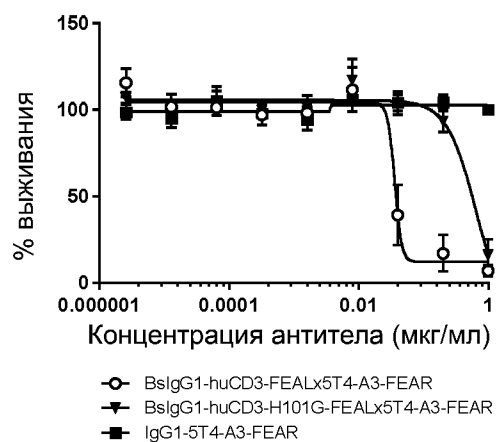
Фиг. 6 (III)



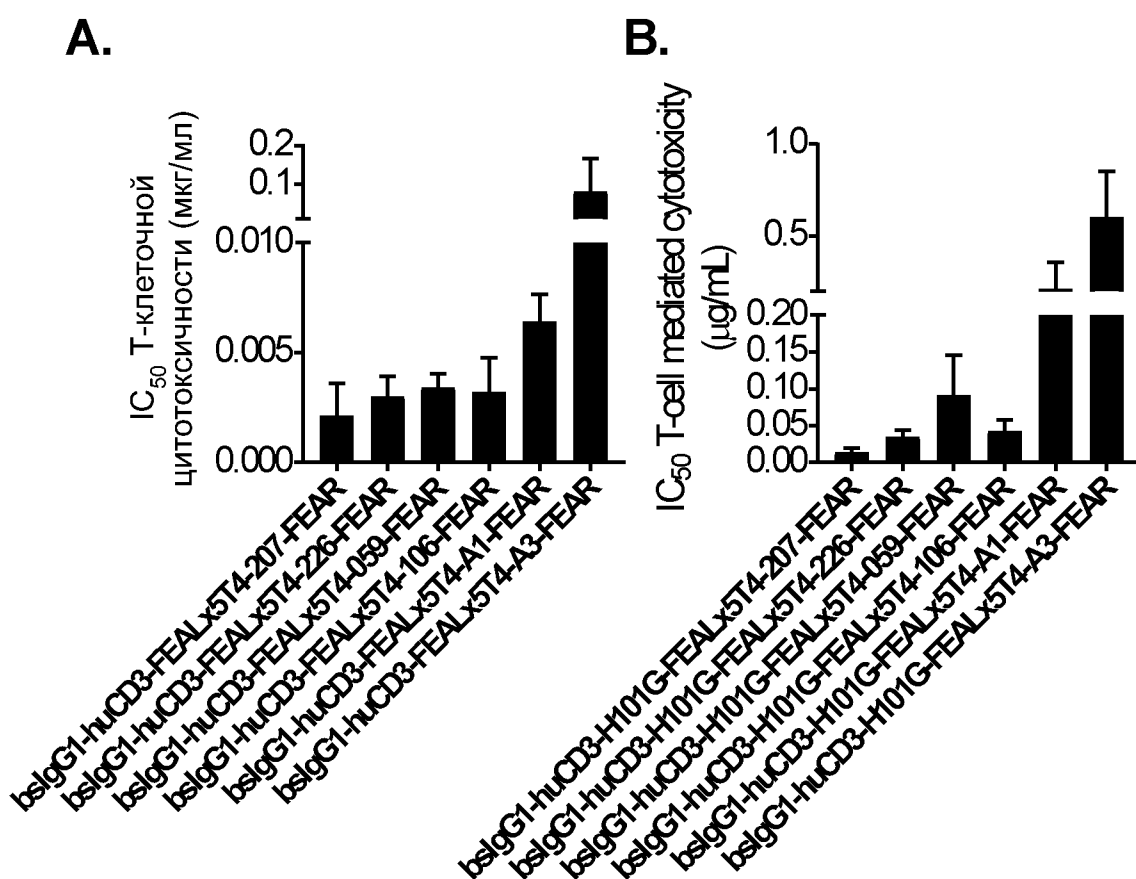
Фиг. 7 (I)



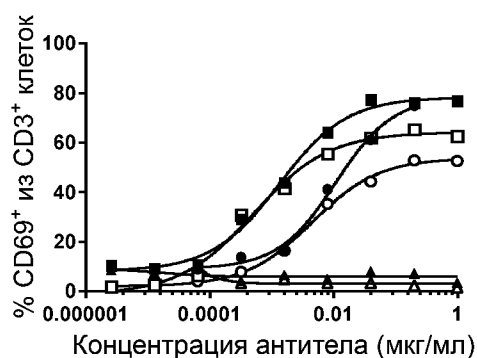
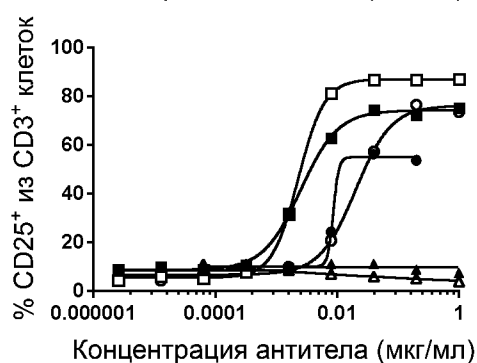
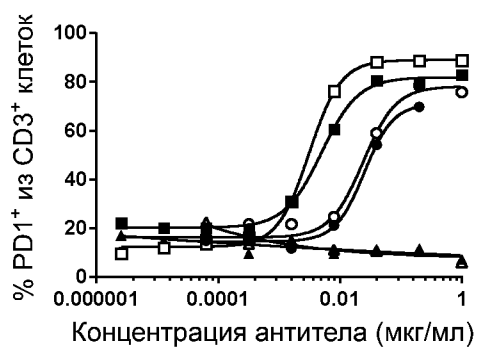
Фиг. 7(II)

A.**B.****C.****D.****E.****F.**

Фиг. 8 (I)



Фиг. 8 (II)

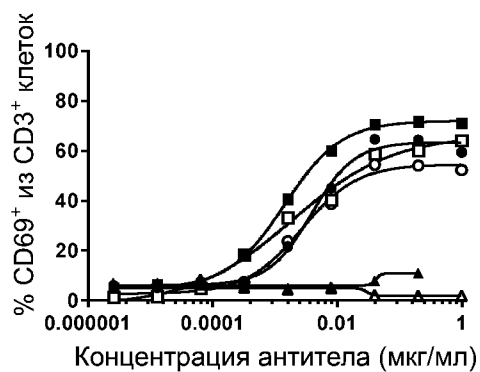
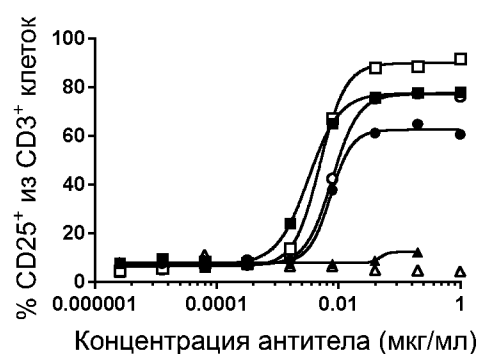
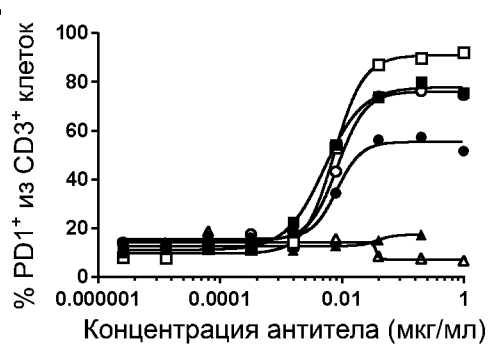
A.

● bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR
 ■ bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR
 ▲ IgG1-5T4-207-FEAR

Донор А

○ bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR
 □ bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-207-FEAR
 △ IgG1-5T4-207-FEAR

Донор В

B.

● bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR
 ■ bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR
 ▲ IgG1-5T4-226-FEAR

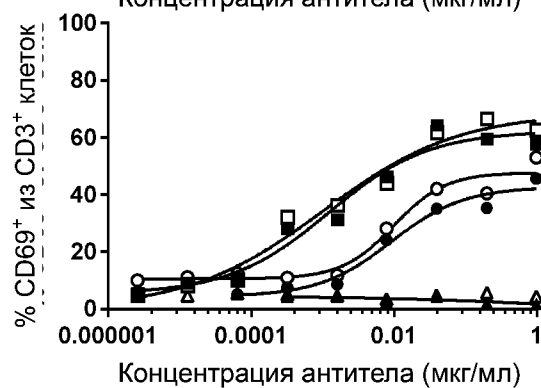
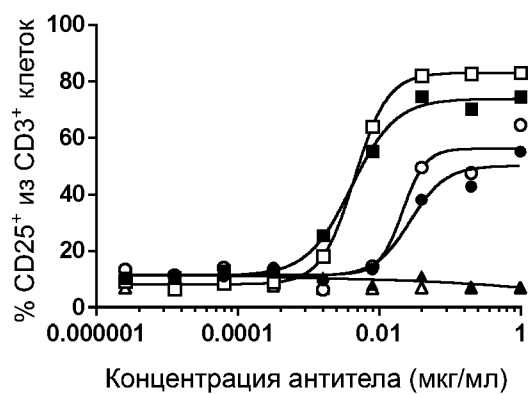
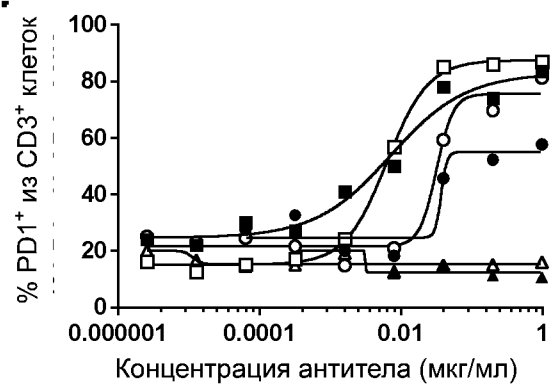
Донор А

○ bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-226-FEAR
 □ bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-226-FEAR
 △ IgG1-5T4-226-FEAR

Донор В

Фиг. 9 (I)

С.

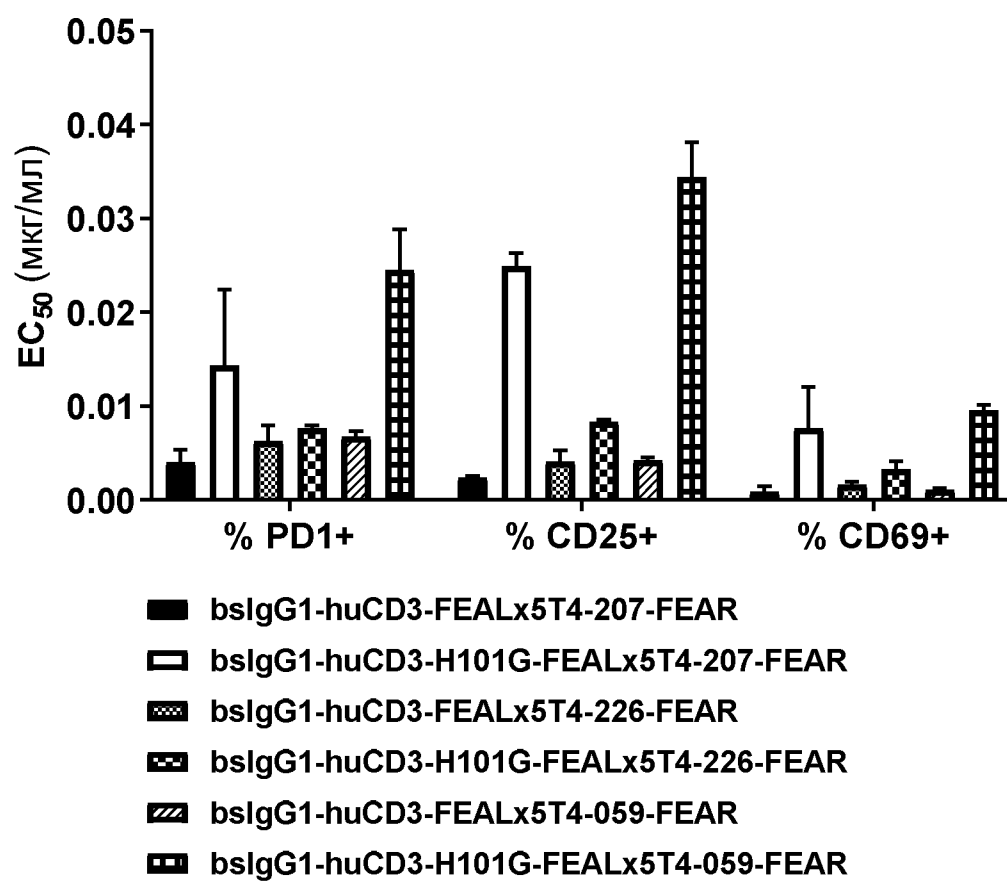


- bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR
- bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR
- ▲ IgG1-5T4-059-FEAR
- bsIgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-059-FEAR
- bsIgG1-huCD3-FEALx5T4-059-FEAR
- △ IgG1-5T4-059-FEAR

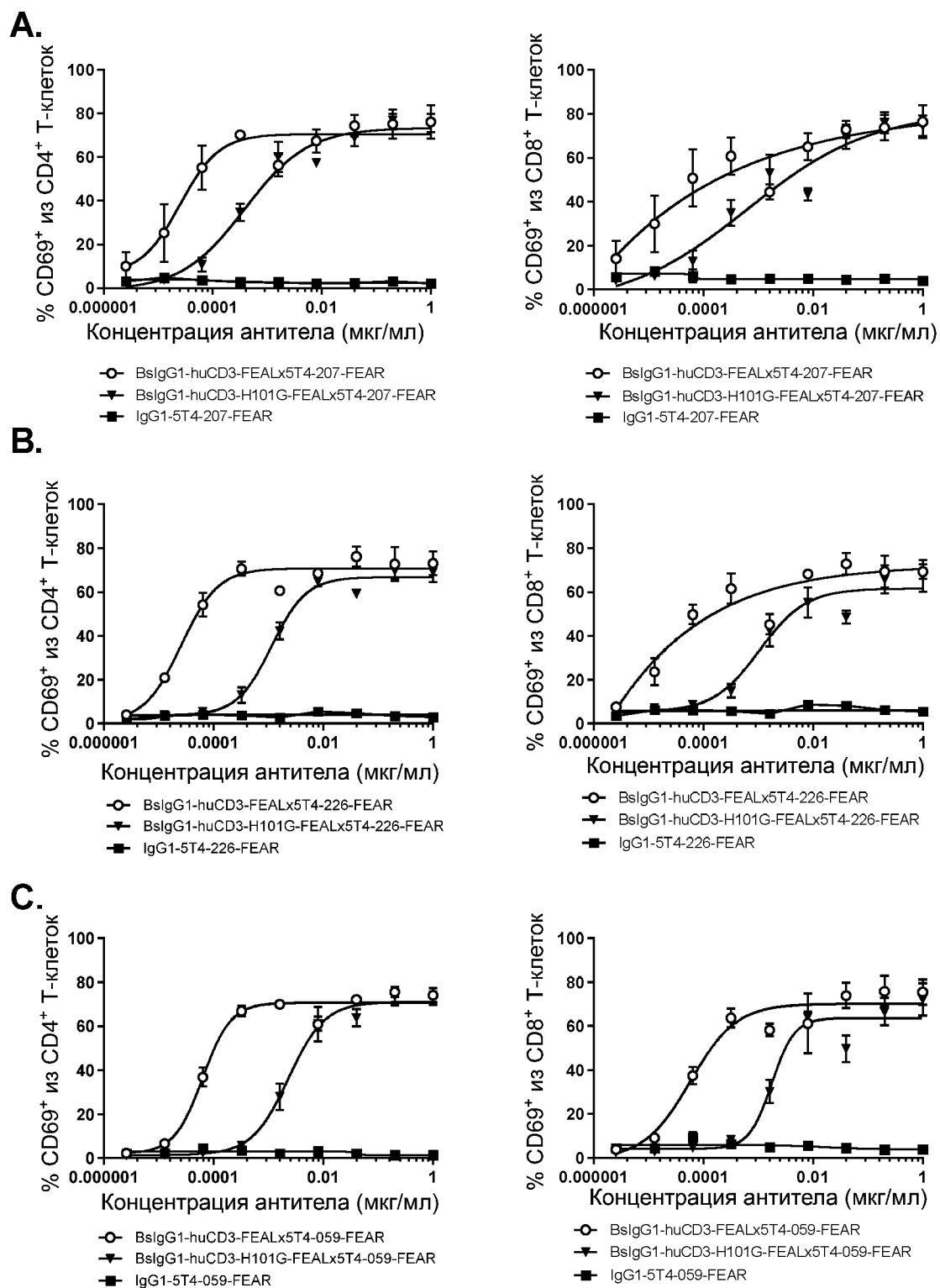
Донор А

Донор В

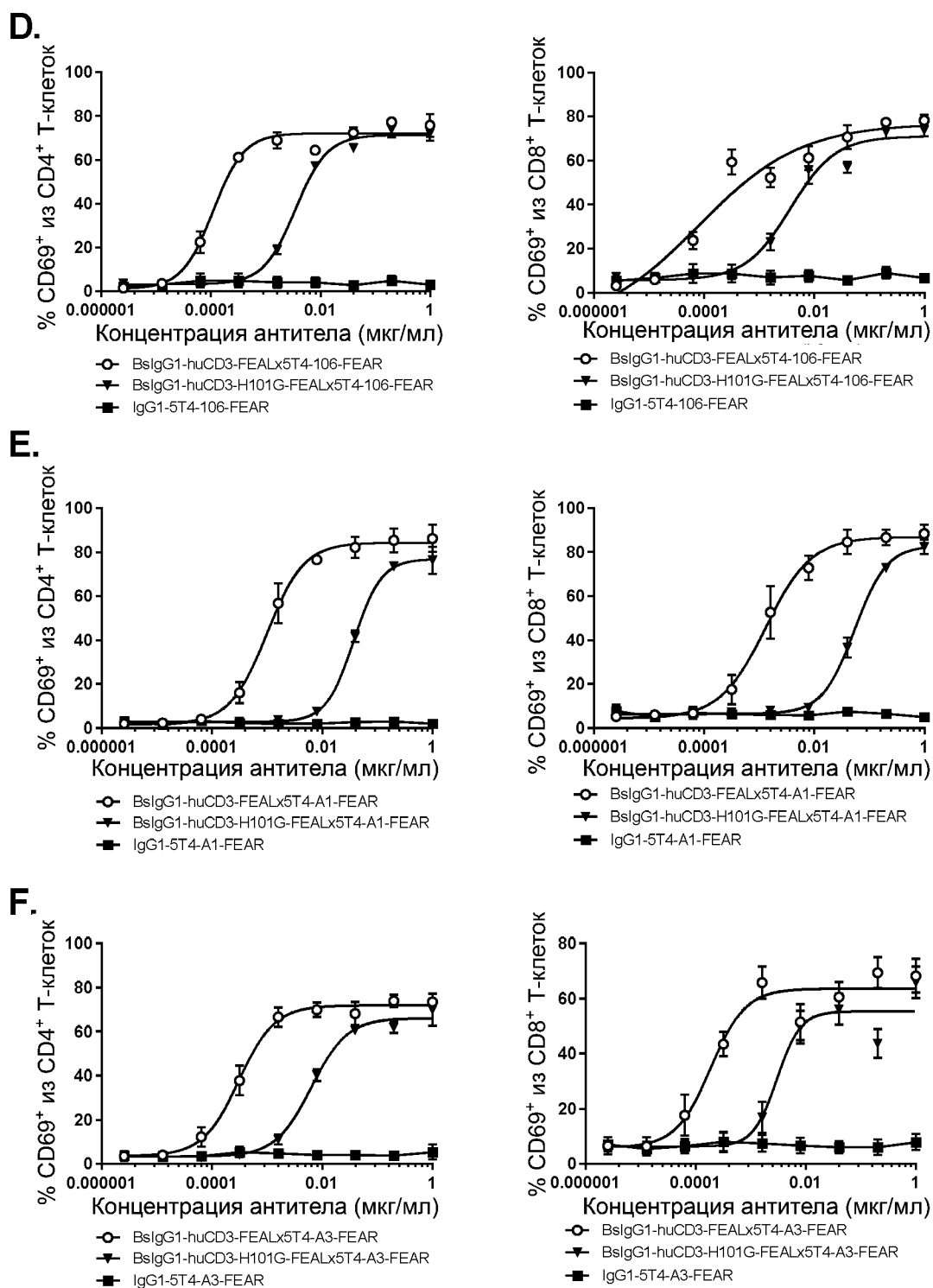
Фиг. 9 (I). Продолжение



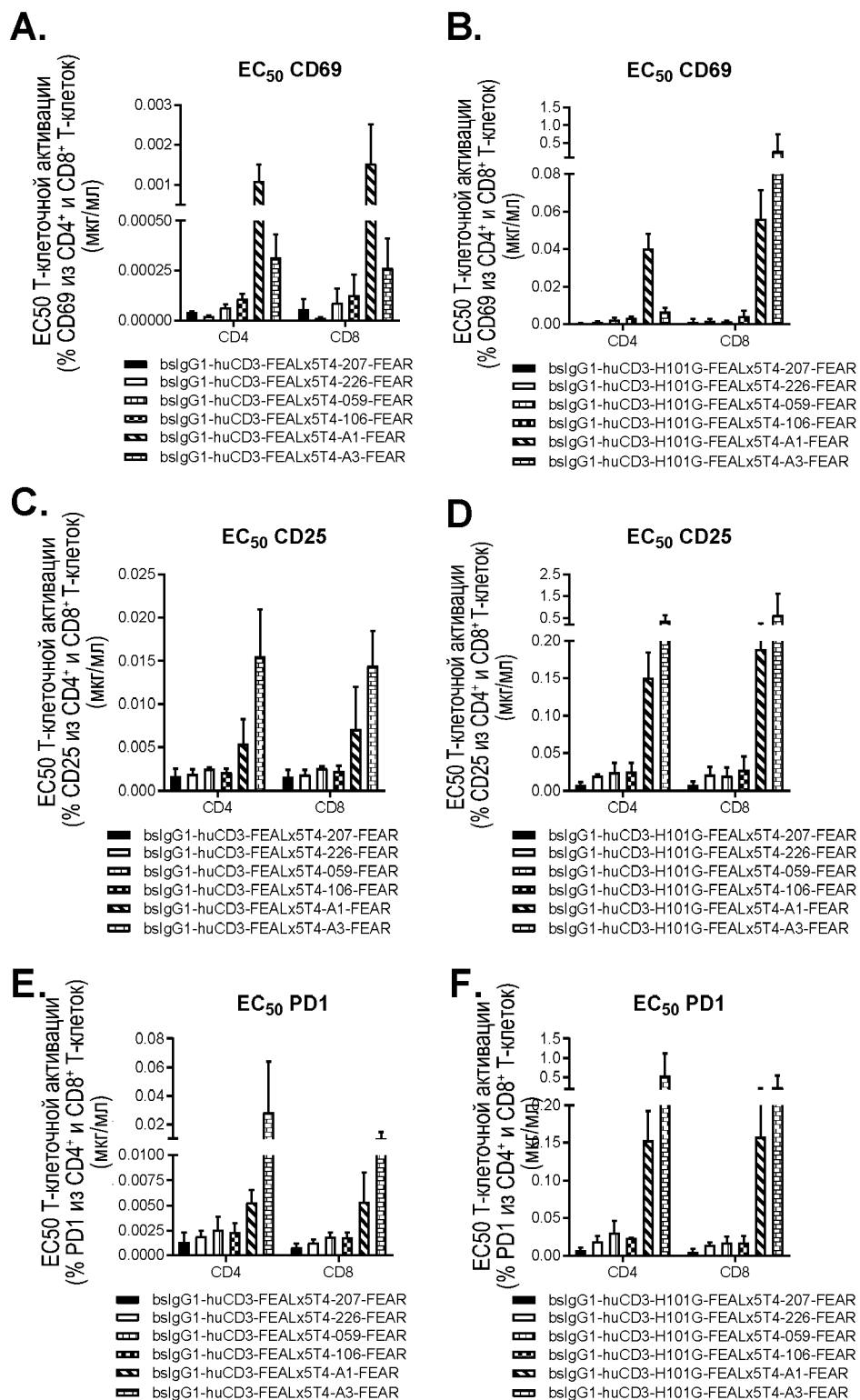
Фиг. 9(II)



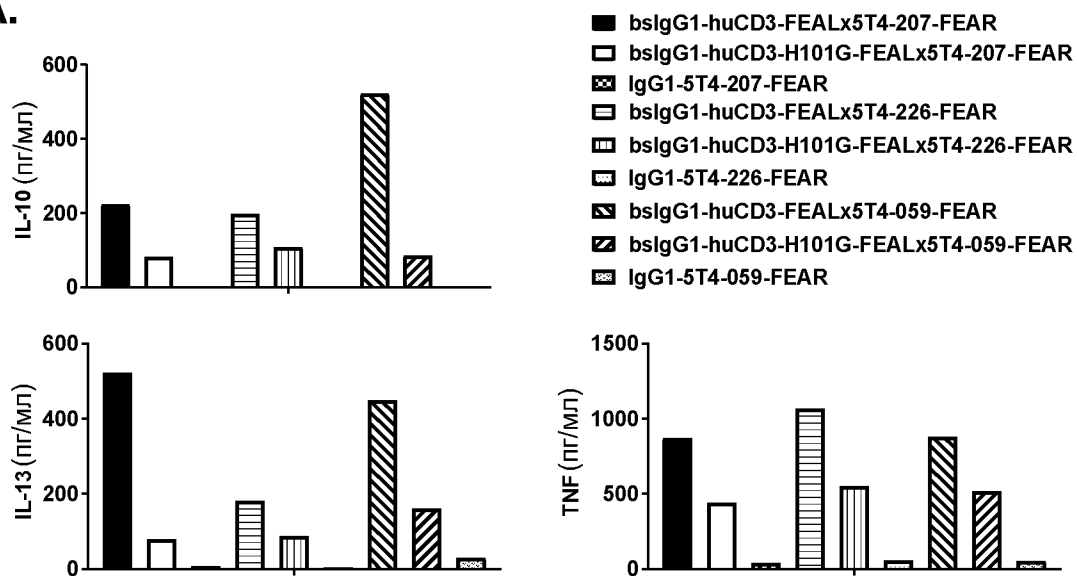
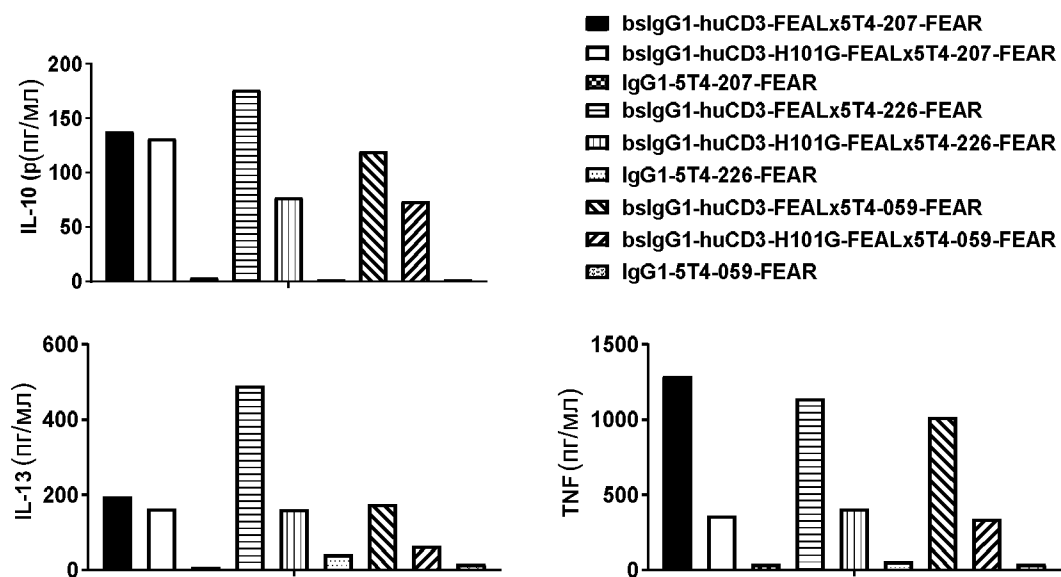
Фиг. 10 (I)



Фиг. 10 (I). Продолжение

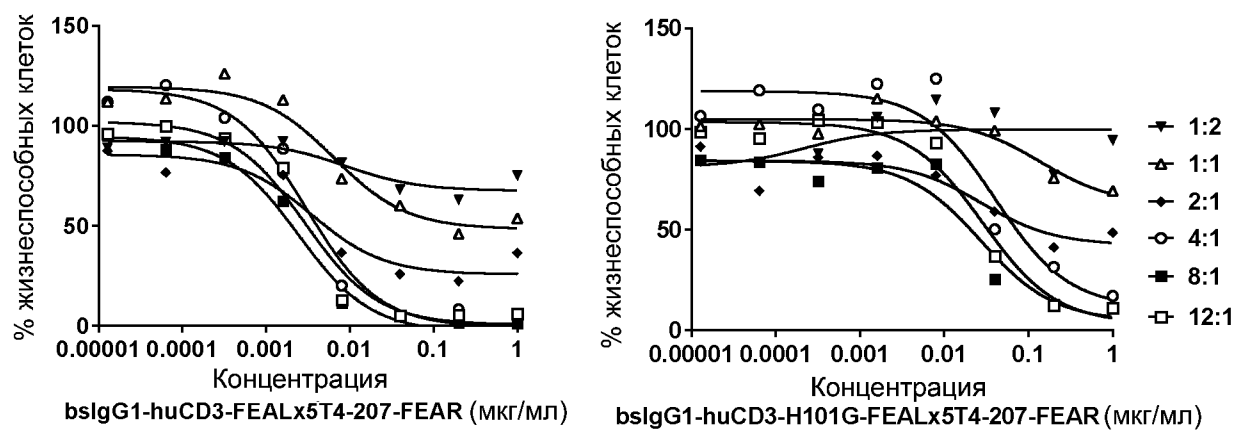


Фиг. 10 (II)

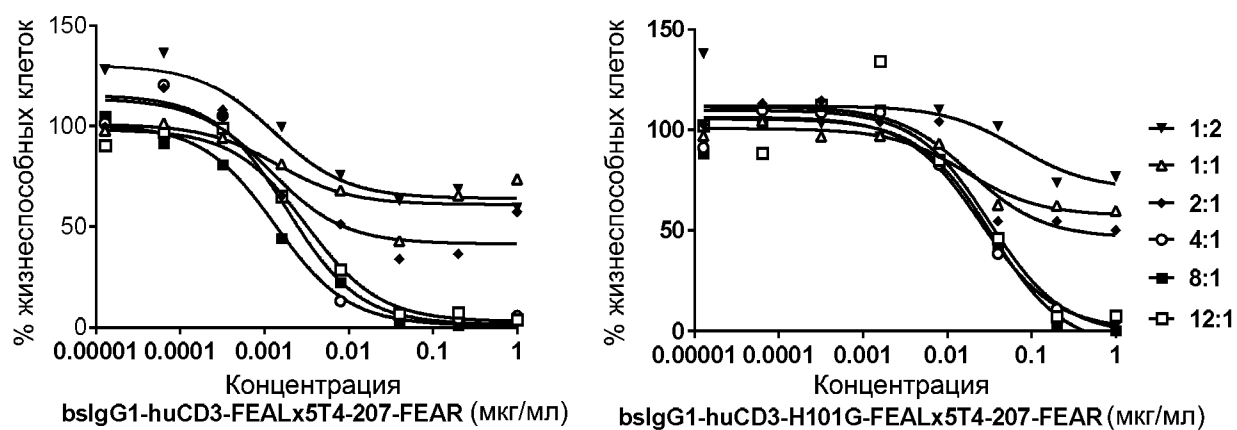
A.**B.**

Фиг. 11

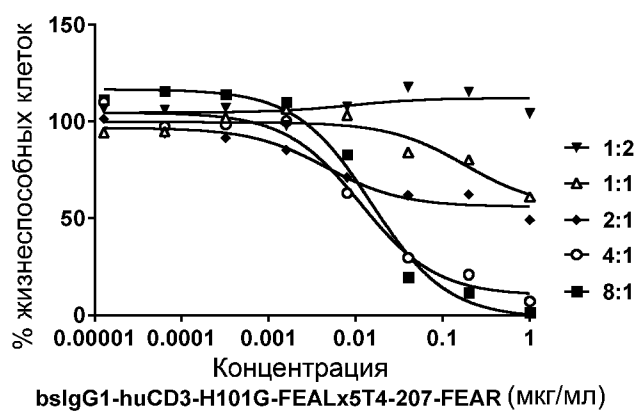
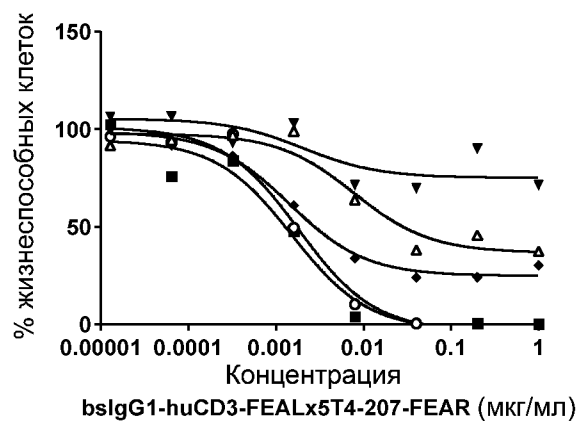
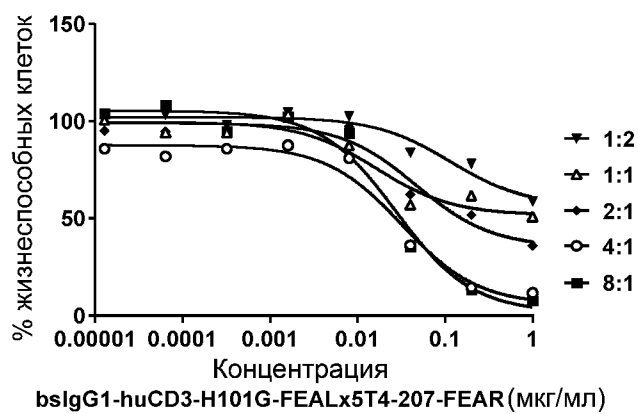
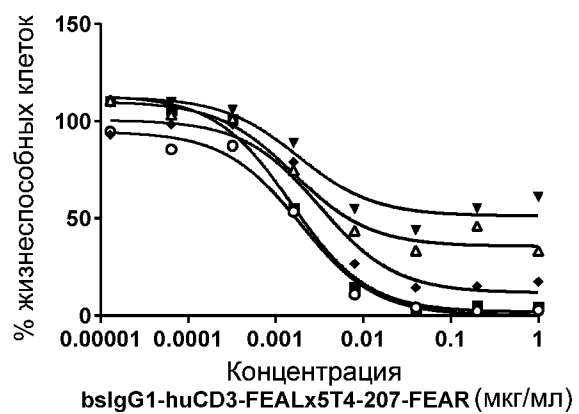
A.



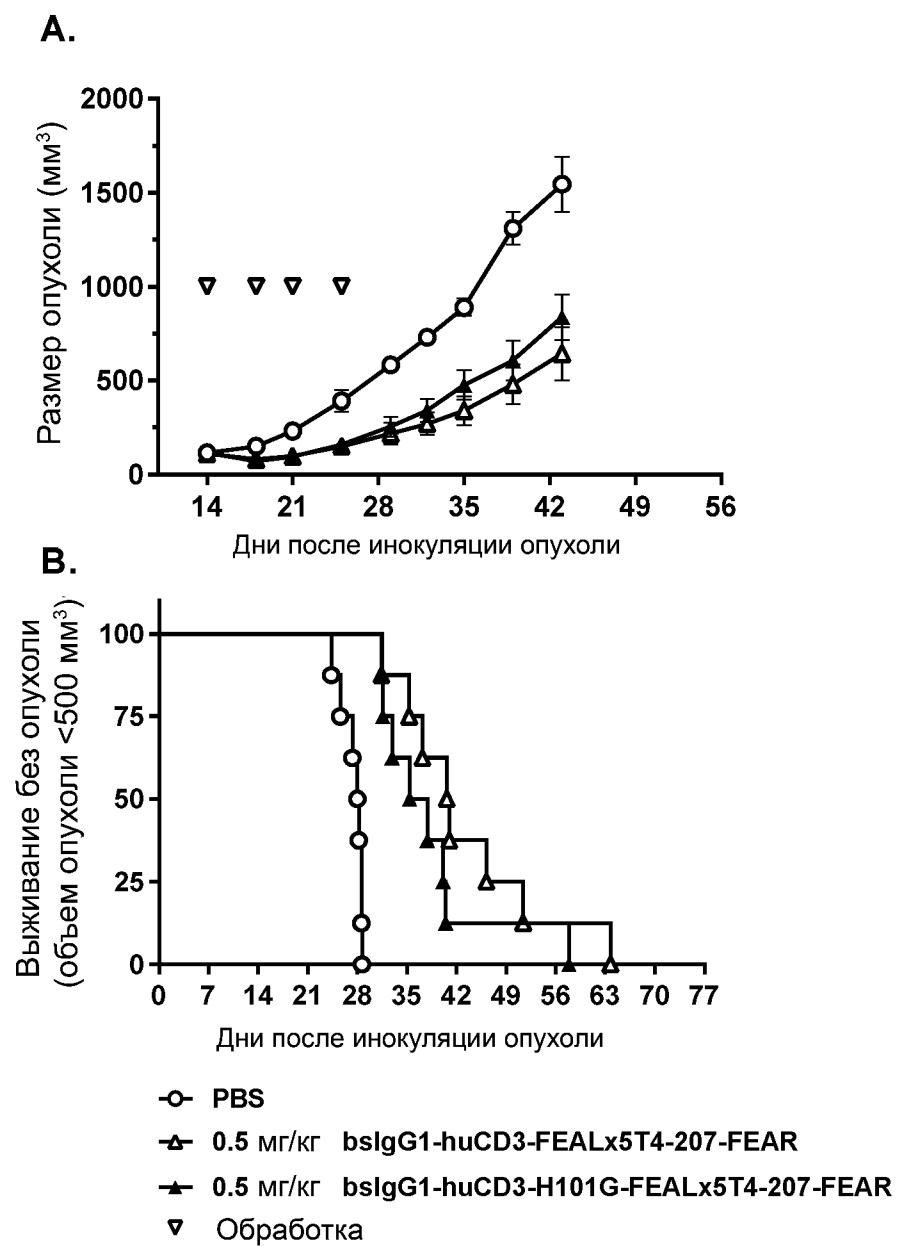
B.



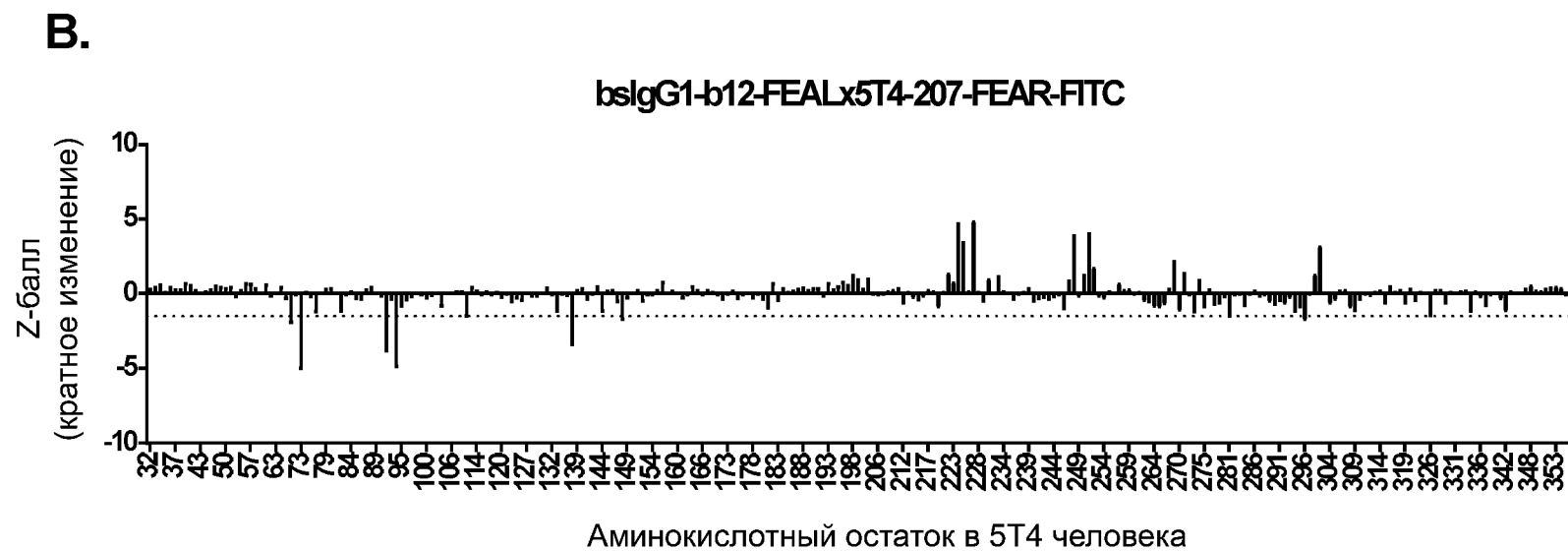
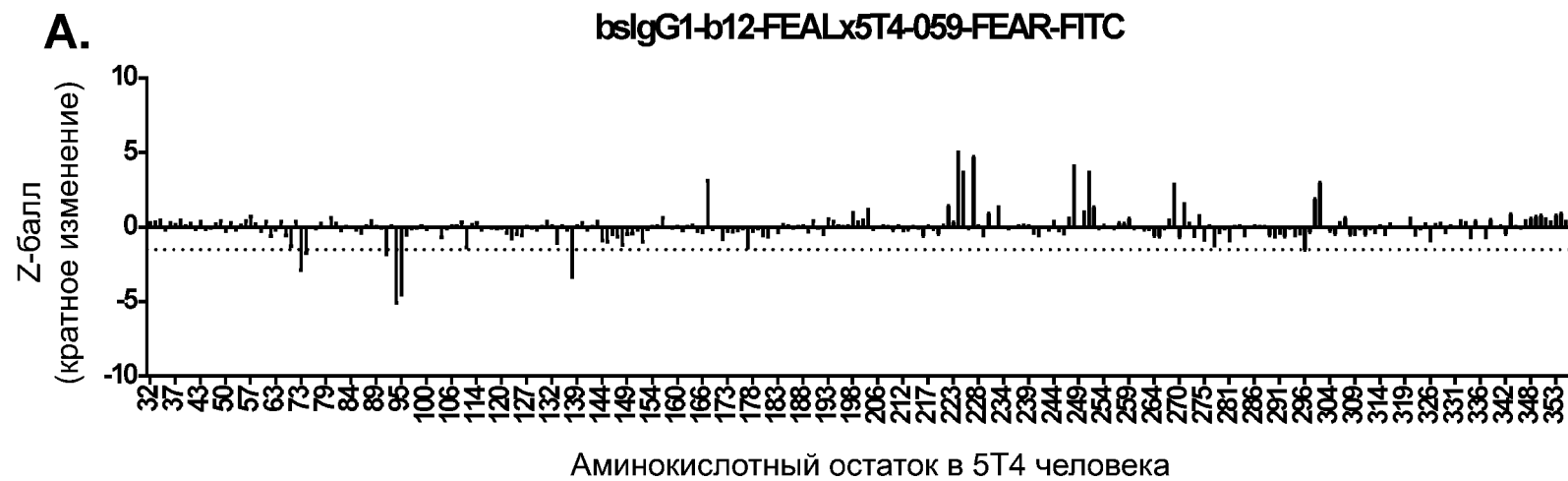
Фиг. 12

A.**B.**

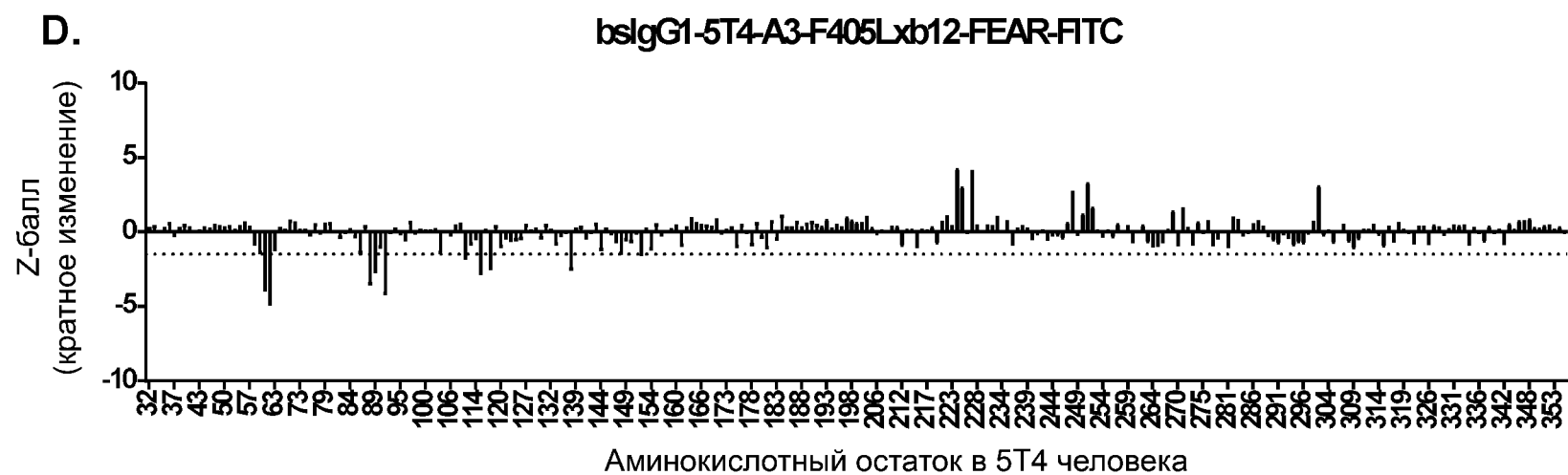
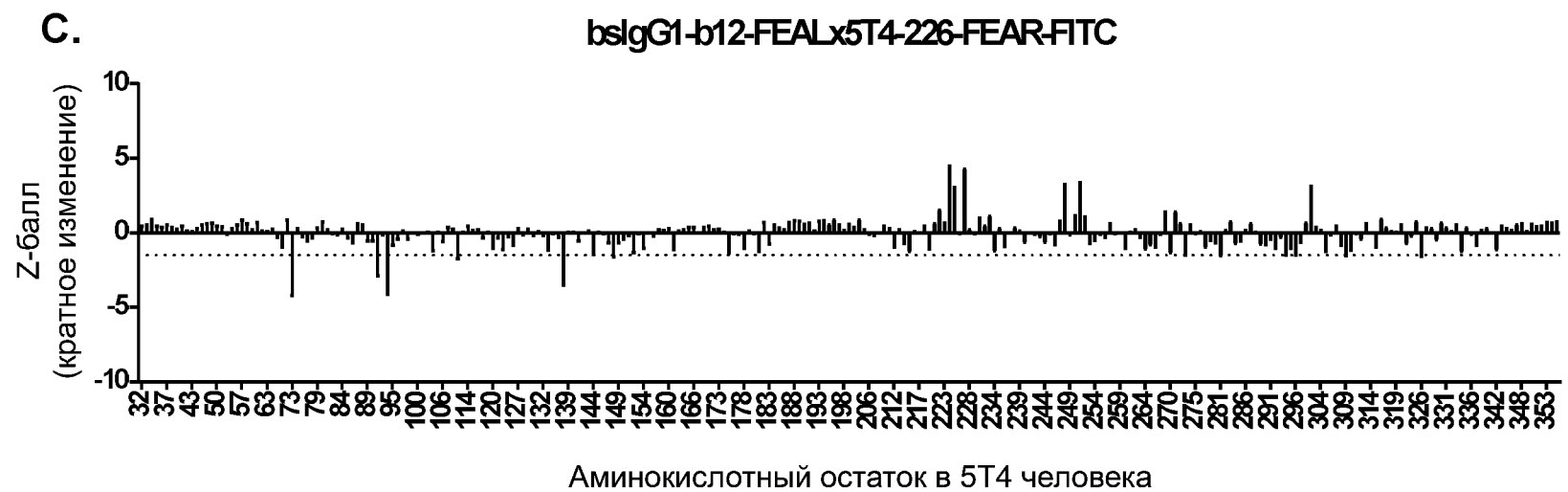
Фиг. 13



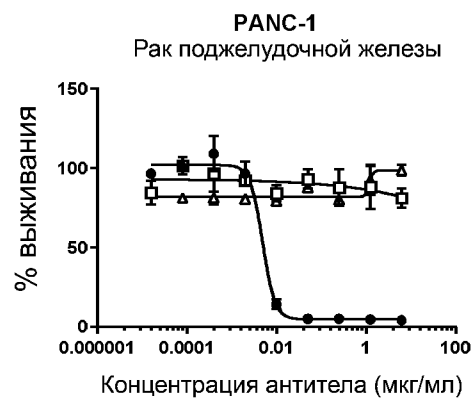
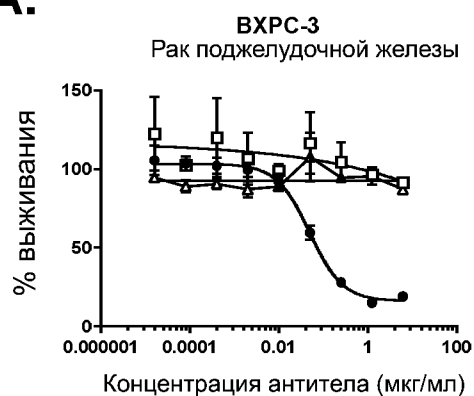
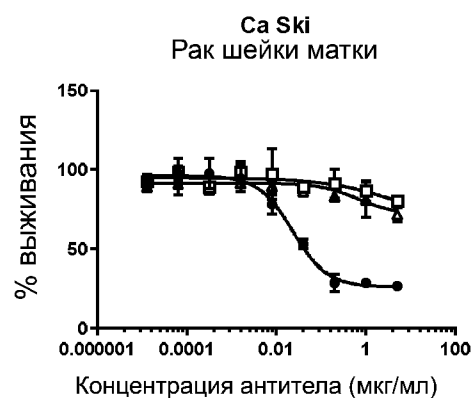
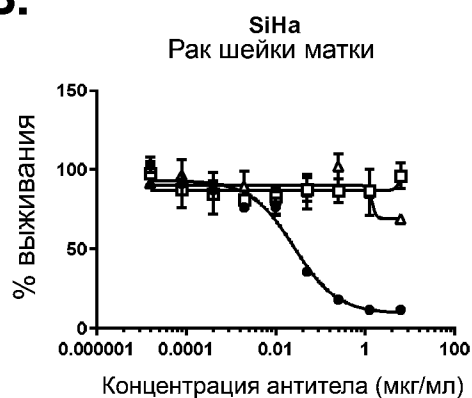
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 15. Продолжение

A.**B.**

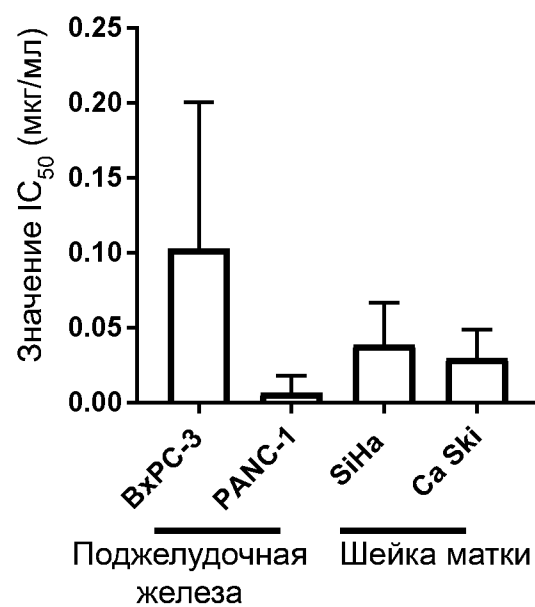
● BslgG1-huCD3-H101G-FEALx5T4-207-FEAR

□ BslgG1-b12-FEALx5T4-207-FEAR

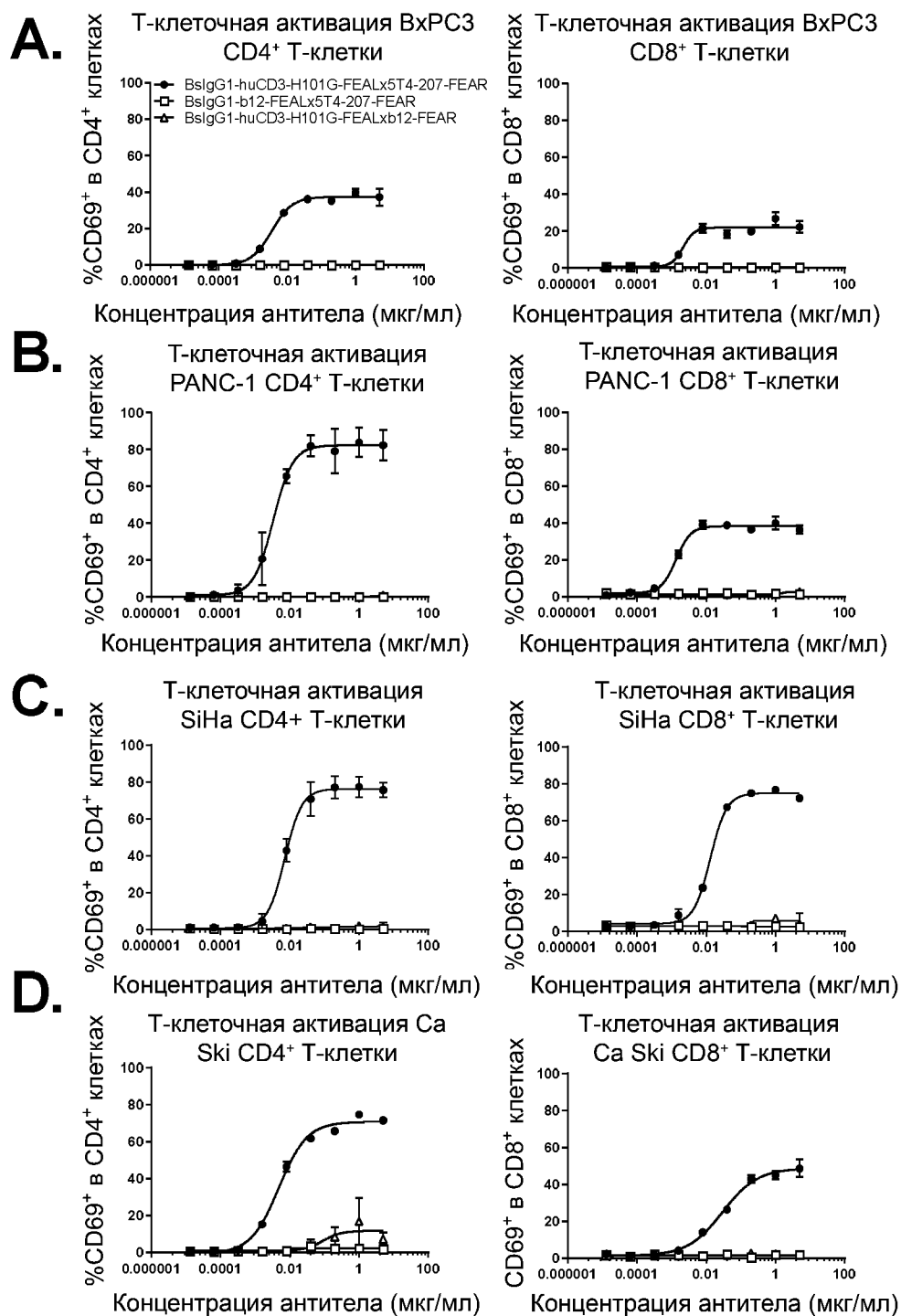
△ BslgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR

Фиг. 16 (I)

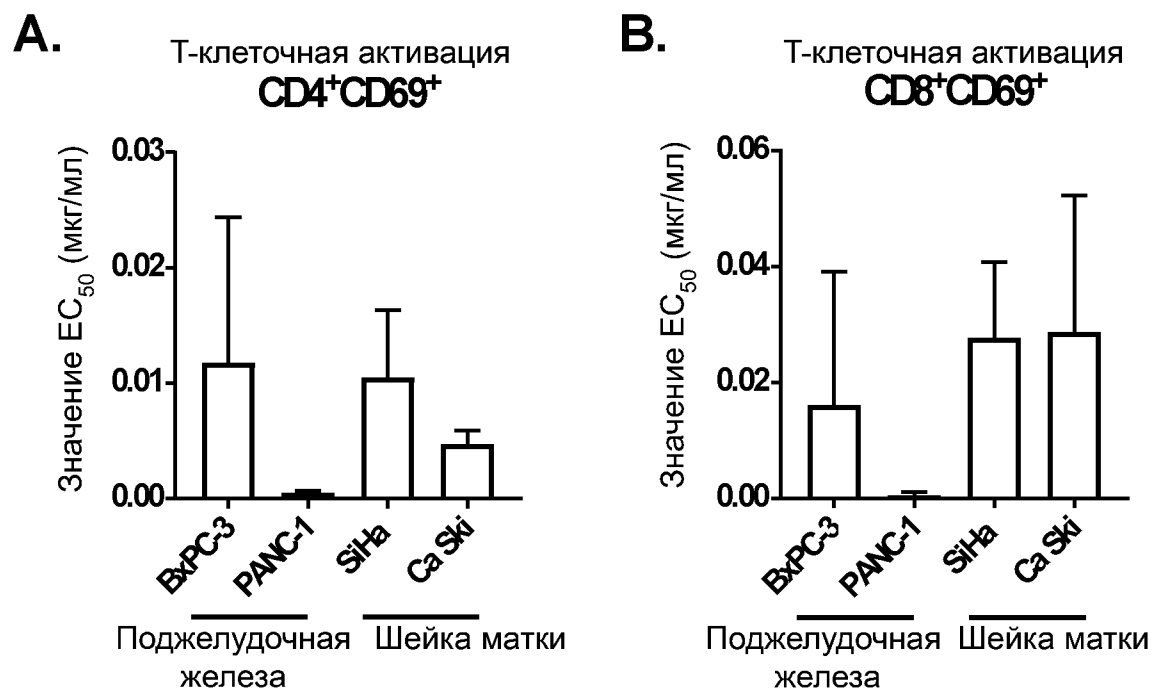
Цитотоксичность, опосредованная Т-клетками



Фиг. 16 (II)



Фиг. 17 (I)



Фиг. 17 (II)