

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092769** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.11

(22) Дата подачи заявки
2019.05.17

(51) Int. Cl. *A61K 38/47* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 9/34 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

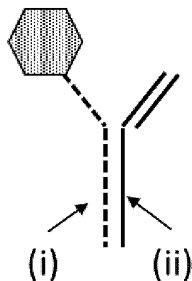
(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD63, ИХ КОНЬЮГАТЫ И ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/673,098; 62/681,563; 62/777,592
(32) 2018.05.17; 2018.06.06; 2018.12.10
(33) US
(86) PCT/US2019/032922
(87) WO 2019/222663 2019.11.21
(71) Заявитель:
РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Сиджнэр Кэтрин, Бейк Эндрю,
Шенхерр Кристофер, Мерфи Эндрю
Дж. (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, их частям и слитым белкам против CD63. Настоящее изобретение относится также к кодирующим их последовательностям нуклеиновой кислоты. Настоящее изобретение относится также к содержащим их композициям и к способам их применения, например, для лечения нуждающегося в этом пациента.



A1

202092769

202092769

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565923EA/042

АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD63, ИХ КОНЬЮГАТЫ И ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение, в общем, относится к человеческим антителам и антигенсвязывающим фрагментам человеческих антител, которые связывают CD63 человека, и к способам их применения, например, в способах лечения нарушения у нуждающегося в этом пациента. Настоящее изобретение относится также к антигенсвязывающим молекулам, содержащим по меньшей мере антигенсвязывающий фрагмент антитела против CD63, где образование комплекса антигенсвязывающей молекулы с CD63 опосредует интернализацию комплекса антигенсвязывающей молекулы/CD63. Настоящее изобретение, кроме того, относится к конъюгатам, содержащим антитело против CD63 (или антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий фрагмент антитела против CD63) и лекарственное средство (например, замещающий фермент, цитотоксическое лекарственное средство и т.д.), которые можно использовать для лечения заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Антиген CD63 человека, также обозначенный как связанный с лизосомами гликопротеин 3 (LAMP3), является членом суперсемейства тетраспанинов. Его экспрессия в клетке является повсеместной, и в первую очередь, внутри внутриклеточных эндосомальных или лизосомальных компартментов, хотя некоторую экспрессию наблюдают на клеточной поверхности. CD63 представляет собой интернализирующий белок, способный опосредовать интернализацию и транспорт мишеней в эндосомальные/лизосомальные компартменты, когда такие мишени физически связаны с CD63 каким-либо образом, например, посредством антигенсвязывающего белка, конъюгированного с нагрузкой, или биспецифического антигенсвязывающего белка, связывающего мишень и CD63.

[0003] В данной области существует необходимость в новых антителах против CD63 человека, включая их одновалентные антигенсвязывающие фрагменты для использования в биспецифических связывающих белках, способных связывать CD63 и вызывать его интернализацию.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, связывающим CD63 человека. Антитела, в соответствии с этим аспектом изобретения, можно использовать, среди прочего, для специфического управления интернализацией и/или лизосомальной миграцией белка-мишени, фермента (например, GAA или GLA), конъюгата лекарственного средства и т.д. Таким образом, в этом аспекте, настоящее изобретение относится также к биспецифическим антителам, их антигенсвязывающим фрагментам, связывающим CD63 человека, слитым конструкциям

антитело-белок (см., например, фигуру 1), и конъюгатам антитело-лекарственное средство.

[0005] Иллюстративные антитела против CD63 по настоящему изобретению перечислены в таблице 1. В таблице 1 указаны идентификаторы аминокислотной последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты переменных областей тяжелой цепи (HCVR) и переменных областей легкой цепи (LCVR), так же как определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител против CD63.

[0006] Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0007] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против CD63, перечисленных в таблице 1. В конкретных вариантах осуществления, пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, SEQ ID NO: 18/26, SEQ ID NO: 34/42, SEQ ID NO: 50/58, SEQ ID NO: 66/74, SEQ ID NO: 82/90, SEQ ID NO: 98/106, SEQ ID NO: 114/122, SEQ ID NO: 130/138, SEQ ID NO: 146/154, SEQ ID NO: 162/170, SEQ ID NO: 178/186, SEQ ID NO: 194/202, SEQ ID NO: 210/218, SEQ ID NO: 226/234, SEQ ID NO: 242/250, SEQ ID NO: 258/266, SEQ ID NO: 274/282, SEQ ID NO: 290/282, SEQ ID NO: 298/282, SEQ ID NO: 306/282, SEQ ID NO: 314/282, SEQ ID NO: 322/282 и SEQ ID NO: 330/282.

[0008] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из

аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

[0009] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

[0010] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

[0011] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

[0012] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

[0013] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности.

[0014] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител против CD63, перечисленных в таблице 1. В конкретных вариантах осуществления, пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16, SEQ ID NO: 24/32, SEQ ID NO: 40/48, SEQ ID NO: 56/64, SEQ ID NO: 72/80, SEQ ID NO: 88/96, SEQ ID NO: 104/112, SEQ ID NO: 120/128, SEQ ID NO: 136/144, SEQ ID NO: 152/160, SEQ ID NO: 168/176, SEQ ID NO: 184/192, SEQ ID NO: 200/208; SEQ ID NO: 216/224; SEQ ID NO: 232/240; SEQ ID NO: 248/256; SEQ ID NO: 264/272; SEQ ID NO: 280/288; SEQ ID NO: 296/288; SEQ ID NO: 304/288; SEQ ID NO: 312/288; SEQ ID NO: 320/288; SEQ ID NO: 328/288; SEQ ID NO: 336/288.

[0015] Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (т.е., HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в любом из иллюстративных антител против CD63, перечисленных в таблице 1. В конкретных вариантах осуществления, набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16, SEQ ID NO: 20-22-24-26-28-30-32, SEQ ID NO: 36-38-40-44-46-48, SEQ ID NO: 52-54-56-60-62-64; SEQ ID NO: 68-70-72-76-78-80; SEQ ID NO: 84-86-88-92-94-96; SEQ ID NO: 100-102-104-108-110-112; SEQ ID NO: 116-118-120-124-126-128; SEQ ID NO: 132-134-136-140-142-144; SEQ ID NO: 148-150-152-156-158-160; SEQ ID NO: 164-166-168-172-174-176; SEQ ID NO: 180-182-184-188-190-192; SEQ ID NO: 196-198-200-204-206-208; SEQ ID NO: 212-214-216-220-222-224; SEQ ID NO: 228-230-232-236-238-240; SEQ ID NO: 244-246-248-252-254-256; SEQ ID NO: 260-262-264-268-270-272; SEQ ID NO: 276-278-280-284-286-288; SEQ ID NO: 292-294-296-284-286-288; SEQ ID NO: 300-302-304-284-286-288; SEQ ID NO: 308-310-312-284-286-288; SEQ ID NO: 316-318-320-284-286-288; SEQ ID NO: 324-326-328-284-286-288 и SEQ ID NO: 332-334-336-284-286-288.

В родственном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (т.е., HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено в любом из иллюстративных антител против CD63, перечисленных в таблице 1. Например, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-

LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, SEQ ID NO: 18/26, SEQ ID NO: 34/42, SEQ ID NO: 50/58, SEQ ID NO: 66/74, SEQ ID NO: 82/90, SEQ ID NO: 98/106, SEQ ID NO: 114/122, SEQ ID NO: 130/138, SEQ ID NO: 146/154, SEQ ID NO: 162/170, SEQ ID NO: 178/186, SEQ ID NO: 194/202, SEQ ID NO: 210/218, SEQ ID NO: 226/234, SEQ ID NO: 242/250, SEQ ID NO: 258/266, SEQ ID NO: 274/282, SEQ ID NO: 290/282, SEQ ID NO: 298/282, SEQ ID NO: 306/282, SEQ ID NO: 314/282, SEQ ID NO: 322/282, и SEQ ID NO: 330/282. Методы и способы для идентификации CDR внутри аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR хорошо известны в данной области и могут быть использованы для идентификации CDR внутри указанных аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR, описанных в настоящем описании. Иллюстративные соглашения, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают, например, определение Kabat, определение Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение Kabat основано на изменчивости последовательности, определение Chothia основано на локализации областей структурных петель, и определение AbM является компромиссом между способами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, «Sequences of Proteins of Immunological Interest», National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Доступны также публичные базы данных для идентификации последовательностей CDR в антителе.

[0016] Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела против CD63 или их фрагменты. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0017] Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0018] Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 1; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты

[0020] Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0021] Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 1; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0022] Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 1; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0023] Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDР3, перечисленных в таблице 1; в конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты

содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней.

[0024] Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, содержащую набор из трех CDR (т.е., HCDR1-HCDR2-HCDR3), где набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено в любом из иллюстративных антител против CD63, перечисленных в таблице 1.

[0025] Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим LCVR, содержащую набор из трех CDR (т.е., LCDR1-LCDR2-LCDR3), где набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено в любом из иллюстративных антител против CD63, перечисленных в таблице 1.

[0026] Настоящее изобретение относится также к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1. В конкретных вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в таблице 1, или по существу сходную с ней последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательности с ней. В конкретных вариантах осуществления, в соответствии с этим аспектом изобретения, молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где HCVR и LCVR обе происходят из одного и того же антитела против CD63 из перечисленных в таблице 1.

[0027] Настоящее изобретение относится также к рекомбинантным экспрессирующим векторам, способным экспрессировать полипептид, содержащий переменную область тяжелой или легкой цепи антитела против CD63. Например, настоящее изобретение относится к рекомбинантным экспрессирующим векторам, содержащим любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, т.е., молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любые из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, как указано в таблице 1. В объем настоящего описания включены также клетки-хозяева, в которые введены такие векторы, так же как способы получения антител или их

фрагментов посредством культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продукцию антител или фрагментов антител, и выделения антител и фрагментов антител, полученных таким образом.

[0028] В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, таким как антитела против CD63, имеющим модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления, модификацию для удаления нежелательных участков гликозилирования или антитела, лишенное группы фукозы, присутствующей на олигосахаридной цепи, можно использовать, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733) (см. Shields et al. (2002) JBC 277:26733), когда цитотоксичность является желательной. В других применениях, можно осуществлять модификацию галактозилирования для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

[0029] В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, специфически связывающие CD63, и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте, изобретение относится к композиции, представляющей собой комбинацию антитела против CD63 и второго лекарственного средства. В одном варианте осуществления, второе лекарственное средство представляет собой любое средство, обеспечивающим преимущества образом скомбинированное с антителом против CD63. Дополнительные виды комбинированной терапии и совместные составы, включающие антитела против CD63 по настоящему изобретению, описаны в другом месте настоящего описания.

[0030] В другом аспекте изобретение относится к терапевтическим способам для нацеливания/уничтожения клеток опухолей, экспрессирующих CD63, с использованием антитела против CD63 по настоящему изобретению, где терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело против CD63 по настоящему изобретению, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых случаях, антитела против CD63 (или их антигенсвязывающие фрагменты) можно модифицировать, так чтобы они становились более цитотоксическими, посредством способов, включающих, но без ограничения, модифицированные домены Fc для увеличения ADCC (см., например, Shields, R.L. et al. (2002) JBC 277:26733), радиоиммунотерапию, конъюгаты антитело-лекарственное средство, или другие способы увеличения эффективности уничтожения опухолей.

[0031] Настоящее изобретение относится также к применению антитела против CD63 по настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения (например, злокачественной опухоли), связанного с или вызванного экспрессирующими CD63 клетками. В одном аспекте, изобретение относится к соединению, содержащему антитело против CD63 или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическое антитело против TAAxCD63, для использования в медицине. В одном аспекте, изобретение относится к соединению, содержащему конъюгат антитело-

лекарственное средство (ADC), как описано в настоящем описании, для использования в медицине.

[0032] В другом аспекте, изобретение относится к моноспецифическим антителам против CD63 для диагностических применений, например, таких как реагенты для визуализации.

[0033] В другом аспекте, изобретение относится к терапевтическим способам для усиления интернализации CD63 в лизосому и/или деградации посредством лизосомы, с использованием антитела против CD63 или антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению, где терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело.

[0034] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связываемому экспрессирующими CD63 клетками с KD более чем 100 нМ, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса или эквивалентного анализа. В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связываемому экспрессирующими CD63 клетками с EC_{50} более чем 100 нМ, как измерено посредством анализа FACS. В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связываемому и интернализуемому в лизосому экспрессирующими CD63 клетками в случае, когда антитело связывается также с CD63, экспрессированным на той же клетке.

[0035] Изобретение относится также к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, конкурирующему за связывание с CD63 человека с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в таблице 1. В другом аспекте изобретение относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, конкурирующему за связывание с CD63 человека с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, SEQ ID NO: 18/26, SEQ ID NO: 34/42, SEQ ID NO: 50/58, SEQ ID NO: 66/74, SEQ ID NO: 82/90, SEQ ID NO: 98/106, SEQ ID NO: 114/122, SEQ ID NO: 130/138, SEQ ID NO: 146/154, SEQ ID NO: 162/170, SEQ ID NO: 178/186, SEQ ID NO: 194/202, SEQ ID NO: 210/218, SEQ ID NO: 226/234, SEQ ID NO: 242/250, SEQ ID NO: 258/266, SEQ ID NO: 274/282, SEQ ID NO: 290/282, SEQ ID NO: 298/282, SEQ ID NO: 306/282, SEQ ID NO: 314/282, SEQ ID NO: 322/282, и SEQ ID NO: 330/282.

[0036] Изобретение, кроме того, относится также к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же самым эпитопом на CD63 человека, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в таблице 2. В другом аспекте, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же самым эпитопом на CD63 человека, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 2/10, SEQ ID NO: 18/26, SEQ ID NO: 34/42, SEQ ID NO: 50/58, SEQ ID NO: 66/74, SEQ ID NO: 82/90, SEQ ID NO: 98/106, SEQ ID NO: 114/122, SEQ ID NO: 130/138, SEQ ID NO: 146/154, SEQ ID NO: 162/170, SEQ ID NO: 178/186, SEQ ID NO: 194/202, SEQ ID NO: 210/218, SEQ ID NO: 226/234, SEQ ID NO: 242/250, SEQ ID NO: 258/266, SEQ ID NO: 274/282, SEQ ID NO: 290/282, SEQ ID NO: 298/282, SEQ ID NO: 306/282, SEQ ID NO: 314/282, SEQ ID NO: 322/282, и SEQ ID NO: 330/282.

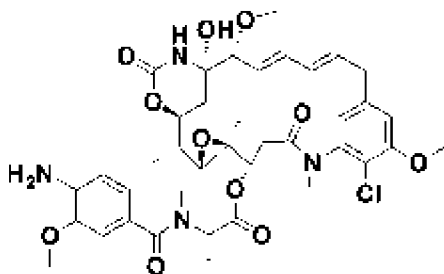
[0037] Изобретение, кроме того, относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающему CD63 человека, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит: определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющие аминокислотную последовательность, как указано в таблице 1; и CDR вариабельной области легкой цепи (LCVR), имеющие аминокислотную последовательность, как указано в таблице 1. В другом аспекте выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой и легкой цепи пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, SEQ ID NO: 18/26, SEQ ID NO: 34/42, SEQ ID NO: 50/58, SEQ ID NO: 66/74, SEQ ID NO: 82/90, SEQ ID NO: 98/106, SEQ ID NO: 114/122, SEQ ID NO: 130/138, SEQ ID NO: 146/154, SEQ ID NO: 162/170, SEQ ID NO: 178/186, SEQ ID NO: 194/202, SEQ ID NO: 210/218, SEQ ID NO: 226/234, SEQ ID NO: 242/250, SEQ ID NO: 258/266, SEQ ID NO: 274/282, SEQ ID NO: 290/282, SEQ ID NO: 298/282, SEQ ID NO: 306/282, SEQ ID NO: 314/282, SEQ ID NO: 322/282 и SEQ ID NO: 330/282. В другом аспекте, выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16, SEQ ID NO: 20-22-24-26-28-30-32, SEQ ID NO: 36-38-40-44-46-48, SEQ ID NO: 52-54-56-60-62-64; SEQ ID NO: 68-70-72-76-78-80; SEQ ID NO: 84-86-88-92-94-96; SEQ ID NO: 100-102-104-108-110-112; SEQ ID NO: 116-118-120-124-126-128; SEQ ID NO: 132-134-136-140-142-144; SEQ ID NO: 148-150-152-156-158-160; SEQ ID NO: 164-166-168-172-174-176; SEQ ID NO: 180-182-184-188-190-192; SEQ ID NO: 196-198-200-204-206-208; SEQ ID NO: 212-214-216-220-222-224; SEQ ID NO: 228-230-232-236-238-240; SEQ ID NO: 244-246-248-252-254-256; SEQ ID NO: 260-262-264-268-270-272; SEQ ID NO: 276-278-280-284-286-288; SEQ ID NO: 292-294-296-284-286-288; SEQ ID NO: 300-302-304-284-286-288; SEQ ID NO: 308-310-312-284-286-288; SEQ ID NO: 316-318-320-284-286-288; SEQ ID NO: 324-326-328-284-286-288, и SEQ ID NO: 332-334-336-284-286-288. В другом аспекте, изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающему CD63 человека, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 298, 306, 314, 322 и 330; и (b) вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234,

250, 266 и 282. В следующем аспекте, выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, SEQ ID NO: 18/26, SEQ ID NO: 34/42, SEQ ID NO: 50/58, SEQ ID NO: 66/74, SEQ ID NO: 82/90, SEQ ID NO: 98/106, SEQ ID NO: 114/122, SEQ ID NO: 130/138, SEQ ID NO: 146/154, SEQ ID NO: 162/170, SEQ ID NO: 178/186, SEQ ID NO: 194/202, SEQ ID NO: 210/218, SEQ ID NO: 226/234, SEQ ID NO: 242/250, SEQ ID NO: 258/266, SEQ ID NO: 274/282, SEQ ID NO: 290/282, SEQ ID NO: 298/282, SEQ ID NO: 306/282, SEQ ID NO: 314/282, SEQ ID NO: 322/282 и SEQ ID NO: 330/282.

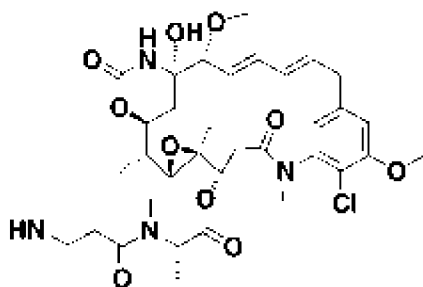
[0038] В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство, содержащим антитело против CD63, его антигенсвязывающий фрагмент или мультиспецифический связывающий белок, содержащий указанный его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в настоящем описании, и лекарственное средство (например, цитотоксическое средство). В некоторых вариантах осуществления, (a) антитело против CD63, антигенсвязывающий фрагмент и/или мультиспецифический связывающий белок, и (b) цитотоксическое средство ковалентно связаны посредством линкера, как обсуждают в настоящем описании. В различных вариантах осуществления, антитело против CD63 или антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой любое из антител против CD63 или фрагментов, описанных в настоящем описании.

[0039] В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическое средство выбрано из производного ауристатина, майтанзиноида, тубулизина, томаймицина, калихеамицина или доластатина. В некоторых случаях, цитотоксическое средство представляет собой ауристатин, выбранный из MMAE или MMAF, или майтанзиноид, выбранный из DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, имеющий структуру из формул, как обсуждают в настоящем описании.

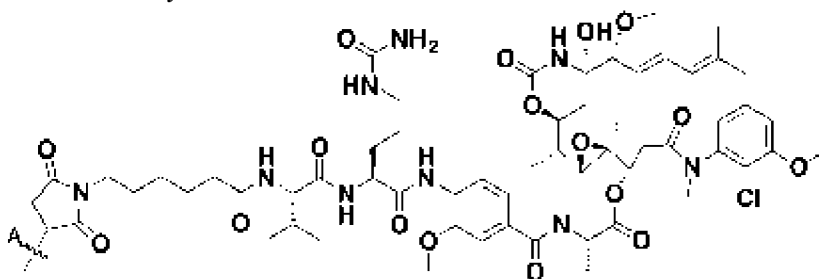
[0040] В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, имеющий структуру:



[0041] В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, имеющий структуру:

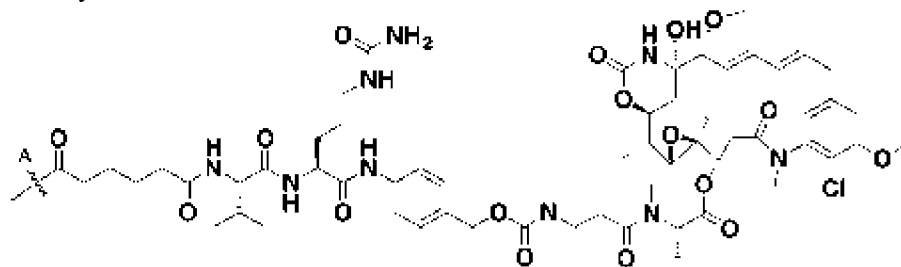


[0042] В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство содержит антигенсвязывающий белок, включая мультиспецифический связывающий белок, содержащий антигенсвязывающий белок против CD63 или его антигенсвязывающую часть, и



где  представляет собой связь с антителом или его фрагментом.

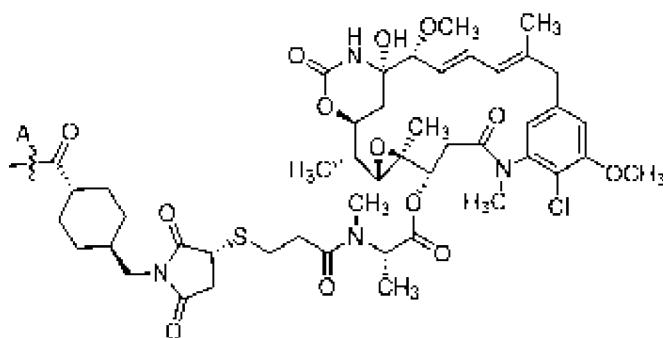
[0043] В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство содержит антигенсвязывающий белок, включая мультиспецифический связывающий белок, содержащий антигенсвязывающий белок против CD63 или его антигенсвязывающую часть, и



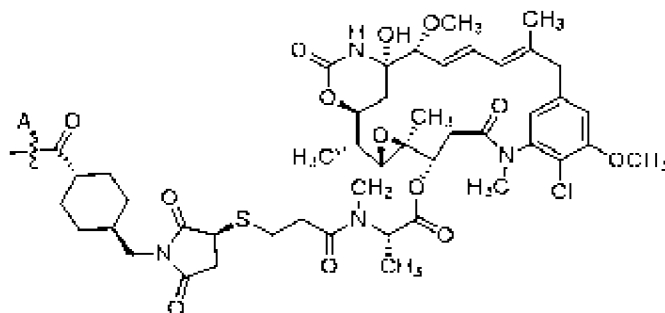
[0044]

где  представляет собой связь с антителом или его фрагментом.

[0045] В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство содержит антигенсвязывающий белок, включая мультиспецифический связывающий белок, содержащий антигенсвязывающий белок против CD63 или его антигенсвязывающую часть, и



или



, или

их смесь,

где $\overset{\text{A}}{\text{---}}$ представляет собой связь с антителом или его фрагментом.

[0046] В некоторых вариантах осуществления, связь осуществляет контакт с антителом или его фрагментом посредством серного составляющего остатка цистеина.

[0047] В некоторых вариантах осуществления, связь осуществляет контакт с антителом или его фрагментом посредством азотного составляющего остатка лизина.

[0048] В любом из различных вариантов осуществления конъюгатов антитело-лекарственное средство, обсуждаемых выше или в этом месте в настоящем описании, конъюгат антитело-лекарственное средство может содержать от 1 до 10 цитотоксических средств на антигенсвязывающий белок, включая мультиспецифический связывающий белок, содержащий антигенсвязывающий белок против CD63 или его антигенсвязывающую часть.

ЧЕРТЕЖИ

[0049] **Фигура 1** схематически представляет мультидоменные терапевтические белки. На панели А изображен мультидоменный терапевтический белок, содержащий биспецифическое антитело (ii) и замещающий фермент (i). На панели В изображен слитый полипептид фермент-Fc (i), связанный со специфическим для эффектора интернализации полуантителом (ii) для формирования мультидоменного терапевтического белка. На панели С изображен замещающий фермент (шестиугольник), ковалентно связанный с С-концом тяжелой цепи антитела против эффектора интернализации. На панели D изображен замещающий фермент (шестиугольник), ковалентно связанный с N-концом тяжелой цепи антитела против эффектора интернализации. На панели Е изображен замещающий фермент (шестиугольник), ковалентно связанный с С-концом легкой цепи

антитела против эффектора интернализации. На панели F изображен замещающий фермент (шестиугольник), ковалентно связанный с N-концом легкой цепи антитела против эффектора интернализации. На панели G изображен замещающий фермент (шестиугольник), ковалентно связанный с C-концом одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), содержащего область V_H (заштрихованный прямоугольник) и область V_L (пустой прямоугольник). На панели H изображен замещающий фермент (шестиугольник), ковалентно связанный с двумя доменами scFv, первым scFv (i), который служит в качестве первого домена для доставки, и вторым scFv (ii), который служит в качестве второго домена для доставки. Иллюстративные аминокислотные последовательности V_H и V_L против CD63 (и кодирующие их нуклеотидные последовательности), которые можно использовать для конструирования мультидоменного терапевтического белка, содержащего антитело против CD63 или его антигенсвязывающую часть, представлены в таблице 1.

[0050] Фигура 2 представляет собой неограничивающий пример иллюстрации генотерапевтического вектора на основе AAV, кодирующего мультидоменный терапевтический белок, представленный в панели, где scFv представляет собой scFv против CD63 человека, и замещающий фермент представляет собой GAA (например, scFv против hCD63::hGAA; см., например, аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO:364, где scFv против hCD63 происходит из антитела H4H12450N. Аминокислоты 1-117 из SEQ ID NO:364 предоставляют аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (V_H) антитела H4H12450N; аминокислоты 118-132 из SEQ ID NO:364 предоставляют аминокислотную последовательность линкера между вариабельными доменами тяжелой и легкой цепи H4H12450N; аминокислоты 133-240 из SEQ ID NO:364 предоставляют аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи (V_L) антитела H4H12450N; аминокислоты 241-245 из SEQ ID NO:364 предоставляют аминокислотную последовательность линкера между scFv против hCD63 и GAA; и аминокислоты 246-1128 из SEQ ID NO:364 предоставляют аминокислотную последовательность замещающего фермента GAA, или его биологически активной части. Иллюстративные последовательности 5'-ITR и 3'-ITR, соответственно, указаны как SEQ ID NO:365 и SEQ ID NO:366. Иллюстративный специфический для печени энхансер (серпин а 1) указан как SEQ ID NO:367. Иллюстративный специфический для печени промотор (TTR) указан как SEQ ID NO:368. Дополнительные иллюстративные аминокислотные последовательности V_H и V_L против CD63 (и кодирующие их нуклеотидные последовательности), которые можно использовать для конструирования мультидоменного терапевтического белка, например, для лечения болезни Помпе у нуждающегося в этом пациента, содержащего антитело против CD63 или его антигенсвязывающую часть, представлены в таблице 1.

ОПИСАНИЕ

[0051] Настоящее изобретение относится к новым антителам против CD63 человека и к их одновалентным антигенсвязывающим фрагментам, которые можно

использовать для опосредования интернализации CD63. Антитела против CD63 человека, и их одновалентные антигенсвязывающие фрагменты можно использовать, например, в лечении заболеваний, в качестве части мультиспецифического антигенсвязывающего белка и/или мультидоменного терапевтического белка, и/или конъюгата антитело-лекарственное средство.

[0052] Это изобретение не является ограниченным описанными конкретными вариантами осуществления, композициями, способами и условиями эксперимента, поскольку такие варианты осуществления, композиции, способы и условия могут меняться. Терминология, используемая в настоящем описании, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления, и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[0053] Несмотря на то, что любые способы и материалы, сходные или эквивалентные с описанными в настоящем описании, можно использовать в практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения, в настоящее время описаны некоторые предпочтительные способы и материалы. Полное содержание всех публикаций, процитированных в настоящем описании, приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, какое является общепринятым для специалиста в области, к которой относится это изобретение.

[0054] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, какое является общепринятым для специалиста в области, к которой относится это изобретение. Термин «приблизительно», при использовании в отношении конкретного перечисленного числового значения, означает, что это значение может отклоняться от перечисленного значения не более, чем на 1%. Например, выражение «приблизительно 100» включает 99 и 101, и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.). Несмотря на то, что любые способы и материалы, сходные или эквивалентные с описанными в настоящем описании, можно использовать в практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения, в настоящее время описаны предпочтительные способы и материалы. Полное содержание всех патентов, заявок и непатентных публикаций, упомянутых в настоящем описании, приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

[0055] «CD63» включает белок, который у человека кодирован геном CD63 и имеет аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO:337. CD63 является членом суперсемейства тетраспанинов, белков клеточной поверхности, пересекающих мембрану клетки четыре раза. CD63 экспрессируется практически во всех тканях, и его считают вовлеченным в формирование и стабилизацию передающих сигналы комплексов. CD63 локализован на мембране клетки, мембране лизосомы и мембране поздней эндосомы. Известно, что CD63 связывается с интегринами и может быть вовлечен в эпителиально-мезенхимальный переход. См. H. Maecker et al., «The tetraspanin superfamily:

molecular facilitators», 11(6) FASEB J. 428-42, May 1997; и M. Metzelaar et al., «CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells», 266 J. Biol. Chem. 3239-3245, 1991. Для CD63 показаны виды биологической активности эффектора интернализации. Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белков в настоящем описании предназначены для обозначения человеческого варианта соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если конкретно не указано, что они происходят из не относящегося к человеку вида. Таким образом, выражение «CD63» обозначает CD63 человека, если не указано, что он происходит из не относящегося к человеку вида, например, «CD63 мыши», «CD63 обезьяны» и т.д.

[0056] «Эффектор интернализации» включает белок, который способен к интернализации в клетку или который иным образом участвует или вносит вклад в ретроградный мембранный транспорт. В некоторых случаях, эффектор интернализации представляет собой белок, который подвергается транцитозу; то есть, белок подвергается интернализации на одной стороне клетки и транспорту к другой стороне клетки (например, от апикальной к базальной). Во многих вариантах осуществления, белок эффектор интернализации представляет собой экспрессированный на клеточной поверхности белок или растворимый внеклеточный белок. Однако, настоящее изобретение относится также к вариантам осуществления, в которых белок эффектор интернализации экспрессируется внутри внутриклеточного компартмента такого как эндосома, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосома и т.д. Например, белки, вовлеченные в ретроградный мембранный транспорт (например, пути от ранних/рециркулирующих эндосом к сети транс-Гольджи), могут служить белками эффекторами интернализации в различных вариантах осуществления настоящего изобретения. В любом случае, связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включая содержащие их мультидоменные терапевтические белки и мультиспецифические связывающие белки, с белком эффектором интернализации вынуждает полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включая содержащие их мультидоменные терапевтические белки и мультиспецифические связывающие белки, и любые молекулы, связанные с ними (например, фермент, молекулу-мишень, конъюгат лекарственного средства), также подвергаться интернализации в клетку. Как объяснено ниже, белки эффекторы интернализации включают белки, подвергающиеся непосредственной интернализации в клетку, так же как белки, подвергающиеся опосредованной интернализации в клетку. Белки эффекторы интернализации, подвергающиеся непосредственной интернализации в клетку, включают связанные с мембраной молекулы с по меньшей мере одним внеклеточным доменом (например, трансмембранные белки, заякоренные посредством GPI белки и т.д.), которые подвергаются клеточной интернализации, и предпочтительно, подвергаются процессингу посредством внутриклеточного пути деградации и/или рециркуляции.

[0057] Фраза «антитело, которое связывает CD63», или «антитело против CD63» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически узнают отдельную молекулу CD63. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут связывать растворимый CD63 и/или экспрессированный на клеточной поверхности CD63. Растворимый CD63 включает природные белки CD63, так же как варианты рекомбинантного белка CD63, которые лишены трансмембранного домена или по иным причинам не ассоциированы с мембраной клетки, например, но без ограничения, рекомбинантный белок с С-концевым Мус-Мус- гексагистидином (ЕС петля 2 hCD63-MMH; SEQ ID NO:338) или рекомбинантный CD63 человека с внеклеточной петлей 2, экспрессированный с С-концевой меткой Fc человека (ЕС петля 2 hCD63-hFc; SEQ ID NO:339).

[0058] Выражение «экспрессированный на клеточной поверхности CD63» относится к одному или нескольким белку(белкам) CD63, который/которые экспрессированы на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo*, таким образом, что по меньшей мере часть белка CD63 экспонирована на внеклеточной стороне мембраны клетки и является доступной для антигенсвязывающей части антитела. «Экспрессированный на клеточной поверхности CD63» включает белки CD63, содержащиеся, в контексте функционального Т-клеточного рецептора, в мембране клетки. «Экспрессированный на клеточной поверхности CD63» может содержать или состоять из белка CD63, экспрессированного на поверхности клетки, которая в норме экспрессирует белок CD63. Альтернативно «экспрессированный на клеточной поверхности CD63» может содержать или состоять из белка CD63, экспрессированного на поверхности клетки, которая в норме не экспрессирует CD63 человека на своей поверхности, но которая была искусственно модифицирована для экспрессии CD63 на своей поверхности.

[0059] Термин «антигенсвязывающая молекула» включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифические антитела.

[0060] Термин «авидность» относится к способности антигенсвязывающей молекулы достигать предела привлечения мишени для достижения желательного для нее эффекта. Фраза «управляемое авидностью связывание» или «управляемое авидностью спаривание», в контексте множества антигенов-мишеней и мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, относится к механизму действия, где мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула предоставляет по меньшей мере два одновалентных связывающих плеча, и первое связывающее плечо (или плечи) связывается с первым антигеном-мишенью с высокой аффинностью. Второе связывающее плечо (или плечи) связывается с вторым антигеном-мишенью с низкой аффинностью, так что второе связывающее плечо не связывает второй антиген-мишень, пока оба антигена не окажутся поблизости друг от друга, например, присутствующими на одной и той же клетке. Таким образом, высокоаффинное связывание с первым антигеном-мишенью увеличивает авидность низкоаффинного плеча для второго связывающего плеча и опосредует связывание с второй мишенью (Rhoden, J.J., et al., May 20, 2016, J Biol Chem.

291, 11337-11347, first published on March 28, 2016 doi: 10.1074/jbc.M116.714287; Jarantow, S.W., et al., October 9, 2015, J Biol Chem. 290(41):24689-704. doi: 10.1074/jbc.M115.651653. Epub 2015 Aug 10).

[0061] Термин «антитело» обозначает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащие по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, CD63). Термин «антитело», в рамках изобретения, включает молекулы иммуноглобулинов, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, так же как их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (обозначенную в настоящем описании как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (обозначенную в настоящем описании как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен, CL. Области VH и VL можно далее подразделять на области гипервариабельности, названные определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся областями, которые являются более консервативными, названными каркасными областями (FR). Каждый из VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, аранжированных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (CDR тяжелой цепи могут быть сокращенно обозначены как HCDR1, HCDR2 и HCDR3; CDR легкой цепи могут быть сокращенно обозначены как LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Термин «высокоаффинное» антитело относится к антителам, имеющим аффинность связывания со своей мишенью по меньшей мере 10^{-9} M, по меньшей мере 10^{-10} M; по меньшей мере 10^{-11} M; или по меньшей мере 10^{-12} M, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORETM или ELISA для определения аффинности в растворе. Термин «антитело» может включать любой тип антитела, например, такое как моноклональное или поликлональное. Кроме того, антитело может происходить из любого источника, например, такого как относящийся к млекопитающим или не относящийся к млекопитающим. В одном варианте осуществления, антитело может происходить из млекопитающих или птиц. В следующем варианте осуществления, антитело может иметь человеческое происхождение и может, кроме того, представлять собой человеческое моноклональное антитело.

[0062] Термин «антитело» включает также антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п. включают любой природный, поддающийся получению ферментным способом, синтетический или полученный способами генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с формированием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получать, например, из полноразмерных молекул антител с

использованием любых подходящих стандартных способов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные способы генной инженерии, включающих манипуляцию с ДНК и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены антитела. Такая ДНК является известной и/или является легко доступной, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и подвергать манипуляциям химически или с использованием способов молекулярной биологии, например, для аранжировки одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или для введения кодонов, образования остатков цистеина, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

[0063] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают : (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы узнавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих гиперпеременную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или пептид FR3-CDR3-FR4 с затрудненной конформацией. Другие сконструированные молекулы, такие как доменспецифические антитела, однодоменные антитела, антитела с делетированным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, наноантитела (например, одновалентные наноантитела, двухвалентные наноантитела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульных белков малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также включены в выражение «антигенсвязывающий фрагмент».

[0064] Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и может, как правило, содержать по меньшей мере одну CDR, смежную или находящуюся в одной рамке считывания с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H, связанный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут быть расположены друг относительно друга в любой пригодной аранжировке. Например, переменная область может являться димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L.

[0065] В конкретных вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые можно обнаружить внутри антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-

$C_{H2}-C_{H3}$; (vi) $V_H-C_{H2}-C_{H3}$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_{H1} ; (ix) V_L-C_{H2} ; (x) V_L-C_{H3} ; (xi) $V_L-C_{H1}-C_{H2}$; (xii) $V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (xiii) $V_L-C_{H2}-C_{H3}$; и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены либо могут быть напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной, или линкерной области. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между смежными переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомдимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной связи(связей)).

[0066] Как и полноразмерные молекулы антитела, антигенсвязывающие фрагменты могут являться моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела может, как правило, содержать по меньшей мере два различных переменных домена, где каждый переменный домен является способным к специфическому связыванию с отдельным антигеном или с отличным эпитопом на том же самом антигене. Любой формат мультиспецифического антитела, включая иллюстративные форматы биспецифического антитела, описанные в настоящем описании, можно адаптировать для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием общепринятых способов, доступных в данной области.

[0067] Антитела по настоящему изобретению могут функционировать посредством комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимой опосредуемой клетками цитотоксичности (ADCC). «Комплементзависимая цитотоксичность» (CDC) относится к лизису экспрессирующих антиген клеток посредством антитела по настоящему изобретению в присутствии комплемента. «Антителозависимая опосредуемая клетками цитотоксичность» (ADCC) относится к опосредованной клетками реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие рецепторы Fc (FcR) (например, клетки естественные киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), узнают связанное антитело на клетке-мишени и, таким образом, приводят к лизису клетки-мишени. CDC и ADCC можно измерять с использованием анализов, хорошо известных и доступных в данной области. (См., например, Патенты США No 5500362 и 5821337, и Clynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656). Константная область антитела является важной для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточнозависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основе того, является ли желательным, чтобы это антитело опосредовало цитотоксичность.

[0068] В конкретных вариантах осуществления изобретения, антитела против CD63 по настоящему изобретению представляют собой человеческие антитела. Термин «человеческое антитело» обозначает антитела, имеющие переменные и константные области, происходящие из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. Человеческие антитела по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодированные человеческими зародышевыми последовательностями иммуноглобулинов (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*), например, в CDR, и в частности, CDR3. Однако, термин «человеческое антитело» не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевых последовательностей других видов млекопитающих, таких как мышь, привиты в человеческие каркасные последовательности.

[0069] Антитела по настоящему изобретению могут, в некоторых вариантах осуществления, представлять собой рекомбинантные человеческие антитела. Термин «рекомбинантное человеческое антитело» предназначен для включения всех человеческих антител, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных рекомбинантными способами, таких как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описанного ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител (дополнительно описанной ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), трансгенной по генам человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антител, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных любыми другими способами, включающими сплайсинг последовательностей гена человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, происходящие из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. В конкретных вариантах осуществления, однако, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или, когда используют животного, трансгенного по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L из рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, в то время как происходят из зародышевых последовательностей V_H и V_L человека, и являются родственными им, могут не существовать в природе в пределах зародышевого репертуара человеческих антител *in vivo*.

[0070] Человеческие антитела могут существовать в двух формах, что связано с гетерогенностью шарнира. В одной форме, молекула иммуноглобулина содержит стабильную конструкцию из четырех цепей приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе посредством дисульфидных связей между тяжелыми цепями. Во второй форме, димеры не являются связанными посредством межцепевых

дисульфидных связей, и формируется молекула приблизительно 75-80 кДа, составленная из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепи (полуантитело). Разделять эти формы было необычайно сложно, даже после аффинной очистки.

[0071] Частота встречаемости второй формы в разных интактных изотипах IgG обусловлена, но без ограничения, структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области этого антитела. Замена одиночной аминокислоты в шарнирной области шарнира IgG4 человека может значительно уменьшать появление второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнира IgG1 человека. Настоящее изобретение относится к антителам с одной или несколькими мутациями в шарнирной области, в области C_H2 или C_H3, которые могут являться желательными, например, в производстве, для улучшения выхода желательной формы антитела.

[0072] Антитела по настоящему изобретению могут представлять собой выделенные антитела. «Выделенное антитело» обозначает антитело, идентифицированное и отделенное и/или выделенное по меньшей мере из одного компонента его естественного окружения. Например, антитело, отделенное или удаленное по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которых антитело естественным образом существует или естественным образом продуцируется, представляет собой «выделенное антитело», для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело включает также антитело *in situ* внутри рекомбинантной клетки. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые подвергали по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, выделенное антитело может являться в основном свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

[0073] Настоящее изобретение относится также к одноплечевым антителам, которые связывают CD63. Термин «одноплечевое антитело» обозначает антигенсвязывающую молекулу, содержащую одну тяжелую цепь антитела и одну легкую цепь антитела. Одноплечевые антитела по настоящему изобретению могут содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в таблице 1.

[0074] Антитела против CD63, описанные в настоящем описании, могут содержать одну или несколько замен, вставок и/или делеций аминокислот в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепи, по сравнению с соответствующими зародышевыми последовательностями, из которых происходят антитела. Такие мутации можно легко определять посредством сравнения аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем описании, с зародышевыми последовательностями, доступными, например, из публичных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, происходящим из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем описании, где одна или несколько

аминокислот внутри одной или нескольких каркасных областей и/или областей CDR подвергнуты мутагенезу до соответствующего остатка(остатков) зародышевой последовательности, из которой происходит антитело, или до соответствующего остатка(остатков) другой человеческой зародышевой последовательности, или до консервативной аминокислотной замены соответствующего зародышевого остатка(остатков) (такие изменения последовательности в совокупности обозначены в настоящем описании как «зародышевые мутации»). Специалист в данной области, начиная с последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепи, описанных в настоящем описании, может легко получать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или несколько индивидуальных зародышевых мутаций, или их комбинации. В конкретных вариантах осуществления, все из остатков каркасной области и/или CDR внутри доменов V_H и/или V_L подвергают обратному мутагенезу до остатков, обнаруженных в исходной зародышевой последовательности, из которой происходит антитело. В других вариантах осуществления, только определенные остатки подвергают обратному мутагенезу до исходной зародышевой последовательности, например, только мутантные остатки, обнаруженные в пределах первых 8 аминокислот из FR1 или в пределах последних 8 аминокислот из FR4, или только мутантные остатки, обнаруженные в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления, один или несколько из остатка(остатков) каркасной области и/или CDR подвергают мутагенезу до соответствующего остатка(остатков) другой зародышевой последовательности (т.е., зародышевой последовательности, отличной от зародышевой последовательности, из которой исходно происходит антитело). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или более зародышевых мутаций внутри каркасных областей и/или областей CDR, например, где определенные индивидуальные остатки подвергают мутагенезу до соответствующего остатка конкретной зародышевой последовательности, в то время как определенные другие остатки, отличные от исходной зародышевой последовательности, сохраняют или подвергают мутагенезу до соответствующего остатка другой зародышевой последовательности. После получения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или несколько зародышевых мутаций, можно легко тестировать по одному или нескольким желательным свойствам, таким как улучшенная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от случая), уменьшенная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, включены в настоящее изобретение.

[0075] Настоящее изобретение также относится к антителам против CD63, содержащим варианты любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем описании, имеющие одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение относится к антителам против

CD63, имеющим аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, указанных в таблице 1 в настоящем описании.

[0076] Выражение «биспецифическое антитело» относится к антителу, способному к избирательному связыванию с двумя или более эпитопами. Биспецифические антитела, как правило, содержат две различных тяжелых цепи, где каждая тяжелая цепь специфически связывает отличный эпитоп - либо на двух различных молекулах (например, антигенах), либо на той же самой молекуле (например, на том же самом антигене). Если биспецифическое антитело является способным к избирательному связыванию двух различных эпитопов (первого эпитопа и второго эпитопа), аффинность первой тяжелой цепи для первого эпитопа может, как правило, составлять по меньшей мере на от одного до двух или трех, или четырех порядков величины ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи для второго эпитопа, и наоборот. Эпитопы, узнаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной и той же или отличной мишени (например, на одном и той же или отличном белке). Биспецифические антитела можно получать, например, посредством комбинирования тяжелых цепей, узнающих отличные эпитопы на одном и том же антигене. Например, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные области тяжелых цепей, узнающих отличные эпитопы одного и того же антигена, можно сливать с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими различные константные области тяжелых цепей, и такие последовательности можно экспрессировать в клетке, экспрессирующей легкую цепь иммуноглобулина. Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи, за которыми следуют (от N-конца к С-концу) домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3, и легкую цепь иммуноглобулина, либо которая не вносит вклад в специфичность связывания антигена, но которая может вступать в ассоциацию с каждой тяжелой цепью, либо которая может вступать в ассоциацию с каждой тяжелой цепью и которая может связывать один или несколько из эпитопов, связываемых антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, либо которая может вступать в ассоциацию с каждой тяжелой цепью и обеспечивать связывание либо одной, либо обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами.

[0077] Выражение «тяжелая цепь» или «тяжелая цепь иммуноглобулина» включает последовательность константной области тяжелой цепи иммуноглобулина из любого организма, и если не указано иное, включает переменный домен тяжелой цепи. Переменные домены тяжелой цепи включают три CDR и четыре области FR тяжелой цепи, если не указано иное. Фрагменты тяжелых цепей включают CDR, CDR и FR, и их комбинации. Типичная тяжелая цепь имеет, после переменного домена (от N-конца к С-концу), домен CH1, шарнир, домен CH2, и домен CH3. Функциональный фрагмент тяжелой цепи включает фрагмент, способный к специфическому узнаванию антигена

(например, узнаванию антигена с КД в микромолярном, наномолярном или пикомолярном диапазоне), который является способным к экспрессии и секреции из клетки, и который содержит по меньшей мере один CDR.

[0078] Выражение «легкая цепь» включает последовательность константной области легкой цепи иммуноглобулина из любого организма, и если не указано иное, включает легкие цепи каппа и лямбда человека. Вариабельные домены легкой цепи (VL), как правило, включают три CDR и четыре каркасных области (FR) легкой цепи, если не указано иное. Как правило, полноразмерная легкая цепь включает, от amino-конца до карбокси-конца, домен VL, включающий FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, и константный домен легкой цепи. Легкие цепи, которые можно использовать по настоящему изобретению, включают, например, легкие цепи, которые не связывают избирательно либо первый, либо второй антиген, избирательно связываемый антигенсвязывающим белком. Пригодные легкие цепи включают легкие цепи, которые можно идентифицировать посредством скрининга по наиболее часто используемым легким цепям в существующих библиотеках антител (в экспериментальных библиотеках или *in silico*), где легкие цепи по существу не создают помех для аффинности и/или избирательности антигенсвязывающих доменов антигенсвязывающих белков. Пригодные легкие цепи включают легкие цепи, которые могут связывать один или несколько эпитопов, связываемых антигенсвязывающими областями антигенсвязывающего белка.

[0079] Выражение «вариабельный домен» включает аминокислотную последовательность легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (модифицированной, как желательно), которая содержит следующие аминокислотные области, в последовательности от N-конца к C-концу (если не указано иное): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. «Вариабельный домен» включает аминокислотную последовательность, способную к сворачиванию в канонический домен (VH или VL), имеющий структуру двойного бета-листа, где бета-листы соединены посредством дисульфидной связи между остатком первого бета-листа и второго бета-листа.

[0080] Выражение «определяющая комплементарность область», или термин «CDR», включает аминокислотную последовательность, кодированную последовательностью нуклеиновой кислоты генов иммуноглобулинов организма, которая в норме (т.е., у животного дикого типа) встречается между двумя каркасными областями в вариабельной области легкой или тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина (например, антитела или Т-клеточного рецептора). CDR может быть кодирована, например, зародышевой последовательностью, или подвергнутой реаранжировке или не подвергнутой реаранжировке последовательностью, и, например, в наивной или зрелой В-клетке или Т-клетке. В некоторых условиях (например, для CDR3), CDR может быть кодирована двумя или более последовательностями (например, зародышевыми последовательностями), которые не являются непрерывными (например, в не подвергнутой реаранжировке последовательности нуклеиновой кислоты), но являются непрерывными в последовательности нуклеиновой кислоты в В-клетке, например, в

результате сплайсинга или соединения последовательностей (например, рекомбинации V-D-J для формирования CDR3 тяжелой цепи).

[0081] Термин «фрагмент антитела», относится к одному или нескольким фрагментам антитела, сохраняющими способность к специфическому связыванию с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин «фрагмент антитела», включают (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одноплечевого антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 241:544-546), состоящий из домена VH, (vi) выделенную CDR и (vii) scFv, состоящий из двух доменов фрагмента Fv, VL и VH, соединенных посредством синтетического линкера с образованием одиночной цепи белка, в которой области VL и VH образуют пару с формированием одновалентных молекул. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также включены в термин «антитело» (см., например, Holliger et al. (1993) *PNAS USA* 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123).

[0082] Выражение «содержащий Fc белок» включает антитела, биспецифические антитела, иммуноадгезины и другие связывающие белки, которые содержат по меньшей мере функциональную часть области CH2 и CH3 иммуноглобулина. «Функциональная часть» относится к области CH2 и CH3, которая может связываться с рецептором Fc (например, FcγR; или FcRn, т.е., неонатальным рецептор Fc), и/или которая может участвовать в активации комплемента. Если область CH2 и CH3 содержит делеции, замены и/или вставки, или другие модификации, которые делают ее неспособной связываться с любым рецептором Fc, а также неспособной активировать комплемент, область CH2 и CH3 является нефункциональной.

[0083] Содержащие Fc белки могут содержать модификации в доменах иммуноглобулинов, включая случаи, когда модификации влияют на одну или несколько эффекторных функций связывающего белка (например, модификации, влияющие на связывание FcγR, связывание FcRn и таким образом, время полужизни, и/или активность CDC). Такие модификации включают, но без ограничения, следующие модификации и их комбинации, применительно к нумерации EU константной области иммуноглобулина: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438 и 439.

[0084] В качестве неограничивающего примера, связывающий белок представляет собой содержащий Fc белок и имеет увеличенное время полужизни в сыворотке (по сравнению с таким же содержащим Fc белком без перечисленных модификации(модификаций)), и имеет модификацию в положении 250 (например, E или

Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в 428 и/или 433 (например, L/R/SI/P/Q или K), и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в 250 и/или 428; или модификацию в 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В другом примере, модификация может включать модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 2591 (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[0085] Термин «антигенсвязывающий белок», в рамках изобретения, относится к полипептиду или белку (одному или нескольким полипептидам, собранным в комплексе в функциональную единицу), специфически узнающему эпитоп на антигене, таком как специфический для клетки антиген и/или антиген-мишень по настоящему изобретению. Антигенсвязывающий белок может являться мультиспецифическим. Термин «мультиспецифический», применительно к антигенсвязывающему белку, означает, что белок узнает различные эпитопы, либо на одном и том же same антигене, либо на различных антигенах. Мультиспецифический антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению может представлять собой одиночный многофункциональный полипептид, или может представлять собой мультимерный комплекс из двух или более полипептидов, которые ковалентно или нековалентно связаны друг с другом. Термин «антигенсвязывающий белок» включает антитела или их фрагменты по настоящему изобретению которые могут являться связанными или совместно экспрессированными с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент может являться функционально связанным (например, посредством химического соединения, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими молекулами, такими как белок или его фрагмент, для получения биспецифической или мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы со второй специфичностью связывания.

[0086] «Мультидоменный терапевтический белок» включает (i) одиночный белок, содержащий более одного функционального домена, (ii) белок, содержащий более одной полипептидной цепи, и (iii) смесь из более чем одного белка или более чем одного полипептида. Термин полипептид, как правило, принимают для обозначения одиночной цепи аминокислот, связанных пептидными связями. Термин белок включает термин полипептид, но также включает более сложные структуры. То есть, одиночный полипептид представляет собой белок, и белок может содержать один или несколько полипептидов, связанных в структуре более высокого порядка. Например, гемоглобин представляет собой белок, содержащий четыре полипептида: два полипептида альфа-глобина и два полипептида бета-глобина. Миоглобин также представляет собой белок, но он содержит только один полипептид миоглобина.

[0087] Мультидоменный терапевтический белок содержит один или несколько полипептид(ов) и по меньшей мере два домена, обеспечивающих две функции. Один из этих доменов представляет собой «домен фермента», обеспечивающий замещение активности дефектного белка, связанного с заболеванием с недостаточностью фермента. Другой из этих доменов представляет собой «домен для доставки», обеспечивающий связывание с эффектором интернализации, например, CD63, таким как антитело против CD63, как описано в настоящем описании, или его антигенсвязывающий фрагмент. Таким образом, одиночный полипептид, обеспечивающий замещение активности фермента и способность к связыванию с эффектором интернализации (также известный как связывающий эффектор интернализации белок (активность домена для доставки), представляет собой мультидоменный терапевтический белок. Также, смесь белков, где один белок обеспечивает функцию фермента, и другой белок обеспечивает активность связывания с эффектором интернализации, представляет собой мультидоменный терапевтический белок

[0088] Термин «белок» обозначает любой аминокислотный полимер, имеющий более чем приблизительно 20 аминокислот, ковалентно связанных амидными связями. Белки содержат одну или несколько аминокислотных полимерных цепей, в общем, известных в данной области как «полипептиды». Таким образом, полипептид может представлять собой белок, и белок может содержать множество полипептидов для формирования одной функциональной биомолекулы. Дисульфидные мостики (т.е., между остатками цистеина для образования цистина) могут присутствовать в некоторых белках. Эти ковалентные связи могут находиться в одной полипептидной цепи, или между двумя индивидуальными полипептидными цепями. Например, дисульфидные мостики являются необходимыми для надлежащей структуры и функции инсулина, иммуноглобулинов, протамина и т.п. Недавний обзор образования дисульфидной связи см. в Oka and Bulleid, «Forming disulfides in the endoplasmic reticulum», 1833(11) *Biochim Biophys Acta* 2425-9 (2013).

[0089] В рамках изобретения, «белок» включает биотерапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки-ловушки и другие слитые с Fc белки, химерные белки, антитела, моноклональные антитела, человеческие антитела, биспецифические антитела, фрагменты антител, наноантитела, рекомбинантные химеры антител, слитые с scFv белки, цитокины, хемокины, пептидные гормоны, и т.п. Белки можно получать с использованием систем продукции на основе рекомбинантных клеток, таких как система бакуловирусов насекомых, системы дрожжей (например, вида *Pichia*), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Недавний обзор, обсуждающий биотерапевтические белки и их продукцию, см. в Ghaderi et al., «Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation», 28 *Biotechnol Genet Eng Rev.* 147-75 (2012).

[0090] В рамках изобретения, термин «эпитоп» относится к части антигена, узнаваемой мультиспецифическим антигенсвязывающим полипептидом. Один антиген (такой как антигенный полипептид) может иметь более одного эпитопа. Эпитопы можно определять как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, в общем, представляют собой подгруппу структурных эпитопов, и их определяют как те остатки, которые вносят непосредственный вклад в аффинность взаимодействия между антигенсвязывающим полипептидом и антигеном. Эпитопы могут также являться конформационными, то есть, составленными из нелинейных аминокислот. В конкретных вариантах осуществления, эпитопы могут включать детерминанты, представляющие собой химически активные поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и, в конкретных вариантах осуществления, могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, и/или специфические характеристики заряда. Эпитопы, сформированные из непрерывных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, сформированные посредством третичного сворачивания, как правило, теряются при обработке денатурирующими растворителями.

[0091] Термин «домен» относится к любой части белка или полипептида, имеющей конкретную функцию или структуру. Предпочтительно, домены по настоящему изобретению связываются со специфическими для клеток антигенами или антигенами-мишенями. Домены, связывающие специфический для клетки антиген или антиген-мишень, и т.п., в рамках изобретения, включают любой природный, поддающийся получению ферментным способом, синтетический или полученный способом генной инженерии полипептид или гликопротеин, специфически связывающийся с антигеном.

[0092] Термин «полутело» или «полуантитело», используемые взаимозаменяемо, относится к половине антитела, которая в основном содержит одну тяжелую цепь и одну легкую цепь. Тяжелые цепи антитела могут формировать димеры, таким образом, тяжелая цепь одного полуантитела может вступать в ассоциацию с тяжелой цепью, связанной с другой молекулой (например, другим полуантителом) или другим содержащим Fc полипептидом. Два немного различных домена Fc могут «гетеродимеризоваться», как при формировании биспецифических антител или других гетеродимеров, -тримеров, -тетрамеров и т.п. См. Vincent and Murini, «Current strategies in antibody engineering: Fc engineering and pH-dependent antigen binding, bispecific antibodies and antibody drug conjugates», 7 Biotechnol. J. 1444-1450 (20912); и Shimamoto et al., «Peptibodies: A flexible alternative format to antibodies», 4(5) MAbs 586-91 (2012).

[0093] В одном варианте осуществления, переменный домен полуантитела специфически узнает эффектор интернализации, и домен Fc полутела димеризуется со слитым с Fc белком, который содержит замещающий фермент (например, пептидное антитело) Id, 586.

[0094] Термин «одноцепочечный вариабельный фрагмент» или «scFv» включает одноцепочечный слитый полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина и вариабельную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, VH и VL соединены посредством линкерной последовательности из 10-25 аминокислот. Полипептиды scFv могут также включать другие аминокислотные последовательности, такие как области CL или CH1. Молекулы scFv можно изготавливать посредством фагового дисплея или получать посредством прямого субклонирования тяжелых и легких цепей из гибридомы или В-клетки. Содержание Ahmad et al., Clinical and Developmental Immunology, volume 2012, article ID 98025 приведено в настоящем описании в качестве ссылки на способы получения фрагментов scFv посредством фагового дисплея и клонирования домена антитела.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы

[0095] Антитела против CD63 и их антигенсвязывающие фрагменты (включая мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультидоменные терапевтические белки, содержащие антитела против CD63 или их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению могут являться моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут являться специфическими для различных эпитопов одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические для более чем одного полипептида-мишени. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Антитела против CD63 и их антигенсвязывающие фрагменты (включая мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультидоменные терапевтические белки, содержащие антитела против CD63 или их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению могут являться связанными или совместно экспрессированными другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент может являться функционально связанным (например, посредством химического соединения, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими молекулами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, для получения биспецифического или мультиспецифического антитела со второй или дополнительной специфичностью связывания.

[0096] Использование выражения «антитело против CD63» в настоящем описании предназначено для включения моноспецифических антител против CD63, так же как биспецифических антител, содержащих связывающее CD63 плечо и связывающее «мишень» плечо. Таким образом, настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам, где одно плечо иммуноглобулина связывает CD63 человека, и другое плечо иммуноглобулина является специфическим для другой молекулы-мишени. Связывающее CD63 плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в таблице 1 в настоящем описании.

[0097] В конкретных вариантах осуществления, связывающее CD63 плечо связывается с CD63 человека и индуцирует интернализацию CD63 и связанного с ним антитела. В конкретных вариантах осуществления, связывающее CD63 плечо слабо связывается с CD63 человека и индуцирует интернализацию CD63 и связанного с ним антитела. В других вариантах осуществления, связывающее CD63 плечо слабо связывается с CD63 человека и индуцирует уничтожение экспрессирующей опухолеассоциированный антиген клетки в контексте биспецифического или мультиспецифического антитела, например, содержащего связывающее CD63 плечо и связывающее «мишень» плечо, где связывающее «мишень» плечо связывает опухолеассоциированный антиген (ТАА). Неограничивающие примеры специфических опухолеассоциированных антигенов включают, например, AFP, ALK, белки BAGE, β -катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразу IX, каспазу-8, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EphA2, Fra-1, FOLR1, белки GAGE (например, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, белки MAGE (например, MAGE-1, -2, -3, -4, -6, и -12), MART-1, мезотелин, ML-IAP, Muc1, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), белки RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвивин, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, тирозиназу и уроплакин-3. В других вариантах осуществления, связывающее CD63 плечо слабо связывается или вступает в ассоциацию с CD63 человека и яванского макака (обезьяны), хотя взаимодействие связывания не поддается детекции посредством анализов *in vitro*, известных в данной области.

[0098] В конкретных иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения, биспецифическая антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифического антитела содержит переменный домен тяжелой цепи (HCVR) и переменный домен легкой цепи (LCVR). В контексте биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей первый и второй антигенсвязывающий домен (например, биспецифического антитела), CDR первого антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом «A1», и CDR второго антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом «A2». Таким образом, CDR первого антигенсвязывающего домена могут быть обозначены в настоящем описании как A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3; и CDR второго антигенсвязывающего домена могут быть обозначены в настоящем описании как A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3.

[0099] Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть напрямую или опосредованно связаны друг с другом для формирования биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению. Альтернативно, каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена может быть связан с отдельным мультимеризующим

доменом. Ассоциация одного мультимеризующего домена с другим мультимеризующим доменом способствует ассоциации между двумя антигенсвязывающими доменами, таким образом, формированию биспецифической антигенсвязывающей молекулы. «Мультимеризующий домен» представляет собой любые макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, имеющие способность к ассоциации с вторым мультимеризующим доменом таких же или сходных структуры или состава. Например, мультимеризующий домен может представлять собой полипептид, содержащий домен СНЗ иммуноглобулина. Неограничивающим примером мультимеризующего компонента является фрагмент Fc иммуноглобулина (содержащий домен C_H2-C_H3), например, домен Fc IgG, выбранный из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, так же как любого аллотипа внутри каждой группы изотипов.

[0100] Биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению, как правило, содержат два мультимеризующих домена, например, два домена Fc, каждый из которых индивидуально составляет часть отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй мультимеризующий домены могут принадлежать к одному и тому же изотипу IgG, например, такие как IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. Альтернативно, первый и второй мультимеризующие домены могут принадлежать к различным изотипам IgG например, такие как IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т.д.

[0101] В конкретных вариантах осуществления, мультимеризующий домен представляет собой фрагмент Fc или аминокислотную последовательность длиной от 1 до приблизительно 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. В других вариантах осуществления, мультимеризующий домен представляет собой остаток цистеина или короткий содержащий цистеин пептид. Другие мультимеризующие домены включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой молнии, мотива спираль-петля, или суперспирального мотива.

[0102] Любой формат или технологию биспецифического антитела можно использовать для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению. Например, антитело или его фрагмент, имеющие первую специфичность связывания антигена, можно функционально связывать (например, посредством химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или несколькими другими видами молекул, таким как другое антитело или фрагмент антитела, имеющие вторую специфичность связывания антигена, для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы. Конкретные иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают, без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или биспецифические форматы диател, слитые белки IgG-scFv, Ig с двойным вариабельным доменом (DVD), антитела квадromы, антитела типа выступ во впадину, антитела с общей легкой цепью (например, общей легкой цепью с выступами во впадины и т.д.), антитела CrossMab, антитела CrossFab, антитела (SEED), лейциновую молнию, антитела Duobody, IgG1/IgG2, IgG с Fab с двойным действием (DAF) и

биспецифические форматы Mab² (см., например, в Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, и в процитированных в этом документе ссылках, обзор вышеуказанных форматов).

[0103] В контексте биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, мультимеризующие домены, например, домены Fc, могут содержать одно или несколько изменений аминокислот (например, вставок, делеций или замен), по сравнению с относящимся к дикому типу, природным вариантом домена Fc. Например, настоящее изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим одну или несколько модификаций в домене Fc, приводящим к модифицированному домену Fc, имеющему модифицированное взаимодействие связывания (например, увеличенное или уменьшенное) между Fc и FcRn. В одном варианте осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в области C_H2 или C_H3, где модификация увеличивает аффинность домена Fc с FcRn в кислом окружении (например, в эндосоме, где pH лежит в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления, модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[0104] Настоящее изобретение относится также к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим первый домен C_H3 и второй домен C_H3 Ig, где первый и второй домены C_H3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере на одну аминокислоту, и где по меньшей мере одно отличие аминокислоты уменьшает связывание биспецифического антитела с белком А, по сравнению с биспецифическим антителом, лишенным отличия аминокислоты. В одном варианте осуществления, первый домен C_H3 Ig связывает белок А, и второй домен C_H3 Ig содержит мутацию, которая уменьшает или прекращает связывание белка А, такую как модификация H95R (согласно нумерации экзонов IMGT; H435R согласно нумерации EU). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). См., например, Патент США No. 8586713. Дополнительные модификации, которые можно обнаружить во втором C_H3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I, согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I, согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S,

K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I, согласно EU) в случае антител IgG4.

[0105] В конкретных вариантах осуществления, домен Fc может являться химерным, объединяющим последовательности Fc, происходящие более, чем из одного изотипа иммуноглобулинов. Например, химерный домен Fc может содержать, частично или полностью, последовательность C_H2, происходящую из области C_H2 IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, и, частично или полностью, последовательность C_H3, происходящую из IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Химерный домен Fc может также содержать химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать «верхнюю шарнирную» последовательность, происходящую из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в комбинации с «нижней шарнирной» последовательностью, происходящей из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Конкретный пример химерного домена Fc, который можно включать в любую из антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, содержит, от N- до C-конца: [C_H1 IgG4] - [верхняя шарнирная область IgG4] - [нижняя шарнирная область IgG2] - [CH2 IgG4] - [CH3 IgG4]. Другой пример химерного домена Fc, который можно включать в любую из антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, содержит, от N- до C-конца: [C_H1 IgG1] - [верхняя шарнирная область IgG1] - [нижняя шарнирная область IgG2] - [CH2 IgG4] - [CH3 IgG1]. Эти и другие примеры химерных доменов Fc, которые можно включать в любую из антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, описаны в Публикации US 2014/0243504, опубликованной 28 августа 2014 г., полное содержание которой приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Химерные домены Fc, имеющие эти общие структурные аранжировки, и их варианты, могут иметь измененное связывание рецептора Fc, которое, в свою очередь, влияет на эффекторную функцию Fc.

[0106] В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к тяжелой цепи антитела, где константная область тяжелой цепи (CH) содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную любой из SEQ ID NO:340, SEQ ID NO:341, SEQ ID NO:342, SEQ ID NO:343, SEQ ID NO:344, SEQ ID NO:345, SEQ ID NO:346, SEQ ID NO:347, SEQ ID NO:348, SEQ ID NO:349, SEQ ID NO:350 или SEQ ID NO:351. В некоторых вариантах осуществления, константная область тяжелой цепи (CH) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:340, SEQ ID NO:341, SEQ ID NO:342, SEQ ID NO:343, SEQ ID NO:344, SEQ ID NO:345, SEQ ID NO:346, SEQ ID NO:347, SEQ ID NO:348, SEQ ID NO:349, SEQ ID NO:350 или SEQ ID NO:351.

[0107] В других вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к тяжелой цепи антитела, где домен Fc содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную любой из SEQ ID NO:352, SEQ ID

NO:353, SEQ ID NO:354, SEQ ID NO:355, SEQ ID NO:356, SEQ ID NO:357, SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:360, SEQ ID NO:361, SEQ ID NO:362 или SEQ ID NO:363. В некоторых вариантах осуществления, домен Fc содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:352, SEQ ID NO:353, SEQ ID NO:354, SEQ ID NO:355, SEQ ID NO:356, SEQ ID NO:357, SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:360, SEQ ID NO:361, SEQ ID NO:362 или SEQ ID NO:363.

Мультидоменные терапевтические белки

[0108] На фигуре 1 изображены различные примеры мультидоменных терапевтических белков. В одном примере (фигура 1, панель А), мультидоменный терапевтический белок содержит фермент (представленный шестиугольником) и биспецифическое антитело (IE-BP), которое связывает фермент (штриховые линии) и эффектор интернализации (сплошные линии). В настоящем описании, одно плечо биспецифического антитела нековалентно связывается с ферментом, и другое плечо нековалентно связывается с эффектором интернализации, таким образом, позволяя интернализацию замещающего фермента в клетку или внутриклеточный компартмент. В другом примере (панель В), мультидоменный терапевтический белок содержит одиночный белок, содержащий два полипептида, где один полипептид имеет функцию фермента и другой имеет функцию домена для доставки. В этом случае, фермент сливают с доменом Fc или константной областью тяжелой цепи иммуноглобулина, который вступает в ассоциацию с доменом Fc полуантитела с ферментом для формирования бифункционального мультидоменного терапевтического белка. Вариант осуществления, изображенный на панели В, является сходным с вариантом на панели А, за исключением того, что фермент ковалентно связан с одним из полуантител, а не посредством взаимодействия антиген-антитело с переменным доменом иммуноглобулина полуантитела.

[0109] В других примерах, мультидоменный терапевтический белок состоит из фермента, ковалентно связанного (напрямую или опосредованно через линкер) с доменом для доставки. В одном варианте осуществления, фермент присоединяют к С-концу молекулы иммуноглобулина (например, тяжелой цепи или альтернативно, легкой цепи). В другом варианте осуществления, фермент присоединяют к N-концу молекулы иммуноглобулина (например, тяжелой цепи или альтернативно, легкой цепи). В этих примерах, молекула иммуноглобулина представляет собой домен для доставки. В другом варианте осуществления, фермент присоединяют к С-концу молекулы scFv, которая связывает эффектор интернализации.

[0110] В одном варианте осуществления, мультидоменный терапевтический белок содержит два домена для доставки. В одном варианте осуществления, первый домен для доставки связывается с молекулой для лизосомальной миграции или другим эффектором интернализации (например, CD63). В другом варианте осуществления, второй домен для доставки связывается с эффектором трансцитоза для облегчения трансцеллюлярного

транспорта мультидоменного терапевтического белка. В одном варианте осуществления, эффектор транскитоза представляет собой, среди прочего, рецептор LDL, рецептор IgA, рецептор трансферрина или неонатальный рецептор Fc (FcRn). В конкретном варианте осуществления, домен для доставки посредством транскитоза содержит молекулу, которая связывается с рецептором трансферрина, например, такую как антитело против рецептора трансферрина или молекула scFv против рецептора трансферрина. Содержание Tuma and Hubbard, «Transcytosis: Crossing Cellular Barriers», *Physiological Reviews*, 83(3): 871-935 (1 July 2003) приведено в настоящем описании в качестве ссылки на рецепторы клеточной поверхности, опосредующие транскитоз, которые можно использовать в практическом осуществлении рассматриваемого изобретения.

[0111] «Домен фермента» или «фермент» обозначает любой белок, связанный с этиологией или физиологическим эффектом заболевания с недостаточностью фермента. Фермент включает истинный фермент, транспортный белок, рецептор, или другой белок, который является дефектным и который характеризуют как молекулярное повреждение, вызывающее заболевание. Фермент включает также любой белок, который может обеспечивать сходную или достаточную биохимическую или физиологическую активность, замещающую или обходящую молекулярное повреждение при заболевании. Например, «изофермент» можно использовать в качестве фермента.

[0112] В некоторых вариантах осуществления, фермент представляет собой гидролазу, включая эстеразы, гликозилазы, гидролазы, которые действуют на эфирные связи, пептидазы, линейные амидазы, дифосфатазы, кетон-гидролазы, галогеназы, фосфоамидазы, сульфогидролазы, сульфиназы, десульфиназы и т.п. В некоторых вариантах осуществления, фермент представляет собой гликозилазу, включая гликозидазы и N-гликозилазы. В некоторых вариантах осуществления, фермент представляет собой гликозидазу, включая альфа-амилазу, бета-амилазу, глюкан-1,4-альфа-глюкозидазу, целлюлазу, эндо-1,3(4)-бета-глюканазу, инулиназу, эндо-1,4-бета-ксиланазу, эндо-1,4-б-ксиланазу, декстраназу, хитиназу, полигалактоуронидазу, лизоцим, экзо-альфа-сиалидазу, альфа-глюкозидазу, бета-глюкозидазу, альфа-галактозидазу, бета-галактозидазу, альфа-манноидазу, бета-манноидазу, бета-фруктофуранозидазу, альфа, альфа-трегалозу, бета-глюкуронидазу, ксилан-эндо-1,3-бета-ксилозидазу, амило-альфа-1,6-глюкозидазу, гиалуроноглюкозаминидазу, гиалуроноглюкуронидазу и т.п.

[0113] В случае болезни Помпе, при которой молекулярный дефект представляет собой дефект активности α -глюкозидазы, ферменты включают альфа-глюкозидазу (GAA) человека и «изоферменты», такие как другие альфа-глюкозидазы, сконструированную рекомбинантную альфа-глюкозидазу, другие глюкозидазы, рекомбинантные глюкозидазы, любой белок, сконструированный для гидролиза концевой невосстанавливающего 1-4-связанного остатка альфа-глюкозы для высвобождения одиночной молекулы альфа-глюкозы, любой фермент ЕС 3.2.1.20, природные или рекомбинантные гидролазы углеводов, действующие при низком pH, для гликогена или крахмалов, и глюкозил-

гидролазы, такие как сахараза-изомальтаза, мальтаза-глюкоамилаза, глюкозидаза II и нейтральная альфа-глюкозидаза. Иллюстративный вектор для генотерапии

Зародышевые мутации

[0114] Антитела против CD63, описанные в настоящем описании, могут содержать одну или несколько замен, вставок и/или делеций аминокислот в каркасной области и/или областях CDR переменных доменов тяжелой цепи, по сравнению с соответствующими зародышевыми последовательностями, из которых произошли антитела.

[0115] Настоящее изобретение относится также к антителам против CD63 и их антигенсвязывающим фрагментам (включая мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультидоменные терапевтические белки, содержащие антитела против CD63 или их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем описании, где одна или несколько аминокислот внутри одной или нескольких каркасных областей и/или областей CDR подвергнуты мутагенезу до соответствующего остатка(остатков) зародышевой последовательности, из которой происходит антитело, или до соответствующего остатка(остатков) другой человеческой зародышевой последовательности, или до консервативной аминокислотной замены соответствующего зародышевого остатка(остатков) (такие изменения последовательности в совокупности обозначены в настоящем описании как «зародышевые мутации»), и имеют слабое или не поддающееся детекции связывание с антигеном CD63. Несколько таких иллюстративных антител, узнающих CD63, описаны в таблице 1 в настоящем описании.

[0116] Кроме того, антитела против CD63 и их антигенсвязывающие фрагменты (включая мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультидоменные терапевтические белки, содержащие антитела против CD63 или их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или более зародышевых мутаций внутри каркасных областей и/или областей CDR, например, где определенные индивидуальные остатки подвергают мутагенезу до соответствующего остатка конкретной зародышевой последовательности, в то время как определенные другие остатки, отличные от исходной зародышевой последовательности, сохраняют или подвергают мутагенезу до соответствующего остатка другой зародышевой последовательности. После получения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или несколько зародышевых мутаций, можно тестировать по одному или нескольким желательным свойствам, таким как улучшенная специфичность связывания, слабая или уменьшенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные фармакокинетические свойства, уменьшенная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, с учетом руководства по настоящему описанию, включены в настоящее изобретение.

[0117] Настоящее изобретение относится также к антителам против CD63 и их антигенсвязывающим фрагментам (включая мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультидоменные терапевтические белки, содержащие антитела против CD63

или их антигенсвязывающие фрагменты), содержащим варианты любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем описании, имеющие одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение относится к антителам против CD63 и их антигенсвязывающим фрагментам (включая мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультидоменные терапевтические белки, содержащие антитела против CD63 или их антигенсвязывающие фрагменты), имеющим аминокислотные последовательности HCVR, LCVR, и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, указанных в таблице 1 в настоящем описании. Антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультидоменные терапевтические белки по настоящему изобретению могут содержать одну или несколько замен, вставок и/или делеций аминокислот в каркасной области и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей, по сравнению с соответствующими зародышевыми последовательностями, из которых произошли индивидуальные антигенсвязывающие домены, в то же время сохраняя или улучшая желательное, от слабого до не поддающегося детекции, связывание, например, с CD63. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен на другой аминокислотный остаток, имеющий боковую цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональных свойств белка, т.е., аминокислотная замена сохраняет или улучшает желательную, от слабой до не поддающейся детекции, аффинность связывания в случае связывающих молекул против CD63. Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) содержащие амид боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) содержащие серу боковые цепи представляют собой цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных замен аминокислот представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативная замена представляет собой любую замену, имеющую положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-1445. «Умеренно консервативная» замена представляет собой любую замену, имеющую неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[0118] Настоящее изобретение относится также к антителам против CD63 и их антигенсвязывающим фрагментам (включая мультиспецифические антигенсвязывающие

молекулы и мультидоменные терапевтические белки, содержащие антитела против CD63 или их антигенсвязывающие фрагменты), содержащим антигенсвязывающий домен с аминокислотной последовательностью HCVR и/или CDR, которая является по существу идентичной любой из аминокислотных последовательностей HCVR и/или CDR, описанных в настоящем описании, в то же время сохраняя или улучшая желательную слабую аффинность для антигена CD63. Термин «значительная идентичность» или «по существу идентичный», применительно к аминокислотной последовательности, означает, что две аминокислотные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, посредством программ GAP или BESTFIT с использованием стоимости пропусков по умолчанию, разделяют по меньшей мере 95% идентичность последовательности, даже более предпочтительно, по меньшей мере 98% или 99% идентичность последовательности. Предпочтительно, положения остатков, не являющихся идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентную идентичность последовательностей или степень сходства можно увеличивать для коррекции на консервативный характер замены. Способы этой коррекции хорошо известны специалисту в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331.

[0119] Сходство последовательностей для полипептидов, также обозначаемое как идентичность последовательности, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков устанавливает совпадения сходных последовательностей с использованием показателей сходства, приписанных различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как Gap и Bestfit, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между близко родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности можно также сравнивать с использованием FASTA, с использованием параметров по умолчанию или рекомендованных параметров, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) предоставляет выравнивания и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

[0120] После получения, антигенсвязывающие домены, содержащие одну или несколько зародышевых мутаций, тестировали по уменьшенной аффинности связывания с использованием одного или нескольких анализов *in vitro*. Несмотря на то, что антитела, узнающие конкретный антиген, как правило, подвергают скринингу по их назначению, посредством тестирования по высокой (т.е. сильной) аффинности связывания с антигеном, для антител по настоящему изобретению показывают слабое связывание или не поддающееся детекции связывание. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или несколько антигенсвязывающих доменов, полученных этим общим способом, также включены в настоящее изобретение, и обнаружено, что они обеспечивают преимущества в качестве управляемых авидностью терапевтических средств против опухолей.

[0121] Неожиданные преимущества, например, улучшенные фармакокинетические свойства и низкая токсичность для пациента, могут быть реализованы в результате дополнительной модификации антител по настоящему изобретению способами, описанными в настоящем описании.

Свойства связывания антител

[0122] Термин «связывание», в контексте связывания антитела, иммуноглобулина, связывающего фрагмента антитела или содержащего Fc белка с любым, например, predetermined антигеном, таким как белок клеточной поверхности или его фрагмент, как правило, относится к взаимодействию или ассоциации между минимум двумя объектами или молекулярными структурами, такому как взаимодействие антитело-антиген.

[0123] Например, аффинность связывания, как правило, соответствует значению K_D приблизительно 10^{-7} М или менее, например, приблизительно 10^{-8} М или менее, например, приблизительно 10^{-9} М или менее, при определении посредством, например, технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в устройстве BIAcore 3000 с использованием антигена в качестве лиганда, и антитела, Ig, связывающего фрагмента антитела или содержащего Fc белка в качестве аналита (или антилиганда). Способы связывания на основе клеток, такие как анализы связывания с активированной флуоресценцией сортировкой клеток (FACS), также являются общеупотребительными и предоставляют данные для характеристики связывания, применительно к экспрессированным на клеточной поверхности белкам. Данные FACS хорошо коррелируют с другими способами, такими как конкурентное связывание радиолиганда и SPR (Benedict, CA, J Immunol Methods. 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA, et al. J Immunol Methods. 2005, 302(1-2):68-77).

[0124] Соответственно, антитела против CD63 и их антигенсвязывающие фрагменты (включая мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультидоменные терапевтические белки, содержащие антитела против CD63 или их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению связываются с predetermined антигеном или молекулой (рецептором) клеточной поверхности, имея

аффинность, соответствующую значению K_D , по меньшей мере в десять раз ниже, чем для их аффинности связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином). В соответствии с настоящим изобретением, аффинность антитела, соответствующую значению K_D , равному или менее чем в десять раз более низкому, чем для неспецифического антигена, можно считать не поддающимся детекции связыванием, однако, такое антитело можно спаривать с вторым антигенсвязывающим плечом для получения биспецифического антитела по настоящему изобретению.

[0125] Термин « K_D » или « KD » в молях (М) относится к равновесной константе диссоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген, или к равновесной константе диссоциации для связывания антитела или связывающего фрагмента антитела с антигеном. Существует обратная взаимосвязь между K_D и аффинностью связывания, таким образом, чем меньше значение K_D , тем выше, т.е. сильнее, аффинность. Таким образом, термины «более высокая аффинность» или «более сильная аффинность» относятся к более сильной способности к образованию взаимодействия и таким образом, к меньшему значению K_D , и наоборот, термины «более низкая аффинность» или «более слабая аффинность» относятся к более слабой способности к образованию взаимодействия и таким образом, к большему значению K_D . В некоторых случаях, более высокая аффинность связывания (или K_D) конкретной молекулы (например, антитела) с ее молекулой-партнером по взаимодействию (например, антигеном X), по сравнению с аффинностью связывания молекулы (например, антитела) с другой молекулой-партнером по взаимодействию (например, антигеном Y), может быть выражена как коэффициент связывания, определенный посредством деления большего значения K_D (более низкой, или более слабой, аффинности) на меньшее значение K_D (более высокой, или более сильной, аффинности), например, выражен как в 5 раз или в 10 раз большая аффинность связывания, в зависимости от обстоятельств.

[0126] В некоторых вариантах осуществления, биспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению или ее конъюгат, связывается с молекулой-мишенью с аффинностью связывания (значением K_D) более чем в 10 раз превышающей аффинность ее связывания с CD63. Таким образом, биспецифическая молекула имеет намного более сильную аффинность связывания с молекулой-мишенью, чем аффинность ее связывания с CD63. В некоторых случаях, аффинность связывания измеряют посредством анализа поверхностного плазмонного резонанса при 37°C, или эквивалентного анализа.

[0127] Термин « k_d » (с⁻¹ или 1/с) относится к константе скорости диссоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген, или к константе скорости диссоциации антитела или связывающего фрагмента антитела. Указанное значение также обозначают как значение k_{off} .

[0128] Термин « k_a » (М⁻¹ x с⁻¹ или 1/М) относится к константе скорости связывания для конкретного взаимодействия антитело-антиген, или к константе скорости связывания антитела или связывающего фрагмента антитела.

[0129] Термин « K_A » (M^{-1} или l/M) относится к равновесной константе связывания для конкретного взаимодействия антитело-антиген, или к равновесной константе связывания антитела или связывающего фрагмента антитела. Равновесную константу связывания получают посредством деления k_a на k_d .

[0130] Термин « EC_{50} » или « EC_{50} » относится к половине максимальной эффективной концентрации, которая включает концентрацию антитела, индуцирующую ответ, соответствующий половине между фоном и максимальным ответом, после указанного времени воздействия. EC_{50} в основном представляет концентрацию антитела, при которой наблюдают 50% от его максимального эффекта. В конкретных вариантах осуществления, значение EC_{50} равно концентрации антитела по настоящему изобретению, обеспечивающей половину максимального связывания с клетками, экспрессирующими CD63 или опухолеассоциированный антиген, как определено, например, посредством анализа связывания FACS. Таким образом, уменьшенное или более слабое связывание наблюдают при увеличении EC_{50} , или значения половины максимальной эффективной концентрации.

[0131] В одном варианте осуществления, уменьшенное связывание можно определять как увеличенную концентрацию EC_{50} антитела, обеспечивающую связывание с половиной максимального количества клеток-мишеней.

Варианты последовательности

[0132] Антитела против CD63 и их антигенсвязывающие фрагменты (включая мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультидоменные терапевтические белки, содержащие антитела против CD63 или их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению могут содержать одну или несколько замен, вставок и/или делеций аминокислот в каркасной области и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей, по сравнению с соответствующими зародышевыми последовательностями, из которых произошли индивидуальные антигенсвязывающие домены. Такие мутации можно легко определять посредством сравнения аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем описании, с зародышевыми последовательностями, доступными, например, из публичных баз данных последовательностей антител. Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать антигенсвязывающие домены, происходящие из любой из иллюстративных аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем описании, где одна или несколько аминокислот внутри одной или нескольких каркасных областей и/или областей CDR подвергнуты мутагенезу до соответствующего остатка(остатков) зародышевой последовательности, из которой произошло антитело, или до соответствующего остатка(остатков) другой человеческой зародышевой последовательности, или до консервативной аминокислотной замены соответствующего зародышевого остатка(остатков) (такие изменения последовательности в совокупности обозначены в настоящем описании как «зародышевые мутации»). Специалист в данной области, начиная с последовательностей переменной области тяжелой и легкой цепи,

описанных в настоящем описании, может легко получать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или несколько индивидуальных зародышевых мутаций, или их комбинации. В конкретных вариантах осуществления, все из остатков каркасной области и/или CDR внутри доменов V_H и/или V_L подвергают обратному мутагенезу до остатков, обнаруженных в исходной зародышевой последовательности, из которой исходно происходит антигенсвязывающий домен. В других вариантах осуществления, только определенные остатки подвергают обратному мутагенезу до исходной зародышевой последовательности, например, только мутантные остатки, обнаруженные в пределах первых 8 аминокислот из FR1 или в пределах последних 8 аминокислот из FR4, или только мутантные остатки, обнаруженные в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления, один или несколько из остатка(остатков) каркасной области и/или CDR подвергают мутагенезу до соответствующего остатка(остатков) другой зародышевой последовательности (т.е., зародышевой последовательности, отличной от зародышевой последовательности, из которой исходно произошел антигенсвязывающий домен). Кроме того, антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию из двух или более зародышевых мутаций внутри каркасных областей и/или областей CDR, например, где определенные индивидуальные остатки подвергают мутагенезу до соответствующего остатка конкретной зародышевой последовательности, в то время как определенные другие остатки, отличные от исходной зародышевой последовательности, сохраняют или подвергают мутагенезу до соответствующего остатка другой зародышевой последовательности. После получения, антигенсвязывающие домены, содержащие одну или несколько зародышевых мутаций, можно легко тестировать по одному или нескольким желательным свойствам, таким как улучшенная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), уменьшенная иммуногенность и т.д. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или несколько антигенсвязывающих доменов, полученных этим общим способом, включены в настоящее изобретение.

[0133] Настоящее изобретение относится также к антигенсвязывающим молекулам, где один или оба антигенсвязывающих домена содержат варианты любых из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем описании, имеющие одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, содержащим антигенсвязывающий домен, имеющий аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем описании. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен на другой аминокислотный остаток, имеющий боковую

цепь (группу R) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональных свойств белка. Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) содержащие амид боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) содержащие серу боковые цепи представляют собой цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных замен аминокислот представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативная замена представляет собой любую замену, имеющую положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки. «Умеренно консервативная» замена представляет собой любую замену, имеющую неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[0134] Настоящее изобретение относится также к антигенсвязывающим молекулам, содержащим антигенсвязывающий домен с аминокислотной последовательностью HCVR, LCVR и/или CDR, которая является по существу идентичной любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем описании. Термин «значительная идентичность» или «по существу идентичный», применительно к аминокислотной последовательности, означает, что две аминокислотные последовательности, при оптимальном выравнивании, например, посредством программ GAP или BESTFIT с использованием стоимости пропусков по умолчанию, разделяют по меньшей мере 95% идентичность последовательности, даже более предпочтительно, по меньшей мере 98% или 99% идентичность последовательности. Предпочтительно, положения остатков, не являющихся идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентную идентичность последовательностей или степень сходства можно увеличивать для коррекции на консервативный характер замены. Способы этой коррекции хорошо известны специалисту в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

[0135] Сходство последовательностей для полипептидов, также обозначаемое как идентичность последовательности, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков устанавливает совпадения сходных последовательностей с использованием показателей сходства, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как Gap и Bestfit,

которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательности между близко родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из различных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности можно также сравнивать с использованием FASTA, с использованием параметров по умолчанию или рекомендованных параметров, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) предоставляет выравнивания и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из различных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 и Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402, содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

Зависимое от pH связывание

[0136] Настоящее изобретение относится к антителам против CD63 и их антигенсвязывающим фрагментам (включая мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультидоменные терапевтические белки, содержащие антитела против CD63 или их антигенсвязывающие фрагменты) с характеристиками зависимого от pH связывания. Например, антитело против CD63 по настоящему изобретению может иметь уменьшенное связывание с CD63 при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH. Альтернативно, антитела против CD63 по настоящему изобретению могут иметь увеличенное связывание с CD63 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Выражение «кислый pH» включает значения pH менее чем приблизительно 6,2, например, приблизительно 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. Выражение «нейтральный pH» означает pH от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4. Выражение «нейтральный pH» включает значения pH приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

[0137] В конкретных случаях, «уменьшенное связывание... при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH» выражают в отношении соотношения значения K_D для связывания антитела с его антигеном при кислом pH и значения K_D для связывания антитела с его антигеном при нейтральном pH (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как имеющие «уменьшенное связывание с CD63 при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH», для целей настоящего изобретения, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет соотношение K_D при кислом/нейтральном pH приблизительно 3,0 или более. В конкретных иллюстративных вариантах осуществления, соотношение K_D при кислом/нейтральном pH для антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может составлять приблизительно 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0,

6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или более.

[0138] Антитела с характеристиками зависимого от pH связывания можно получать, например, посредством скрининга популяции антител по уменьшенному (или увеличенному) связыванию с конкретным антигеном при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на уровне аминокислот могут приводить к получению антител с зависимыми от pH характеристиками. Например, посредством замены одной или нескольких аминокислот из антигенсвязывающего домена (например, внутри CDR) на остаток гистидина, можно получать антитело с уменьшенным связыванием антигена при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH.

Антитела, содержащие варианты Fc

[0139] В соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителам против CD63 и их антигенсвязывающим фрагментам (включая мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультидоменные терапевтические белки, содержащие антитела против CD63 или их антигенсвязывающие фрагменты), содержащим домен Fc, содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение включает антитела, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 домена Fc, где мутация(мутации) увеличивает аффинность домена Fc для FcRn в кислом окружении (например, в эндосоме, где pH лежит в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению времени полужизни в сыворотке антитела при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления, модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[0140] Например, настоящее изобретение относится к антителам против CD63 и их антигенсвязывающим фрагментам (включая мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультидоменные терапевтические белки, содержащие антитела против CD63 или их антигенсвязывающие фрагменты), содержащим домен Fc, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L

и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации предшествующих мутаций домена Fc, и других мутаций в переменных доменах антитела, описанных в настоящем описании, предусмотрены в объеме настоящего изобретения.

Биологические характеристики антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул

[0141] Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают CD63 человека с высокой, средней или низкой аффинностью, в зависимости от терапевтического контекста и конкретных целей нацеливания, которые являются желательными. Например, в контексте биспецифической антигенсвязывающей молекулы, где одно плечо связывает CD63, и другое плечо связывает антиген-мишень (например, опухлеассоциированный антиген), может являться желательным, чтобы связывающее антиген-мишень плечо связывало антиген-мишень с высокой аффинностью, в то время как плечо против CD63 связывало CD63 только с умеренной или низкой аффинностью. Таким способом, можно достигать предпочтительного нацеливания антигенсвязывающей молекулы на клетки, экспрессирующие антиген-мишень, в то же время избегая общего/ненацеленного связывания CD63 и последующих неблагоприятных побочных эффектов, связанных с этим.

[0142] Настоящее изобретение относится к антителам, их антигенсвязывающим фрагментам и биспецифическим антителам, которые связывают CD63 человека со слабой (т.е. низкой) или даже не поддающейся детекции аффинностью. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые связывают CD63 человека (например, при 37°C) с K_D более чем приблизительно 100 нМ, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса. В конкретных вариантах осуществления, антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают CD63 с K_D более чем приблизительно 110 нМ, по меньшей мере 120 нМ, более чем приблизительно 130 нМ, более чем приблизительно 140 нМ, более чем приблизительно 150 нМ, по меньшей мере 160 нМ, более чем приблизительно 170 нМ, более чем приблизительно 180 нМ, более чем приблизительно 190 нМ, более чем приблизительно 200 нМ, более чем приблизительно 250 нМ, более чем приблизительно 300 нМ, более чем приблизительно 400 нМ, более чем приблизительно 500 нМ, более чем приблизительно 600 нМ, более чем приблизительно 700 нМ, более чем приблизительно 800 нМ, более чем приблизительно 900 нМ или более чем приблизительно 1 мкМ, или с не поддающейся детекции аффинностью, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса (например, в формате mAb-связывания или антигена-связывания), или в по существу сходном анализе.

[0143] Настоящее изобретение относится к антителам, их антигенсвязывающим фрагментам и биспецифическим антителам, которые связывают CD63 обезьяны (т.е.

яванского макака) со слабой (т.е. низкой) или даже с не поддающейся детекции аффинностью.

Эпитопное картирование и родственные технологии

[0144] Эпитоп на CD63, с которым связываются антитела против CD63 и их антигенсвязывающие фрагменты (включая мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультидоменные терапевтические белки, содержащие антитела против CD63 или их антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению, может состоять из одиночной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка CD63. Альтернативно, эпитоп может состоять из множества не являющихся непрерывными аминокислот (или аминокислотных последовательностей) CD63. Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, взаимодействующей со специфическим антигенсвязывающим участком в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Эпитопы могут являться либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп образован пространственно сближенными аминокислотами из различных фрагментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образованный соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных условиях, эпитоп может включать группы сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

[0145] Различные способы, известные специалисту в данной области, можно использовать для определения того, взаимодействует ли антигенсвязывающий домен антитела «с одной или несколькими аминокислотами» в полипептиде или белке. Иллюстративные способы включают, например, общепринятый анализ перекрестного блокирования, такой как описано в Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), анализ аланинового сканирующего мутагенеза, анализ блоттинга пептидов (Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248:443-463) и анализ расщепления пептидов. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопа, выделение эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, Protein Science 9:487-496). Другим способом, который можно использовать для идентификации аминокислот внутри полипептида, с которыми взаимодействует антигенсвязывающий домен антитела, является водородно-дейтериевый обмен, детектированный посредством масс-спектрометрии. В общих чертах, способ водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка, с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы позволить осуществление водородно-дейтериевого обмена на всех остатках, за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела, белок-мишень подвергают расщеплению протеазой и анализу масс-спектрометрии, таким образом, выявляя меченные дейтерием

остатки, соответствующие специфическим аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Рентгеновскую кристаллографию комплекса антиген/антитело также можно использовать для целей эпитопного картирования.

[0146] Настоящее изобретение, кроме того, относится к антителам против CD63, которые связываются с тем же самым эпитопом, что и любые из специфических иллюстративных антител, описанных в настоящем описании (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, как указано в таблице 1 в настоящем описании). Подобным образом, настоящее изобретение относится также к антителам против CD63, которые конкурируют за связывание с CD63 с любым из специфических иллюстративных антител, описанных в настоящем описании (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, как указано в таблице 1 в настоящем описании).

[0147] Можно легко определять, действительно ли антигенсвязывающая молекула (например, антитело) или ее антигенсвязывающий домен связывается с тем же самым эпитопом, что и эталонная антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, или конкурирует с ней за связывание, с использованием общепринятых способов, известных в данной области. Например, для определения того, связывается ли тестируемое антитело с тем же самым эпитопом на CD63, что и эталонная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, сначала эталонной биспецифической молекуле позволяют связывать белок CD63. Затем, оценивают способность тестируемого антитела связывать молекулу CD63. Если тестируемое антитело является способным связывать CD63 после насыщающего связывания с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, можно заключить, что тестируемое антитело связывается с эпитопом CD63, отличным от эпитопа для эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулы. С другой стороны, если тестируемое антитело не является способным связывать молекулу CD63 после насыщающего связывания с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, тогда тестируемое антитело может связываться с тем же самым эпитопом CD63, что и эпитоп, связываемый эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению. Затем можно проводить дополнительные общепринятые эксперименты (например, анализы мутации и связывания пептидов) для подтверждения того, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела обусловлено связыванием с тем же самым эпитопом, что и эпитоп для эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулы, или является ли стерическое блокирование (или другой феномен) ответственным за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты этого рода можно проводить с использованием ELISA, RIA, Вiасоре, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, доступного в данной области. В соответствии с конкретными вариантами осуществления по настоящему описанию, два

антигенсвязывающих белка связываются с тем же самым (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антигенсвязывающего белка ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно, на 75%, 90% или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). Альтернативно, два антигенсвязывающих белка, по-видимому, связываются с тем же самым эпитопом, если в основном все мутации аминокислот в антигене, которые уменьшают или прекращают связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или прекращают связывание другого. Два антигенсвязывающих белка, по-видимому, имеют «перекрывающиеся эпитопы», если только подгруппа мутаций аминокислот, которые уменьшают или прекращают связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или прекращают связывание другого.

[0148] Для определения того, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий домен за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, вышеописанный способ связывания осуществляют в двух ориентациях: в первой ориентации, эталонной антигенсвязывающей молекуле позволяют связывать белок CD63 в условиях насыщения, с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой CD63. Во второй ориентации, тестируемому антителу позволяют связывать молекулу CD63 в условиях насыщения, с последующей оценкой связывания эталонной антигенсвязывающей молекулы с молекулой CD63. Если, в обеих ориентациях, только первая (насыщающая) антигенсвязывающая молекула является способной связываться с молекулой CD63, тогда заключают, что тестируемое антитело и эталонная антигенсвязывающая молекула конкурируют за связывание с CD63. Как понятно специалисту в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, не обязательно может связываться с тем же самым эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела посредством связывания с перекрывающимся или соседним эпитопом.

Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифических молекул

[0149] Антигенсвязывающие домены, специфические для конкретных антигенов, можно получать посредством любой технологии получения антител, известной в данной области. После получения, два различных антигенсвязывающих домена, специфические для двух различных антигенов (например, CD63 и антигена-мишени), можно соответствующим образом аранжировать друг относительно друга для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению с использованием общепринятых способов. (Обсуждение иллюстративных форматов биспецифического антитела, которые можно использовать для конструирования биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, приведено в другом месте настоящего описания). В конкретных вариантах осуществления, один или

несколько из индивидуальных компонентов (например, тяжелых и легких цепей) мультиспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению происходят из химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области. Например, одну или несколько из тяжелых и/или легких цепей биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению можно получать с использованием технологии VELOCIMMUNE™. С использованием технологии VELOCIMMUNE™ (или любой другой технологии получения человеческих антител), сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела против конкретного антигена (например, CD63), имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Антитела характеризуют и отбирают по желательным характеристикам, включая аффинность, избирательность, эпитоп и т.д. Мышинные константные области заменяют желательной человеческой константной областью для получения полностью человеческих тяжелых и/или легких цепей, которые можно включать в биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению.

[0150] Полученными способами генной инженерии животных можно использовать для получения человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул. Например, можно использовать генетически модифицированную мышь, неспособную к реаранжировке и экспрессии эндогенной мышинной последовательности переменной легкой цепи иммуноглобулина, где мышь экспрессирует только один или два переменных домена человеческой легкой цепи, кодированные человеческими последовательностями иммуноглобулина, функционально связанными с мышиным константным геном каппа в эндогенном мышинном локусе каппа. Таких генетически модифицированных мышей можно использовать для выделения переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, для получения полностью человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул. Таким образом, полностью человеческие биспецифические антигенсвязывающие молекулы содержат две различные тяжелые цепи, связанные с одной и той же легкой цепью. (См., например, US 2011/0195454). Полностью человеческие относятся к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или домену иммуноглобулина, содержащему аминокислотную последовательность, кодированную ДНК, происходящей из человеческой последовательности, на протяжении всей длины каждого полипептида антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или домена иммуноглобулина. В некоторых случаях, полностью человеческая последовательность происходит из белка, эндогенного для человека. В других случаях, полностью человеческие белок или белковая последовательность содержат химерную последовательность, где каждый компонент последовательности происходит из человеческой последовательности. Без связи с какой-либо теорией, химерные белки или химерные последовательности, как правило, разрабатывают для минимизации образования иммуногенных эпитопов на стыках последовательностей компонентов,

например, по сравнению с любыми областями или доменами человеческого иммуноглобулина дикого типа.

[0151] Биспецифические антигенсвязывающие молекулы можно конструировать с одной тяжелой цепью, имеющей модифицированный домен Fc, прекращающий ее связывание с белком А, таким образом, позволяя способ очистки, приводящий к получению гетеродимерного белка. См., например, Патент США No. 8586713. Таким образом, биспецифические антигенсвязывающие молекулы содержат первый домен C_H3 и второй домен C_H3 Ig, где первый и второй домены C_H3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере на одну аминокислоту, и где по меньшей мере одно отличие аминокислоты уменьшает связывание биспецифического антитела с белком А, по сравнению с биспецифическим антителом, лишенным отличия аминокислоты. В одном варианте осуществления, первый домен C_H3 Ig связывает белок А, и второй домен C_H3 Ig содержит мутацию/модификацию, уменьшающую или прекращающую связывание белка А, такую как модификация H95R (по нумерации экзонов IMGT; H435R по нумерации EU). Вторым C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU).

Биоэквиваленты

[0152] Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, имеющим аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей иллюстративных молекул, описанных в настоящем описании, но которые сохраняют способность к связыванию CD63. Такие варианты молекул могут содержать одно или несколько добавлений, делеций или замен аминокислот, по сравнению с исходной последовательностью, но имеют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных биспецифических антигенсвязывающих молекул.

[0153] Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, которые являются биоэквивалентными любой из иллюстративных антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании. Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень абсорбции которых не отличаются значительно после введения в одинаковой молярной дозе, в сходных экспериментальных условиях, либо в однократных дозах, либо в множественной дозе. Некоторые антигенсвязывающие белки можно считать эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентными по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все еще можно считать биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены на этикетке, не являются существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при постоянном применении, и их считают терапевтически незначимыми для конкретного исследуемого продукта лекарственного средства.

[0154] В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если не присутствует клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и активности.

[0155] В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно перевести один или несколько раз с эталонного продукта на биологический продукт без ожидаемого увеличения риска неблагоприятных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или уменьшение эффективности, по сравнению с непрерывной терапией без такого перевода.

[0156] В одном варианте осуществления, два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба функционируют по общему механизму или механизмам действия для условия или условий применения, в той мере, в какой такие механизмы известны.

[0157] Биоэквивалентность можно показывать способами *in vivo* и *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают, например, (a) тестирование *in vivo* для человека или других млекопитающих, в ходе которого измеряют концентрацию антитела или его метаболитов в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию от времени; (b) тестирование *in vitro*, которое коррелирует с данными биодоступности *in vivo* у человека и является целесообразно прогностическим для них; (c) тестирование *in vivo* для человека или других млекопитающих, в ходе которого измеряют соответствующий кратковременный фармакологический эффект антитела (или его мишени) как функцию от времени; и (d) строго контролируемое клиническое исследование, в ходе которого устанавливают безопасность, эффективность или биодоступность, или биоэквивалентность антигенсвязывающего белка.

[0158] Биоэквивалентные варианты иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, можно конструировать посредством, например, осуществления различных замен остатков или последовательностей, или делеции концевых или внутренних остатков, или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно делетировать или заменять другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах, биоэквивалентные антигенсвязывающие белки могут включать варианты иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, указанных в настоящем описании, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования молекул, например, мутации, которые исключают или удаляют гликозилирование.

Видовая избирательность и межвидовая перекрестная реактивность

[0159] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с CD63 человека, но не с CD63 из других видов. Настоящее изобретение относится также к

антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с CD63 человека и с CD63 из одного или нескольких не относящихся к человеку видов.

[0160] В соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам, которые связываются с CD63 человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от обстоятельств, с одним или несколькими из CD63 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макака-резус или шимпанзе.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)

[0161] Настоящее изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC), содержащим антитела против CD63 и их антигенсвязывающие фрагменты (включая мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и мультидоменные терапевтические белки, содержащие антитела против CD63 или их антигенсвязывающие фрагменты), конъюгированные с терапевтической группой, такой как цитотоксическое средство, химиотерапевтическое лекарственное средство, иммунодепрессант или радиоактивный изотоп. Настоящее изобретение относится также к антителам против CD63 или их антигенсвязывающим фрагментам, конъюгированным с терапевтической группой. В общих чертах, ADC содержат: A-[L-P]_y, где A представляет собой антигенсвязывающую молекулу, например, антитело против CD63 или его фрагмент (например, фрагмент, содержащий по меньшей мере HCDR3, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1), L представляет собой линкер, P представляет собой нагрузку или терапевтическую группу (например, цитотоксическое средство), и y представляет собой целое число от 1 до 30.

[0162] В различных вариантах осуществления, ADC содержит антитело против CD63 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, антитело против мишени (ТАА) х против CD63), содержащие CDR из HCVR или LCVR, имеющие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO (например, SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 298, 306, 314, 322, 330, 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266 и 282), указанных в таблице 1, или специфические пары HCVR/LCVR (например, SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/282, 298/282, 306/282, 314/282, 322/282 и 330/282). В некоторых случаях, антитело против CD63 или его фрагмент содержит CDR с аминокислотными последовательностями из SEQ ID NO (например, SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16, 20-22-24-26-28-30-32, 36-38-40-44-46-48, 52-54-56-60-62-64; 68-70-72-76-78-80 84-86-88-92-94-96; 100-102-104-108-110-112, 116-118-120-124-126-128; 132-134-136-140-142-144; 148-150-152-156-158-160; 164-166-168-172-174-176; 180-182-184-188-190-192; 196-198-200-204-206-208; 212-214-216-220-222-224; 228-230-232-236-238-240; 244-246-248-252-254-256; 260-262-264-268-270-272; 276-278-280-284-286-288; 292-294-296-284-286-288; 300-302-304-284-286-288; 308-310-312-284-286-288; 316-318-320-284-286-288; 324-

326-328-284-286-288 и 332-334-336-284-286-288), указанных в таблице 1. В некоторых случаях, антитело против CD63 или его фрагмент содержит HCVR и LCVR, имеющие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO (например, SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 298, 306, 314, 322, 330, 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, и 282), указанных в таблице 1, или специфические пары аминокислотных последовательностей (например, SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/282, 298/282, 306/282, 314/282, 322/282 и 330/282).

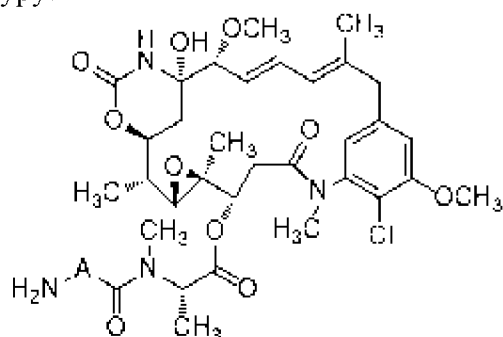
[0163] Цитотоксические средства включают любое средство, которое является неблагоприятным для роста, жизнеспособности или размножения клеток, включая, но без ограничения, взаимодействующие с тубулином средства и повреждающие ДНК средства. Примеры пригодных цитотоксических средств и химиотерапевтических средств, которые можно конъюгировать с антителами против CD63, в соответствии с этим аспектом изобретения, включают, например, 1-(2-хлорэтил)-1,2-диметансульфонилгидразид, 1,8-дигидрокси-бицикло[7,3,1]тридека-4,9-диен-2,6-диин-13-он, 1-дегидротестостерон, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, 9-аминокамптотecin, актиномицин D, амантины, аминоптерин, ангвидин, антрациклин, антрамицин (АМС), ауристатины, блеомицин, бусульфид, масляную кислоту, калихеамицины (например, калихеамицин γ 1), камптотecin, карминомицины, кармустины, цематодины, цисплатин, колхицин, комбретастатины, циклофосфамид, цитарабин, цитохалазин В, дактиномицин, даунорубин, декарбазин, диацетоксипентилдоксорубин, дибромманнит, дигидроксиантрацидин, дисоразолы, доластатин (например, доластатин 10), доксорубин, дуокармицин, эхиномицины, элеутеробины, эметин, эпотилоны, эспермицин, эстрамустины, бромид этидия, этопозид, фторурацилы, гелданамицины, грамицидин D, глюкокортикоиды, иринотеканы, ингибиторы кинезинового белка веретена (KSP), лептомицины, леуроцины, лидокаин, ломустин (CCNU), майтанзиноиды, мехлорэтамин, мелфалан, меркаптопурины, метоптерины, метотрексат, митрамицин, митомицин, митоксантрон, N8-ацетилспермидин, подофиллотоксины, прокаин, пропранолол, птеридины, пурамицин, пирролобензодиазепины (PBD), ризоксины, стрептозотоцин, таллизомиины, таксол, тенопозид, татракаин, тиотепа, хлорамбуцил, томаймицины, топотеканы, тубулизин, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбины и производные любого из вышеуказанного.

[0164] В соответствии с конкретными вариантами осуществления, цитотоксическое средство, конъюгированное с антителом против CD63, представляет собой майтанзиноид, такой как DM1 или DM4, производное томаймицина или производное доластатина. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, цитотоксическое средство, конъюгированное с антителом против CD63, представляет собой ауристатин, такой как MMAE, MMAF или их производные. Другие цитотоксические средства, известные в данной области, предусмотрены в объеме настоящего изобретения, включая, например,

белковые токсины, такие как рицин, токсин *C. difficile*, экзотоксин *pseudomonas*, рицин, дифтерийный токсин, ботулинический токсин, бриодин, сапорин, токсины лаконоса (т.е., фитолаккотоксин и фитолаккигенин), и другие, такие как указаны в Sapra et al., Pharmacol. & Therapeutics, 2013, 138:452-469.

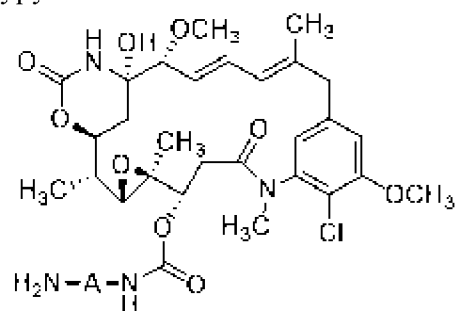
[0165] В конкретных вариантах осуществления, цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, например, производное майтанзина. Пригодные майтанзиноиды включают DM1, DM4 или их производные, стереоизомеры или изотопологи. Пригодные майтанзиноиды также включают, но без ограничения, майтанзиноиды, описанные в WO 2014/145090A1, WO 2015/031396A1, US 2016/0375147A1 и US 2017/0209591A1, полное содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

[0166] В некоторых вариантах осуществления, майтанзиноид имеет следующую структуру:



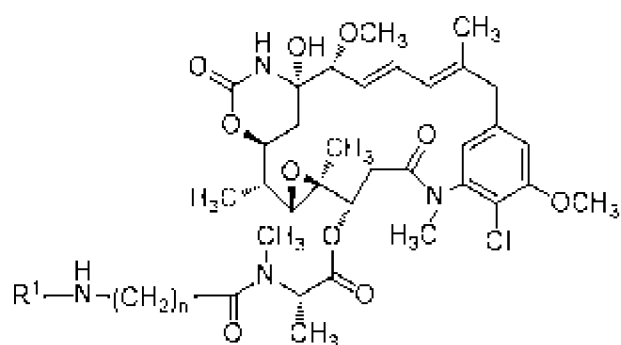
где А представляет собой, необязательно, замещенный арилен или гетероарил.

[0167] В некоторых вариантах осуществления, майтанзиноид имеет следующую структуру:



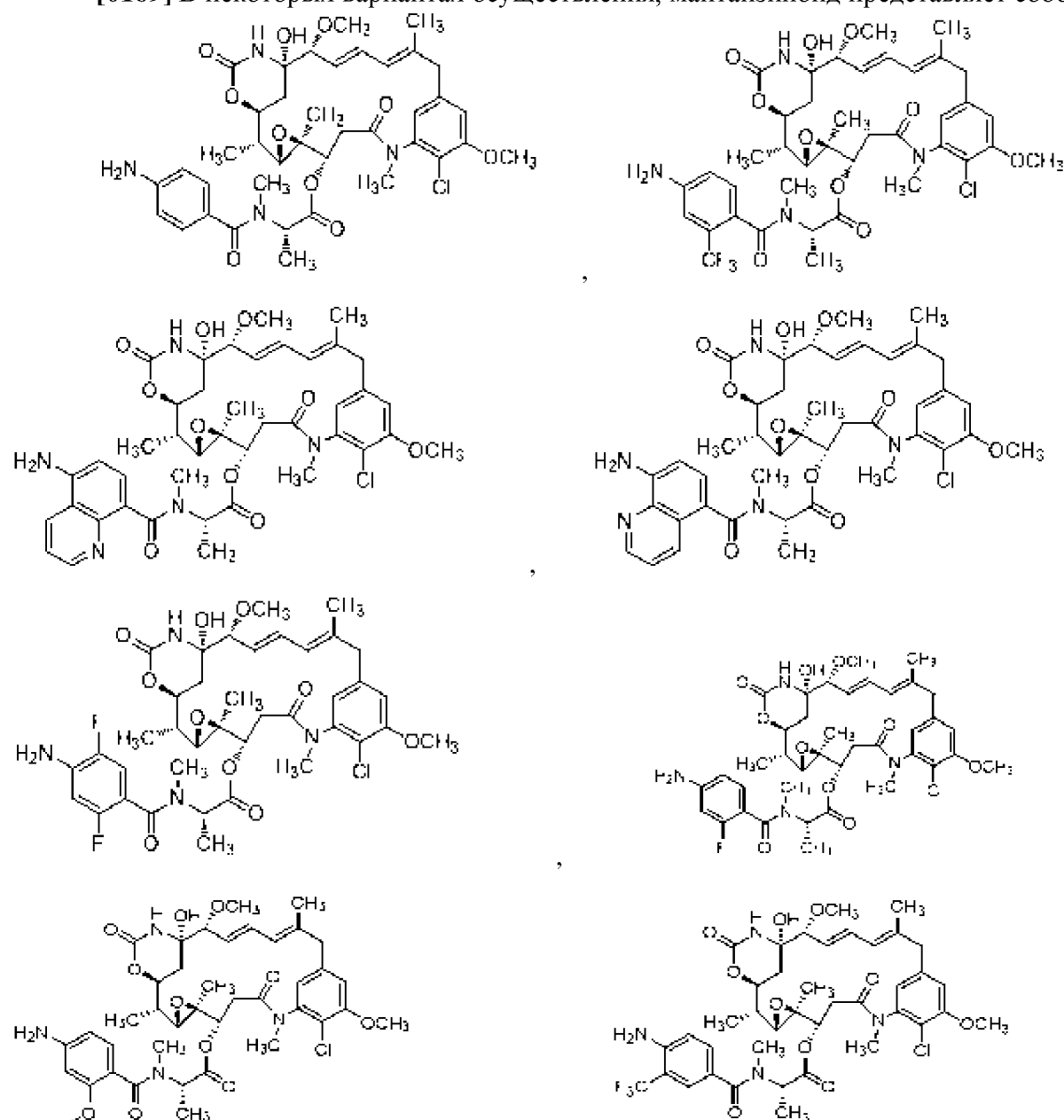
где А представляет собой, необязательно, замещенный арилен или гетероарил.

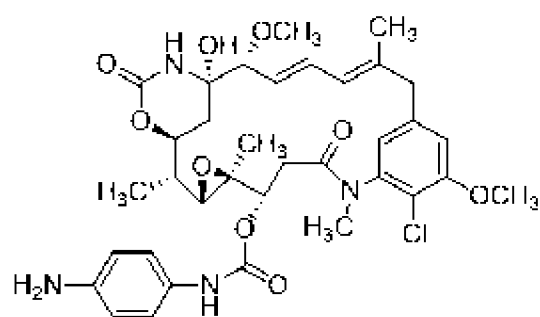
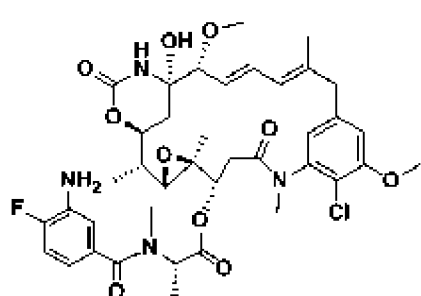
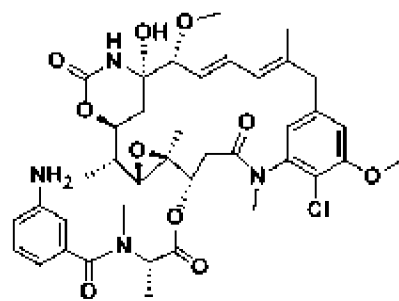
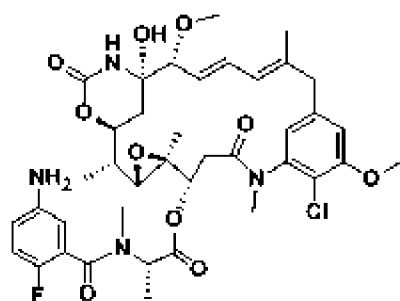
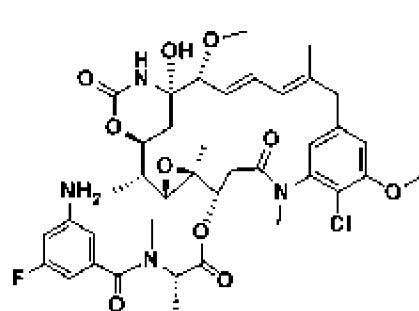
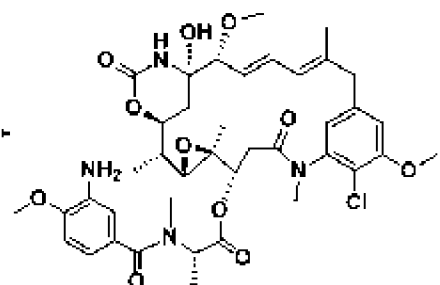
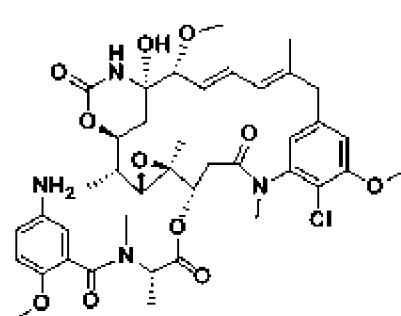
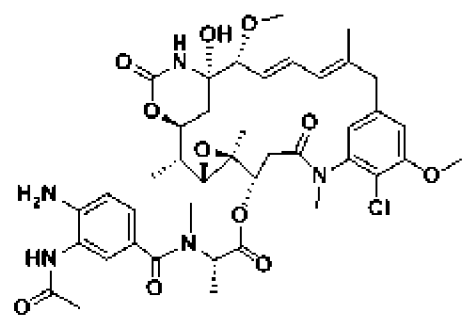
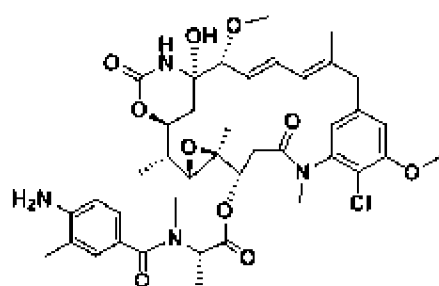
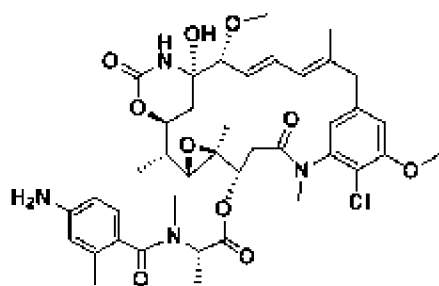
[0168] В некоторых вариантах осуществления, майтанзиноид имеет следующую структуру:

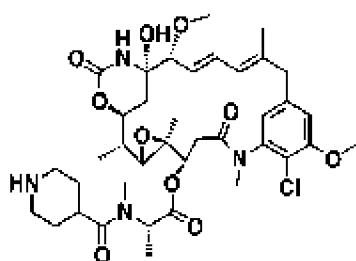
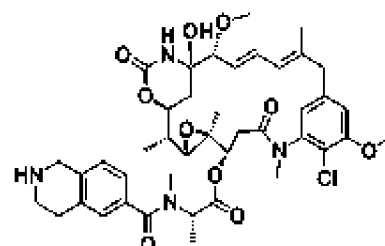
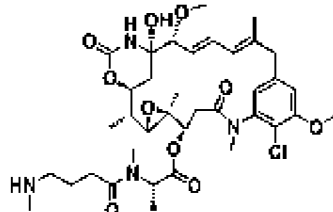
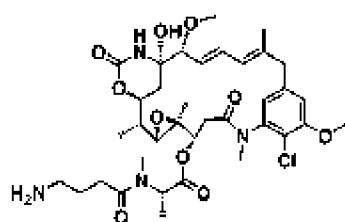
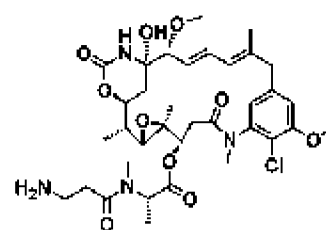
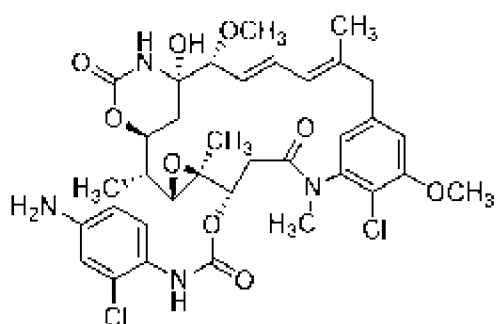


где n представляет собой целое число от 1 до 12, и R^1 представляет собой алкил.

[0169] В некоторых вариантах осуществления, майтанзиноид представляет собой:

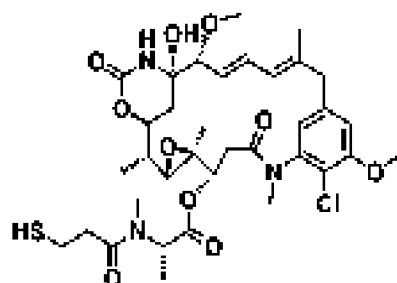




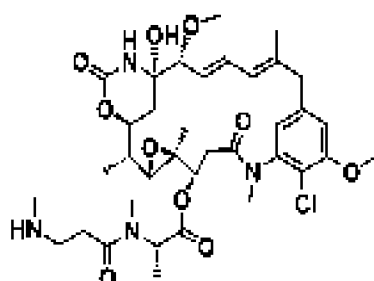


или

[0170] В некоторых вариантах осуществления, майтанзиноид представляет собой:



[0171] В некоторых вариантах осуществления, майтанзиноид представляет собой:



[0172] Настоящее изобретение относится также к конъюгатам антитело-радиоактивный изотоп (ARC), содержащим антитела против CD63, конъюгированные с одним или несколькими радиоактивными изотопами. Иллюстративные радиоактивные

изотопы, которые можно использовать в контексте этого аспекта описания, включают, но без ограничения, например, ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{131}I , ^{186}Re , ^{227}Th , ^{222}Rn , ^{223}Ra , ^{224}Ra и ^{90}Y .

[0173] В конкретных вариантах осуществления, представленных в настоящем описании, настоящее изобретение относится к ADC, содержащим, например, биспецифический антигенсвязывающий белок против ТАА и против CD63, конъюгированный с цитотоксическим средством (например, с любым из цитотоксических средств, описанных выше) посредством линкерной молекулы. Линкеры представляют собой любую группировку или группу, которая соединяет, присоединяет или связывает антитело или антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем описании, с терапевтической группой, например, цитотоксическим средством. Пригодные линкеры можно обнаружить, например, в *Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins*; Phillips, G. L., Ed.; Springer Verlag: New York, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Ducry, L., Ed.; Humana Press, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Wang, J., Shen, W.-C., и Zaro, J. L., Eds.; Springer International Publishing, 2015, полное содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Как правило, пригодные связывающие линкерные средства для конъюгатов антител, описанных в настоящем описании, представляют собой средства, которые являются достаточно стабильными для использования во время полужизни антитела в кровотоке и, в то же самое время, способными высвободить свою нагрузку после опосредованной антигеном интернализации конъюгата. Линкеры могут являться отщепляемыми или неотщепляемыми. Отщепляемые линкеры включают линкеры, отщепляемые посредством внутриклеточного метаболизма после интернализации, например, отщепляемые посредством гидролиза, восстановления или ферментной реакции. Неотщепляемые линкеры включают линкеры, высвобождающие присоединенную нагрузку посредством лизосомной деградации антитела после интернализации. Пригодные линкеры включают, но без ограничения, чувствительные к кислоте линкеры, чувствительные к гидролизу линкеры, ферментно отщепляемые линкеры, чувствительные к восстановлению линкеры, саморасщепляющиеся линкеры, и неотщепляемые линкеры. Пригодные линкеры также включают, но без ограничения, линкеры, которые представляют собой или содержат пептиды, глюкуроны, сукцинимид-тиоэфиры, звенья полиэтиленгликоля (PEG), гидразоны, звенья мал-капроила, звенья дипептида, звенья валин-цитрулина и звенья пара-аминобензила (PAB).

[0174] Любую линкерную молекулу или технологию линкера, известные в данной области, можно использовать для создания или конструирования ADC по настоящему изобретению. В конкретных вариантах осуществления, линкер представляет собой отщепляемый линкер. В соответствии с другими вариантами осуществления, линкер представляет собой неотщепляемый линкер. Иллюстративные линкеры, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают линкеры, которые содержат или состоят из например, MC (6-малеимидокапроила), MP (малеимидопропаноила), val-cit (валин-цитрулина), val-ala (валин-аланина), val-gly (валин-глицина), дипептидного участка в отщепляемом протеазой линкере, ala-phe (аланин-фенилаланина), дипептидного

участка в отщепляемом протеазой линкере, PAB (п-аминобензилоксикарбонила), SPP (N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноата), SMCC (N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата), SIAB (N-сукцинимидил(4-иод-ацетил)аминобензоата), и их варианты и комбинации. Дополнительные примеры линкеров, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, представлены, например, в US 7754681 и в Ducry, Bioconjugate Chem., 2010, 21:5-13, и в процитированных в них ссылках, полное содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

[0175] В конкретных вариантах осуществления, линкеры являются стабильными в физиологических условиях. В конкретных вариантах осуществления, линкеры являются отщепляемыми, например, способными высвободить по меньшей мере часть нагрузки в присутствии фермента или при конкретном диапазоне или значении pH. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит отщепляемую ферментом группу. Иллюстративные отщепляемые ферментом группы включают, но без ограничения, пептидные связи, сложноэфирные связи, гидразоны и дисульфидные связи. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит отщепляемый катепсином линкер.

[0176] В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит неотщепляемую группу.

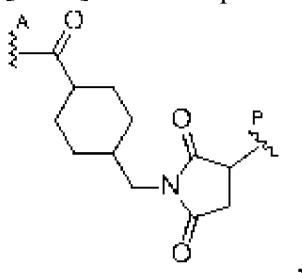
[0177] Пригодные линкеры также включают, но без ограничения, линкеры, химически связанные с двумя остатками цистеина одного связывающего средства, например, антитела. Такие линкеры могут служить для имитации дисульфидных связей антитела, разрушенных в результате процесса конъюгации.

[0178] В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит одну или несколько аминокислот. Пригодные аминокислоты включают природные, неприродные, стандартные, нестандартные, протеиногенные, непротеиногенные и L- или D-α-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит аланин, валин, глицин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, гистидин или цитруллин, их производное или их комбинацию. В конкретных вариантах осуществления, одна или несколько боковых цепей аминокислот связаны с группой боковой цепи, описанной ниже. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит валин и цитруллин. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит лизин, валин и цитруллин. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит лизин, валин и аланин. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит валин и аланин.

[0179] В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит саморасщепляющуюся группу. Саморасщепляющаяся группа может представлять собой любую такую группу, известную специалисту в данной области. В конкретных вариантах осуществления, саморасщепляющаяся группа представляет собой *n*-аминобензил (PAB) или его производное. Полезные производные включают *n*-аминобензилоксикарбонил

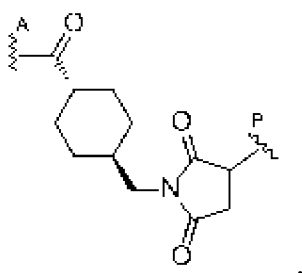
(РАВС). Специалисту в данной области понятно, что саморасщепляющаяся группа является способной к осуществлению химической реакции, освобождающей оставшиеся атомы линкера от нагрузки.

[0180] В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой:



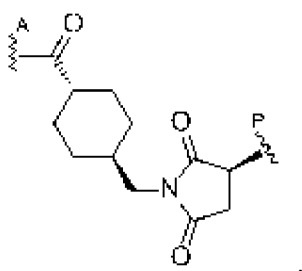
где ---^A представляет собой связь с антителом или антигенсвязывающим белком

(например, посредством остатка лизина), и ---^P представляет собой связь с цитотоксическим средством (например, DM1). В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой:

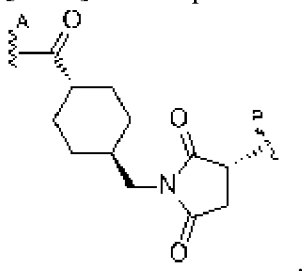


где ---^A представляет собой связь с антителом или антигенсвязывающим белком

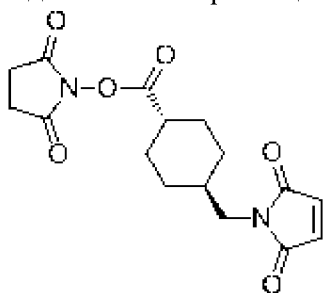
(например, посредством остатка лизина), и ---^P представляет собой связь с цитотоксическим средством (например, DM1). В конкретных вариантах осуществления, линкер представляет собой:



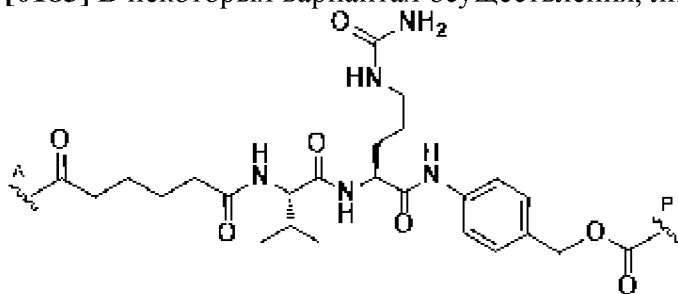
[0181] В конкретных вариантах осуществления, линкер представляет собой:



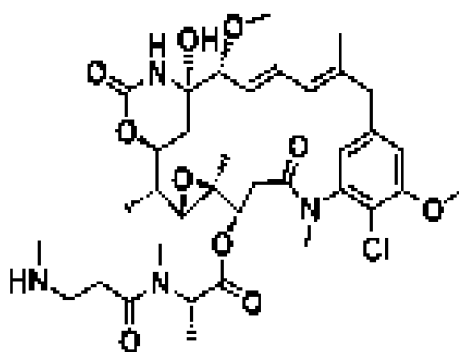
[0182] В некоторых вариантах осуществления, линкер происходит из малеимидилметил-4-транс-циклогексанкарбоксисукцината:



[0183] В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой:



где  представляет собой связь с антителом или антигенсвязывающим белком (например, посредством остатка лизина), и  представляет собой связь с цитотоксическим средством (например, соединением, имеющим следующую формулу:

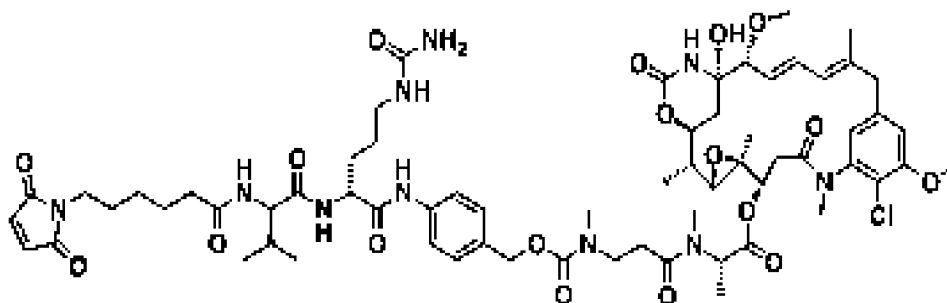


).

[0184] Настоящее изобретение относится к ADC, в которых линкер соединяет биспецифический антигенсвязывающий белок против TAA x против CD63 с лекарственным средством или цитотоксином посредством присоединения по конкретной аминокислоте в антителе или антигенсвязывающей молекуле. Иллюстративные присоединения аминокислот, которые можно использовать в контексте этого аспекта, включают, например, лизин (см., например, US 5208020; US 2010/0129314; Hollander et al., Bioconjugate Chem., 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; US 5714586; и US 2013/0101546), цистеин (см., например, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; и US 7750116), селеноцистеин (см., например, WO 2008/122039; и Hofer et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA,

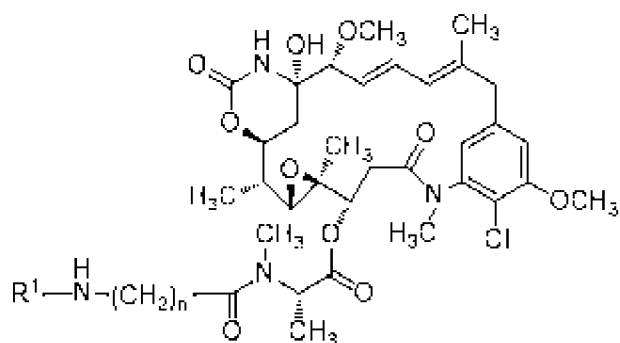
2008, 105:12451-12456), формилглицин (см., например, Carrico et al., Nat. Chem. Biol., 2007, 3:321-322; Agarwal et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2013, 110:46-51 и Rabuka et al., Nat. Protocols, 2012, 10:1052-1067), неприродные аминокислоты (см., например, WO 2013/068874 и WO 2012/166559), и кислые аминокислоты (см., например, WO 2012/05982). Линкеры можно также конъюгировать с антигенсвязывающим белком посредством присоединения к углеводам (см., например, US 2008/0305497, WO 2014/065661 и Ryan et al., Food & Agriculture Immunol., 2001, 13:127-130) и дисульфидным линкерами (см., например, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611 и Shaunak et al., Nat. Chem. Biol., 2006, 2:312-313). Способы сайт-специфической конъюгации также можно использовать для направления конъюгации на конкретные остатки антитела или антигенсвязывающего белка (см., например, Schumacher et al. J Clin Immunol (2016) 36(Suppl 1): 100). Способы сайт-специфической конъюгации включают, но без ограничения, конъюгацию через глутамин посредством трансглутаминазы (см., например, Schibli, Angew Chemie Inter Ed. 2010, 49,9995).

[0185] В соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее описание относится к ADC, где биспецифический антигенсвязывающий белок против ТАА x против CD63, как описано в настоящем описании, является конъюгированным с композицией линкер-лекарственное средство, как указано в Международной патентной публикации WO2014/145090, (например, соединение «7», также обозначенное в настоящем описании как «M0026» и изображенное ниже), полное содержание которой, таким образом, приведено в настоящем описании в качестве ссылки:

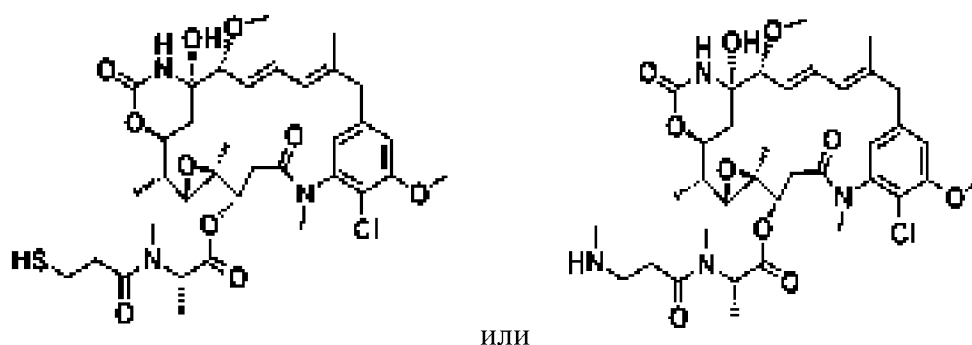


7

[0186] Настоящее изобретение относится также к конъюгатам антитело-лекарственное средство, содержащим биспецифические антигенсвязывающие белки против ТАА x против CD63, где указанный биспецифический антигенсвязывающий белок против ТАА x против CD63 является конъюгированным с цитотоксическим средством. В конкретных вариантах осуществления, цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид. В конкретных вариантах осуществления, майтанзиноид представляет собой соединение, имеющее следующую формулу:

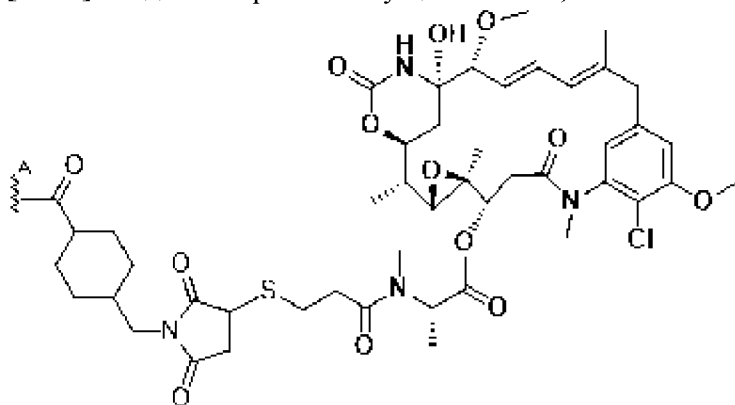


где n представляет собой целое число от 1 до 12, и R^1 представляет собой алкил. В конкретных вариантах осуществления, майтанзиноид представляет собой



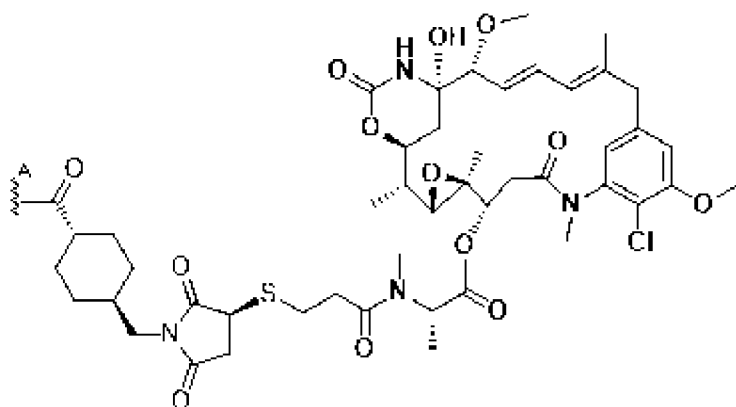
В конкретных вариантах осуществления, цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, и майтанзиноид является ковалентно присоединенным к антителу посредством неотщепляемого линкера. В конкретных вариантах осуществления, цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, и майтанзиноид является ковалентно присоединенным к антителу посредством отщепляемого линкера.

[0187] В одном варианте осуществления, антитело является конъюгированным с:



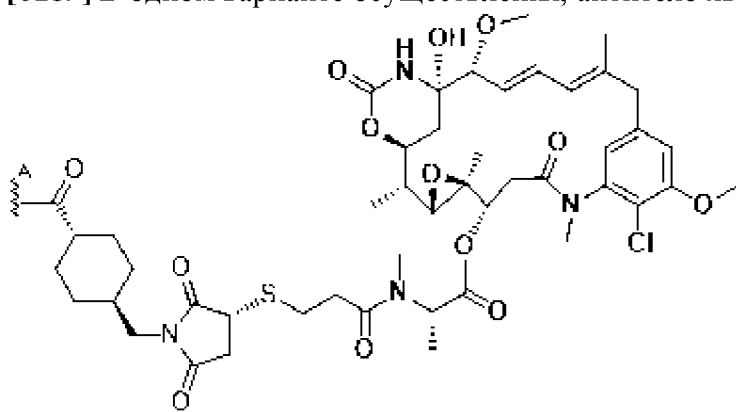
где  представляет собой связь с антителом.

[0188] В одном варианте осуществления, антитело является конъюгированным с:



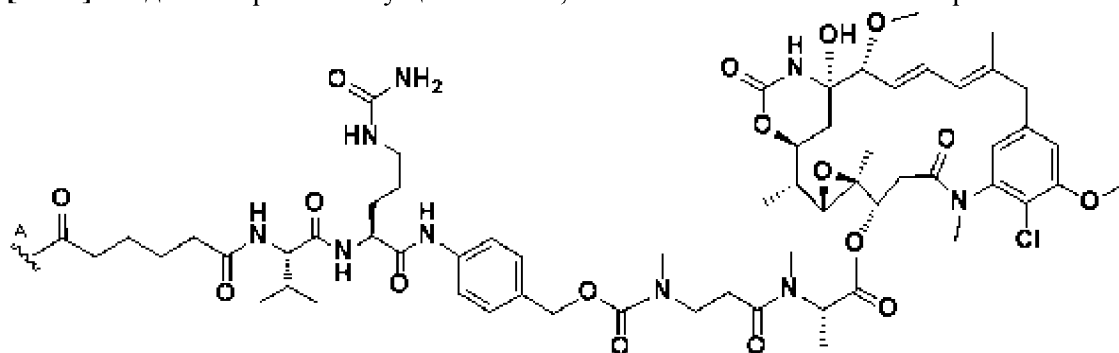
где $\text{---}\overset{\text{A}}{\underset{\text{~}}{\text{~}}}\text{---}$ представляет собой связь с антителом.

[0189] В одном варианте осуществления, антитело является конъюгированным с:



[0190] где $\text{---}\overset{\text{A}}{\underset{\text{~}}{\text{~}}}\text{---}$ представляет собой связь с антителом.

[0191] В одном варианте осуществления, антитело является конъюгированным с:



где $\text{---}\overset{\text{A}}{\underset{\text{~}}{\text{~}}}\text{---}$ представляет собой связь с антителом.

[0192] В некоторых вариантах осуществления, конъюгаты имеют следующую структуру:

Ab-[L-Pay]_n ,

где:

Ab представляет собой биспецифический антигенсвязывающий белок против ТАА х против CD63, как описано в настоящем описании;

L представляет собой линкер;

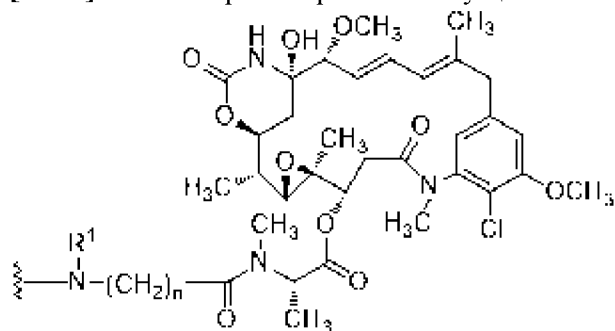
Рау представляет собой цитотоксическое средство; и

n представляет собой целое число от 1 до 10.

[0193] В некоторых вариантах осуществления, Ab представляет собой любое из антител или антигенсвязывающих белков, описанных в таблице 1.

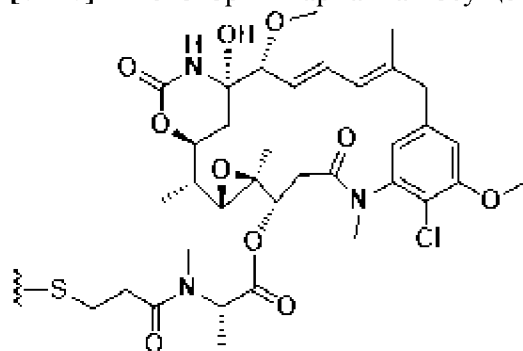
[0194] В некоторых вариантах осуществления, нагрузка представляет собой майтанзиноид.

[0195] В некоторых вариантах осуществления, Рау представляет собой:

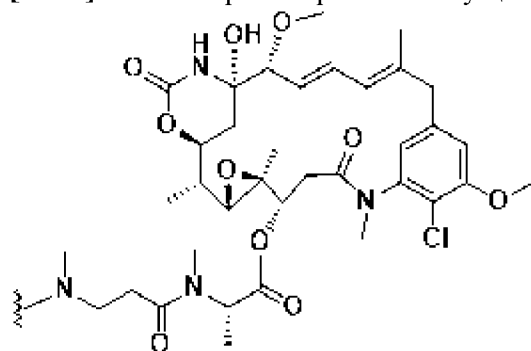


где R¹ представляет собой алкил.

[0196] В некоторых вариантах осуществления, Рау представляет собой:

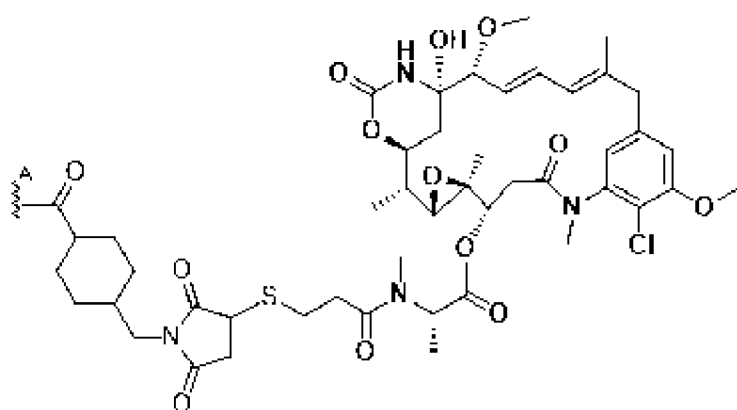


[0197] В некоторых вариантах осуществления, Рау представляет собой:



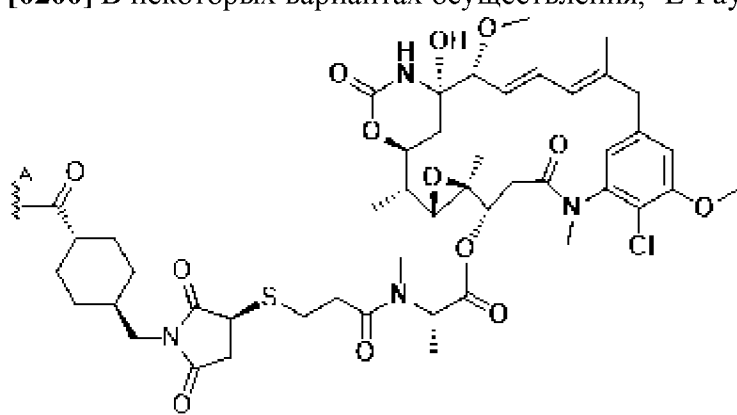
[0198] В некоторых вариантах осуществления, n представляет собой целое число от 2 до 5.

[0199] В некоторых вариантах осуществления, -L-Рау представляет собой:



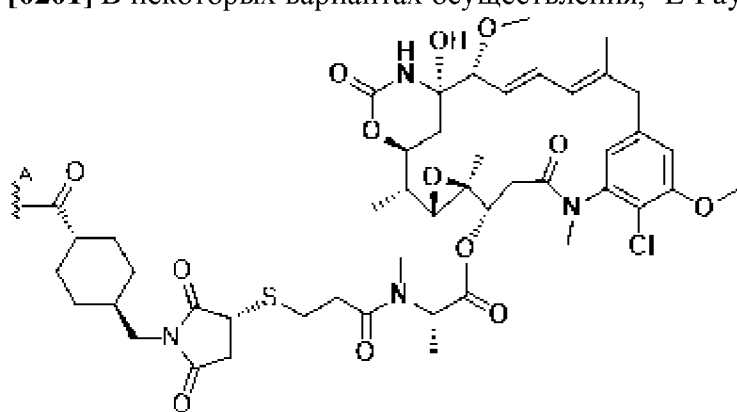
где $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{---}}$ представляет собой связь с антителом.

[0200] В некоторых вариантах осуществления, -L-Рау представляет собой:



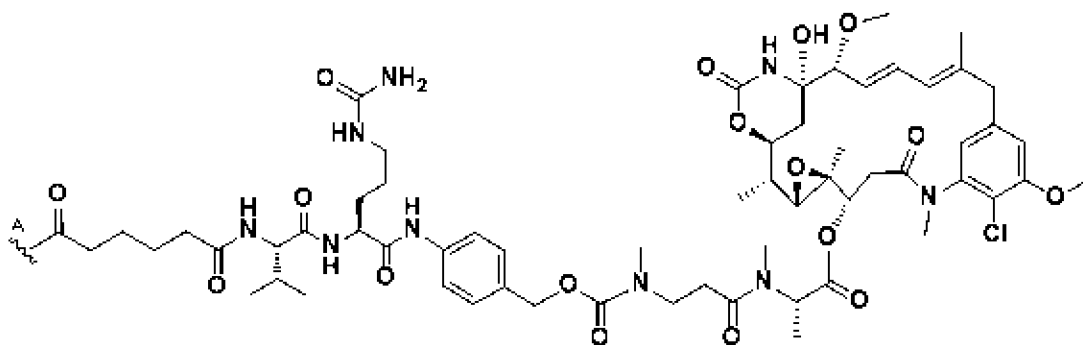
где $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{---}}$ представляет собой связь с антителом.

[0201] В некоторых вариантах осуществления, -L-Рау представляет собой



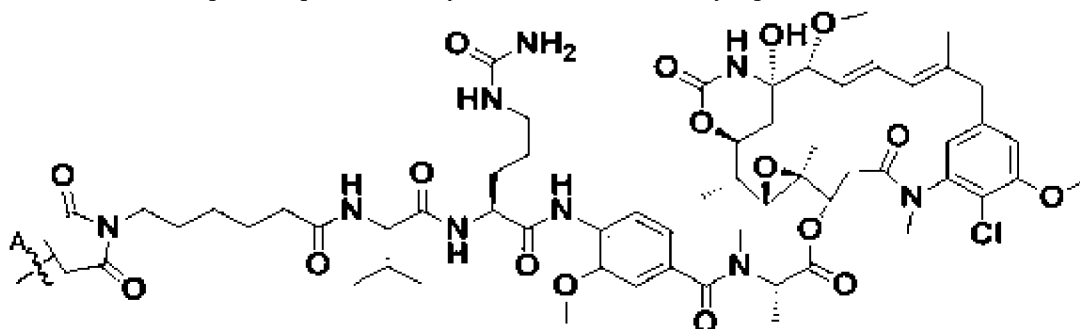
где $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{---}}$ представляет собой связь с антителом.

[0202] В некоторых вариантах осуществления, -L-Рау представляет собой:



где  представляет собой связь с антителом.

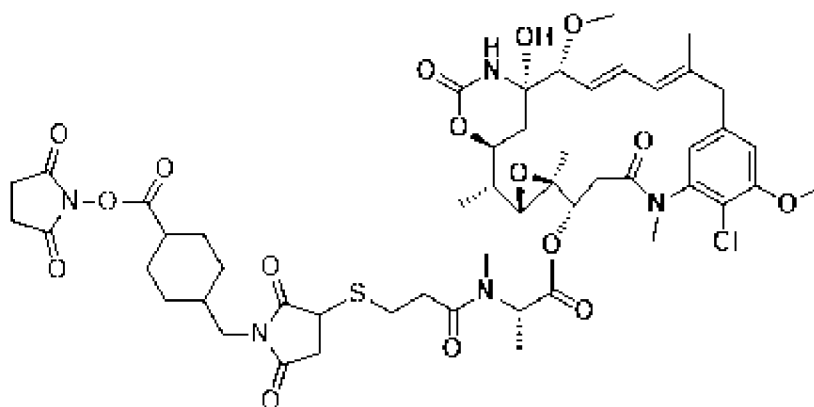
[0203] В некоторых вариантах осуществления, -L-Рау представляет собой:



где  представляет собой связь с антителом.

[0204] Конъюгаты антитело-лекарственное средство, описанные в настоящем описании, можно получать с использованием условий конъюгации, известных специалисту в данной области, (см., например, Doronina et al. Nature Biotechnology 2003, 21, 7, 778, полное содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки). В некоторых вариантах осуществления, конъюгат лекарственного средства с биспецифическим антигенсвязывающим белком против ТАА x против CD63 получают посредством приведения биспецифического антигенсвязывающего белка против ТАА x против CD63, описанного в настоящем описании, в контакт с соединением, содержащим желательный линкер и цитотоксическое средство, где указанный линкер имеет группу, которая является реакционноспособной по отношению к антителу или антигенсвязывающему белку, например, в желательном остатке антитела или антигенсвязывающего белка.

[0205] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам получения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающим приведение биспецифического антигенсвязывающего белка против ТАА x против CD63, описанного в настоящем описании, в контакт с соединением, имеющим следующую формулу A¹:

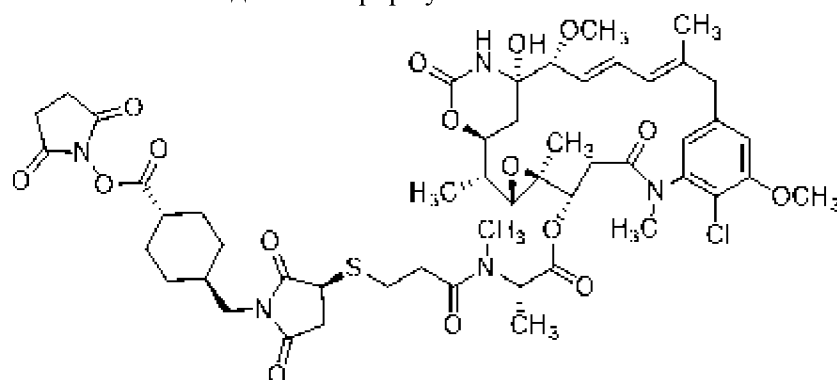


A¹,

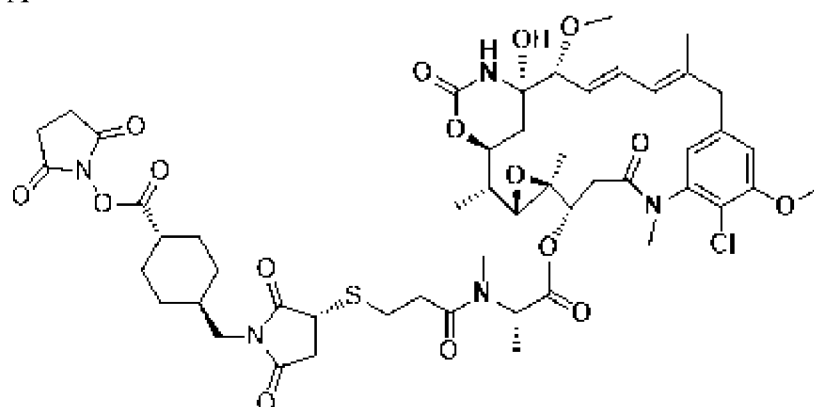
и водным разбавителем.

[0206] В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы A¹ присутствует в стехиометрическом избытке. В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы A¹ присутствует в 5-6-кратном стехиометрическом избытке. В некоторых вариантах осуществления, водный разбавитель содержит HEPES. В некоторых вариантах осуществления, водный разбавитель содержит DMA.

[0207] В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы A¹ представляет собой соединение формулы A² или A³:



A²



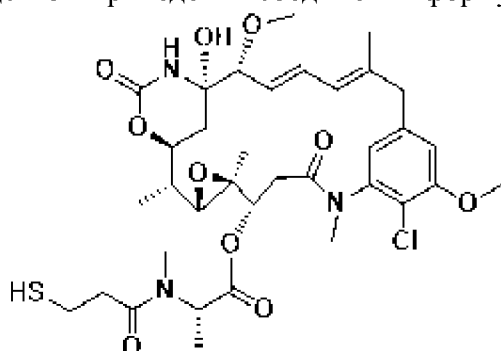
A³.

[0208] В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы A² представляет собой A³, стереометрически чистое. В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы A¹ содержит соединение формулы A¹ или A², где соединение из A¹

или A^2 присутствует в диастереометрическом избытке более чем 50%. В конкретных вариантах осуществления, диастереометрический избыток составляет более чем 70%. В конкретных вариантах осуществления, диастереометрический избыток составляет более чем 90%. В конкретных вариантах осуществления, диастереометрический избыток составляет более чем 95%. Структуры A^1 , A^2 и A^3 , индивидуально или совместно, известны как SMCC-DM1.

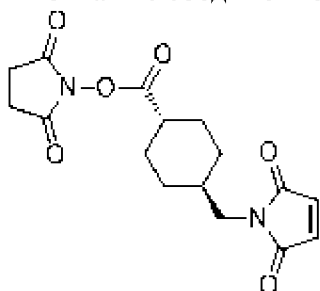
[0209] Термин «диастереометрический избыток» относится к различию между молярной фракцией желательного отдельного диастереомера, по сравнению с оставшимися диастереомерами в композиции. Диастереометрический избыток рассчитывают следующим образом: (количество отдельного диастереомера)-(количество других диастереомеров)/1. Например, композиция, содержащая 90% 1 и 10% 2, 3, 4 или их смеси, имеет диастереометрический избыток 80% $[(90-10)/1]$. Композиция, содержащая 95% 1 и 5% 2, 3, 4 или их смеси, имеет диастереометрический избыток 90% $[(95-5)/1]$. Композиция, содержащая 99% 1 и 1% 2, 3, 4 или их смеси, имеет диастереометрический избыток 98% $[(99-1)/1]$. Диастереометрический избыток можно сходным образом рассчитать для любого из 1, 2, 3 или 4.

[0210] В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы A^1 получают посредством приведения соединения формулы (a):



(a)

в контакт с соединением формулы (b)

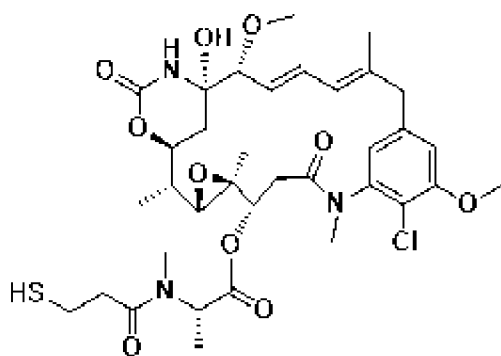


(b)

в присутствии силикагеля и разбавителя. В некоторых вариантах осуществления, разбавитель содержит органический растворитель и воду.

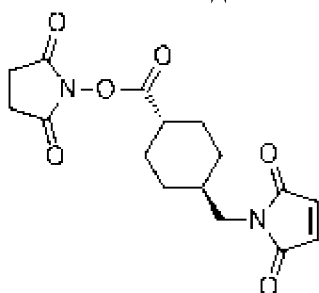
[0211] Настоящее изобретение относится также к продукту, полученному способом из:

(i) приведения соединения формулы (a):



(a)

в контакт с соединением формулы (b):



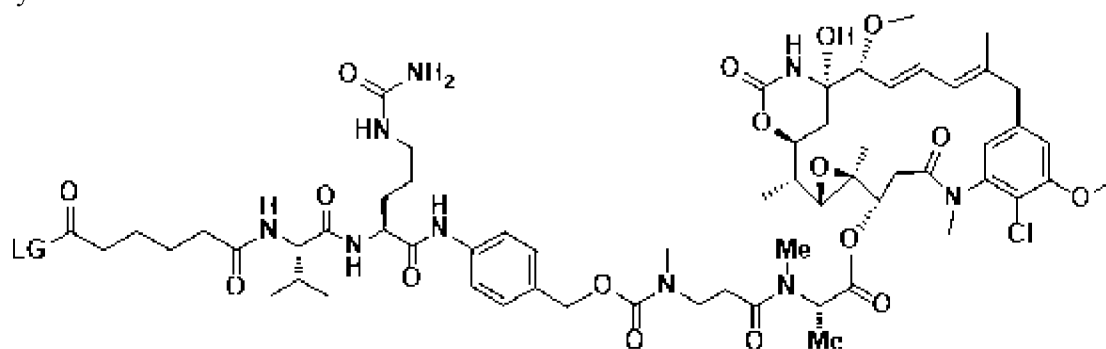
(b)

в присутствии силикагеля и разбавителя для синтеза промежуточного соединения;

и

(ii) приведения биспецифического антигенсвязывающего белка против ТАА х против CD63 в контакт с промежуточным соединением и водным разбавителем.

[0212] В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам получения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающим приведение биспецифического антигенсвязывающего белка против ТАА х против CD63, описанного в настоящем описании, в контакт с соединением, имеющим следующую формулу В:



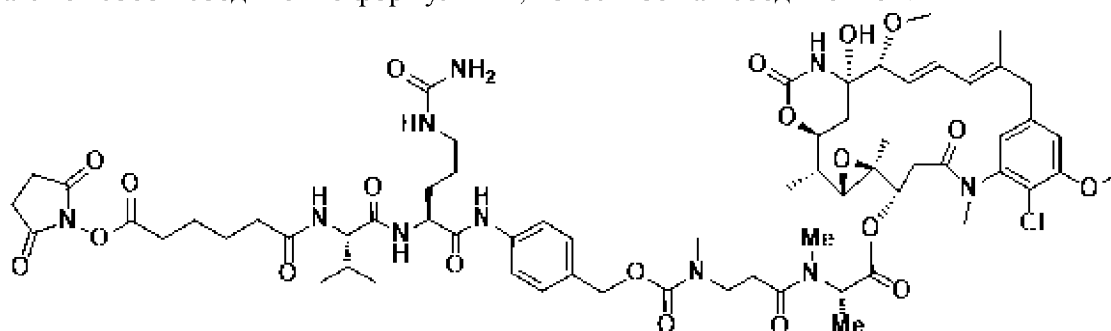
В

где LG представляет собой уходящую группу, и водным разбавителем.

[0213] В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы В присутствует в стехиометрическом избытке. В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы В присутствует в 5-6-кратном стехиометрическом избытке. В некоторых вариантах осуществления, водный разбавитель содержит HEPES. В некоторых

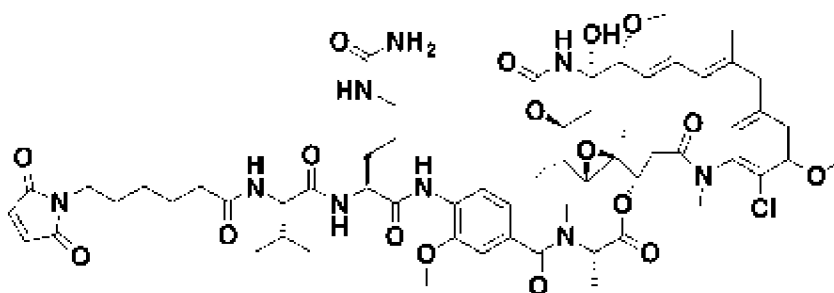
вариантах осуществления, водный разбавитель содержит DMA. В некоторых вариантах осуществления, $-C(O)-LG$ представляет собой сложный эфир, например, NHS или пентафторфенильный сложный эфир.

[0214] В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы В представляет собой соединение формулы В¹, известное как соединение I:



В¹ (Соединение I).

[0215] В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы С известно как соединение II:



С (Соединение II)

[0216] Соотношение лекарственного средства и антитела (DAR) представляет собой среднее количество лекарственных средств, конъюгированных с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, которое оказывает важный эффект на эффективность, активность и фармакокинетику ADC. В различных вариантах осуществления, DAR составляет от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 молекул лекарственного средства на антитело. В некоторых вариантах осуществления, DAR составляет от 1 до 4. В конкретных вариантах осуществления, DAR составляет от 2 до 4. В некоторых случаях, DAR составляет от 2 до 3. В конкретных случаях, DAR составляет от 3 до 4. В некоторых вариантах осуществления, DAR составляет от 1 до 10, от 1 до 20 или от 1 до 30 (т.е., от 1 до 30 молекул лекарственного средства на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент).

Терапевтический состав и введение

[0217] Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению составляют с пригодными носителями, наполнителями и другими средствами, обеспечивающими улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п. Множество подходящих составов можно обнаружить в фармакологическом справочнике, известном всем специалистам в области

фармацевтической химии: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липид (катионный или анионный) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликолей различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. «Compendium of excipients for parenteral formulations» PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[0218] Дозу антигенсвязывающей молекулы, вводимой пациенту, можно менять в зависимости от возраста и роста пациента, целевого заболевания, условий, способа введения и т.п. Предпочтительную дозу, как правило, рассчитывают в соответствии с массой тела или площадью поверхности тела. Когда биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по настоящему описанию используют для терапевтических целей у взрослого пациента, может обеспечивать преимущества внутривенное введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему описанию, обычно в однократной дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно, от приблизительно 0,02 до приблизительно 7, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния, частоту и продолжительность лечения можно корректировать. Эффективные дозы и расписания для введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы можно определять эмпирически; например, прогресс для пациента можно мониторировать посредством периодической оценки, и корректировать дозу соответственно. Кроме того, межвидовое масштабирование доз можно осуществлять с использованием хорошо известных в данной области способов (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

[0219] Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, но без ограничения, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный способы. Композицию можно вводить любым удобным способом, например, посредством инфузии или болюсной инъекции, посредством абсорбции через эпителиальные и слизисто-кожные выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, прямой кишки и кишечника и т.д.), и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может являться системным или местным.

[0220] Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с использованием стандартных иглы и шприца. Кроме того, применительно к подкожной доставке, шприц-ручку легко можно

использовать для доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Такая шприц-ручка может являться многоразовой или одноразовой. В многоразовой шприц-ручке, как правило, используют заменяемый картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После введения всей фармацевтической композиции, содержащейся в картридже, и опустошения картриджа, пустой картридж легко можно выбросить и заменить на новый картридж, содержащий фармацевтическую композицию. Шприц-ручку затем можно использовать заново. В одноразовой шприц-ручке нет заменяемого картриджа. Вместо этого, одноразовую шприц-ручку поставляют предварительно заполненной фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После опустошения картриджа от фармацевтической композиции, целое устройство выбрасывают.

[0221] Многочисленные многоразовые шприц-ручки и автоинжекторы для доставки находят применение в подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры включают AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), если назвать только некоторые из них. Неограничивающие примеры одноразовых шприц-ручек, находящих применение в подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), если назвать только некоторые из них.

[0222] В конкретных ситуациях, фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления, можно использовать насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте осуществления, можно использовать полимерные материалы; см., Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В другом варианте осуществления, систему с контролируемым высвобождением можно помещать вблизи мишени для композиции, что, таким образом, требует только части системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждают в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

[0223] Пригодные для инъекции препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных

инфузий и т.д. Эти пригодные для инъекции препараты можно получать общеизвестными способами. Например, пригодные для инъекции препараты можно получать, например, посредством растворения, суспендирования или эмульгации антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, общепринятых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций, используют, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные вещества, и т.д., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (аддукт гидрогенизированного касторового масла полиоксиэтилен (50 моль))] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученным таким образом средством для инъекции, предпочтительно, заполняют подходящую ампулу.

[0224] Преимущественно, фармацевтические композиции для перорального или парентерального использования, описанные выше, получают в лекарственных формах в единичной дозе, соответствующей дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, средства для инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Содержащееся количество вышеуказанного антитела, как правило, составляет от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг на лекарственную форму в единичной дозе; особенно в форме инъекции является предпочтительным, чтобы содержание вышеуказанного антитела составляло от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг, и от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические и диагностические применения

[0225] Настоящее изобретение относится также к способам, включающим введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтической композиции, содержащей антитело против CD63 или его антигенсвязывающий фрагмент (включая содержащие его мультиспецифическую связывающую молекулу или мультидоменный терапевтический белок) или конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело против CD63 (например, антитело против CD63 или ADC, содержащие любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в таблице 1 в настоящем описании). Терапевтическая композиция может содержать любое из антител против CD63, их антигенсвязывающих фрагментов или ADC, описанных в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

[0226] Антитела, их антигенсвязывающий фрагмент (включая содержащие их мультиспецифическую связывающую молекулу или мультидоменный терапевтический белок) или конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело против CD63 по настоящему изобретению, можно использовать, среди прочего, для лечения,

предотвращения и/или смягчения любого заболевания или нарушения, связанного с CD63 или опосредованного им. Например, антитела и ADC по настоящему изобретению можно использовать для лечения опухолей, экспрессирующих CD63, и в некоторых вариантах осуществления, ТАА, на которые можно нацеливаться посредством биспецифического антитела по настоящему изобретению. Антитела, их антигенсвязывающий фрагмент (включая содержащие их мультиспецифическую связывающую молекулу или мультидоменный терапевтический белок) или конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело против CD63 по настоящему изобретению, также можно использовать для лечения зависимых от тучных клеток (MC-) заболеваний, ревматоидного артрита, зависимых от IgE аллергических реакций и опосредованной Fc-ER1 аллергической реакции, астмы, злокачественной опухоли и/или метастазирования, и т.д. См., например, Kraft et al. (2005) JEM 201:385; Valadi (2007) Nat. Cell Biol. 9:654

[0227] Антитела против CD63 по настоящему изобретению имеют различные применения. В одном варианте осуществления, антитела против CD63 можно использовать для аффинной очистки экзосом, например, при которой антитела против CD63, описанные в настоящем описании, можно иммобилизовать на подходящей подложке, такой как смола Sephadex или фильтровальная бумага, с использованием способов, хорошо известных в данной области, и затем приводить в контакт с образцом, содержащим желательные экзосомы, содержащие CD63, подлежащие очистке, и затем подложку промывают с использованием подходящего растворителя, удаляющего по существу весь материал в образце, за исключением экзосом, которые являются связанными с *иммобилизованным* антителом. Наконец, подложку можно промывать другим пригодным растворителем, освобождающим экзосомы от антитела. В другом варианте осуществления, антитела против CD63 можно использовать в диагностических анализах CD63, например, детекции его экспрессии в специфических клетках, тканях или сыворотке, например, в качестве реагента для идентификации/мечения экзосом. См., например, Valadi et al. (2007) Nature Cell. Biol: 9(6):654-9. Можно использовать различные способы диагностического и прогностического анализа, известные в данной области, такие как конкурентные анализы связывания, прямые или непрямые сэндвич-анализы и анализы иммунопреципитации, проводимые либо в гетерогенных, либо в гомогенных фазах (Zola (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. pp. 147-1581). Антитела, используемые в анализах, можно метить поддающейся детекции группой. *Поддающаяся детекции* группа должна являться способной подавать, либо напрямую, либо опосредованно, поддающийся детекции сигнал. Можно использовать любой способ, известный в данной области, для конъюгации антитела с поддающейся детекции группой.

[0228] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, такого как злокачественная опухоль. Способ по настоящему изобретению, *предпочтительно*, включает стадию предоставления антитела или его

антигенсвязывающего фрагмента против CD63, как описано выше, субъекту, требующему такого лечения.

[0229] Способы иммунологического нацеливания на клетки злокачественных опухолей с использованием антител или фрагментов антител хорошо известны в данной области. В Патенте США No. 6306393, например, описано использование антител против CD22 в *иммунотерапии* В-клеточных злокачественных новообразований, и в Патенте США No. 6329503 описано иммунологическое нацеливание на клетки, экспрессирующие трансмембранные антигены серпентины. Антитела, описанные в настоящем описании (включая гуманизированные или человеческие моноклональные антитела или их фрагменты или другие модификации, необязательно, конъюгированные с цитотоксическими или другими средствами), можно вводить пациенту таким образом, что антитело связывается с клетками злокачественных опухолей и опосредует разрушение клеток и опухоли и/или ингибирует рост клеток или опухоли.

[0230] Без намерения ограничивать описание, механизмы, посредством которых такие антитела могут оказывать терапевтический *эффект*, могут включать, например, опосредованный комплементом цитолиз, антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), модуляцию физиологической функции антигена опухоли, ингибирование связывания или путей передачи сигналов, модуляцию дифференцировки клетки опухоли, изменение профилей факторов ангиогенеза опухоли, модуляцию секреции иммуностимулирующих или супрессирующих опухоль цитокинов и факторов роста, модуляцию клеточной адгезии и/или индукцию апоптоза.

Пример 1: Иллюстративные антитела против CD63

[0231] *Получение антител против CD63 человека*

[0232] Антитела против CD63 человека антитела получали посредством иммунизации мыши (например, модифицированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина и человеческой легкой цепи каппа) с использованием CD63 человека.

[0233] После иммунизации, спленоциты собирали от каждой мыши и либо (1) сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и получения клеток гибридомы, и подвергали скринингу по специфичности для CD63 человека, либо (2) сортировали В-клетки (как описано в US 2007/0280945A1) с использованием любого фрагмента CD63 человека в качестве реагента для сортировки, который связывает и идентифицирует реакционноспособные антитела (положительные для антигена В-клетки).

[0234] Первоначально выделяли химерные антитела против CD63 человека, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область, с использованием, например, технологии VELOCIMMUNE, как описано в Патенте США No. 7105348; Патенте США No. 8642835; и US 9622459, содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

[0235] В некоторых антителах, для целей тестирования, мышинные константные области заменяли на желательную человеческую константную область, например,

человеческую СН дикого типа или модифицированную человеческую СН (например, изотипов IgG1, IgG2 или IgG4), и константную область легкой цепи (CL), для получения полностью человеческого антитела против hCD63, включая полностью человеческое биспецифическое антитело, содержащее антитело против hCD63 или его антигенсвязывающую часть. В то время как выбранную константную область можно менять в соответствии с конкретным применением, характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичности для мишени остаются в вариабельной области.

[0236] Конкретные биологические свойства иллюстративных биспецифических антител, содержащих связывающее плечо против CD63 человека, полученных в соответствии со способами из этого примера, подробно описаны в примерах, указанных ниже.

[0237] *Последовательности аминокислот и нуклеиновой кислоты вариабельных областей тяжелых и легких цепей антител против CD63*

[0238] В таблице 1 указаны идентификаторы последовательностей для кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты (НК), и в скобках, для аминокислотной (АК) последовательности вариабельной области тяжелой или легкой цепи (HCVR или LCVR, соответственно), или CDR тяжелой или легкой цепи (HCDR и LCDR, соответственно) избранных антител против CD63, использованных для получения мультидоменных терапевтических белков против CD63, описанных в настоящем описании.

Таблица 1: идентификаторы последовательностей антител против CD63

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR НК (АК)	HCDR1 НК (АК)	HCDR2 НК (АК)	HCDR3 НК (АК)	LCVR НК (АК)	LCDR1 НК (АК)	LCDR2 НК (АК)	LCDR3 НК (АК)
H1M12451N	1 (2)	3 (4)	5 (6)	7 (8)	9 (10)	11 (12)	13 (14)	15 (16)
H2M12395N	17 (18)	19 (20)	21 (22)	23 (24)	25 (26)	27 (28)	29 (30)	31 (32)
H4H12450N	33 (34)	35 (36)	37 (38)	39 (40)	41 (42)	43 (44)	45 (46)	47 (48)
H2M12450N	49 (50)	51 (52)	53 (54)	55 (56)	57 (58)	59 (60)	61 (62)	63 (64)
H1M12362N	65 (66)	67 (68)	69 (70)	71 (72)	73 (74)	75 (76)	77 (78)	79 (80)
H1M12366N	81 (82)	83 (84)	85 (86)	87 (88)	89 (90)	91 (92)	93 (94)	95 (96)
H1M12386N	97 (98)	99 (100)	101 (102)	103 (104)	105 (106)	107 (108)	109 (110)	111 (112)
H1M12388N	113 (114)	115 (116)	117 (118)	119 (120)	121 (122)	123 (124)	125 (126)	127 (128)
H1M12390N	129 (130)	131 (132)	133 (134)	135 (136)	137 (138)	139 (140)	141 (142)	143 (144)
H2M12385N	145 (146)	147 (148)	149 (150)	151 (152)	153 (154)	155 (156)	157 (158)	159 (160)

H2M12387N	161 (162)	163 (164)	165 (166)	167 (168)	169 (170)	171 (172)	173 (174)	175 (176)
H2M12392N	177 (178)	179 (180)	181 (182)	183 (184)	185 (186)	187 (188)	189 (190)	191 (192)
H2M12394N	193 (194)	195 (196)	197 (198)	199 (200)	201 (202)	203 (204)	205 (206)	207 (208)
H2M12452N	209 (210)	211 (212)	213 (214)	215 (216)	217 (218)	219 (220)	221 (222)	223 (224)
H2M12454N	225 (226)	227 (228)	229 (230)	231 (232)	233 (234)	235 (236)	237 (238)	239 (240)
H2M13022N	241 (242)	243 (244)	245 (246)	247 (248)	249 (250)	251 (252)	253 (254)	255 (256)
H3M12361N	257 (258)	259 (260)	261 (262)	263 (264)	265 (266)	267 (268)	269 (270)	271 (272)
H4H11990P2	273 (274)	275 (276)	277 (278)	279 (280)	281 (282)	283 (284)	285 (286)	287 (288)
H4H11992P2	289 (290)	291 (292)	293 (294)	295 (296)	281 (282)	283 (284)	285 (286)	287 (288)
H4H11993P2	297 (298)	299 (300)	301 (302)	303 (304)	281 (282)	283 (284)	285 (286)	287 (288)
H4H11995P2	305 (306)	307 (308)	309 (310)	311 (312)	281 (282)	283 (284)	285 (286)	287 (288)
H4H11996P2	313 (314)	315 (316)	317 (318)	319 (320)	281 (282)	283 (284)	285 (286)	287 (288)
H4H11997P2	321 (322)	323 (324)	325 (326)	327 (328)	281 (282)	283 (284)	285 (286)	287 (288)
H4H11998P2	329 (330)	331 (332)	333 (334)	335 (336)	281 (282)	283 (284)	285 (286)	287 (288)

[0239] *Связывание исходными антителами против CD63 человека*

[0240] Относительное связывание на клеточной поверхности антител против CD63 с экспрессирующими CD63 человека клетками оценивали посредством проточной цитометрии с использованием положительных по CD63 клеток HEK293 (ATCC, кат. # CRL-1573), эндогенно экспрессирующих CD63 человека, и отрицательных по CD63 клеток HEK293/нокаут CD63. Для анализа, клетки рассеивали в PBS без кальция и магния (VWR, кат.# 45000-446), содержащем 2% FBS (Saradigm кат.# 1500-500) (буфер для окрашивания) в 96-луночные планшеты с V-образным дном (Axygen Scientific, кат.# P-96-450-V-C-S). Затем клетки инкубировали с антителами против CD63 или антителами для контроля изотипа в концентрациях, лежащих в диапазоне от 100 нМ до 1,7 пМ, в течение 30 минут на льду. Лунки, не содержащие антитела, использовали в качестве контрольных. Клетки HEK293/CD63KO окрашивали только с использованием наивысшей концентрации (100 нМ) антител. Затем клетки промывали один раз с использованием буфера для окрашивания и инкубировали с конъюгированным с PE вторичным антителом против Fc мыши (Jackson ImmunoResearch, кат.# 115-115-164) при 100 нМ в течение 30 минут при 4°C. Затем клетки промывали и фиксировали с использованием 50% раствора Cytofix (BD Biosciences, кат.# 554655), разведенного в PBS. Образцы анализировали в проточном цитометре Intellicyte Hypercyt, и результаты анализировали в программном обеспечении

ForeCyt (Intellicyte) для расчета средней интенсивности флуоресценции (MFI). Измеренные значения анализировали с использованием четырехпараметрического логистического уравнения для 12-точечной кривой ответа с использованием GraphPad Prism, и регистрировали полученные значения EC_{50} (таблица 12). Соотношение сигнала и шума (S/N) определяли посредством расчета соотношения MFI антител против CD63 или контрольных антител к лункам, не содержащим антител (таблица 12).

[0241] Как показано в таблице 2, для трех антител против CD63 по настоящему изобретению показано связывание с клетками HEK293 с значениями S/N, лежащими в диапазоне от 21,0 до 31,6 и значениями EC_{50} , лежащими в диапазоне от 0,5 нМ до 1,9 нМ. Для несвязывающегося контроля не показано связывания с клетками HEK293 ($S/N \leq 1,5$). Как для антител против CD63, так и для антител для контроля изотипа, показано от слабого до небольшого связывания с клетками HEK293/CD63KO ($S/N \leq 4,4$).

Таблица 2: Связывание антител против CD63 с клетками HEK293 и HEK293/CD63 KO, как измерено посредством проточной цитометрии

Антитело	HEK293, EC_{50} (нМ)	HEK293 (S/N)	HEK293/CD63 KO (S/N)
H2M12450N	0,5	26,7	2,9
H1M12451N	1,8	31,6	4,1
H2M12395N	1,9	21,0	2,9
Контроль изотипа 1	ND	1,4	4,4
Контроль изотипа 2	ND	1,5	1,6

ND=Не определено

[0242] Способность моноклональных антител против CD63 по настоящему изобретению связываться с экспрессирующими CD63 человека клетками, определяли также с использованием анализа на основе детекции электрохемилюминесценции (ECL).

[0243] Для получения сверхэкспрессирующих клеток, клетки мышинные эмбриональные фибробласты NIH3T3 (ATCC, кат.# CRL-1658) трансфицировали для получения линии клеток «NIH3T3/hCD63», стабильно экспрессирующей CD63 человека (hCD63; аминокислоты M1-M238 из номера доступа NP_001771; SEQ ID NO:337). Уровни экспрессии CD63 человека в эндогенно экспрессирующих клетках, линии клеток чувствительной к андрогенам аденокарциномы предстательной железы человека, LNCAP (ATCC, кат.# CRL-1740), и линии клеток первичной глиобластомы человека, U87MG (ATCC, кат.# HTB-14), анализировали с использованием Quantum™ Alexa Fluor® 647 MESF (Bangs Laboratories, кат.# 647B) и антител против IgG мыши Simply Cellular® (Bangs Laboratories Inc, кат.# 815), следуя инструкциям производителя. Определили, что клетки LNCAP имели более низкое количество копий CD63 человека, чем клетки U87MG. Нетрансфицированные клетки NIH3T3, которые не имеют поддающейся детекции экспрессии CD63 человека по активированной флуоресценцией сортировке клеток (FACS), включали в качестве отрицательного контроля.

[0244] Кратко, линии клеток промывали один раз в буфере PBS без Ca^{2+}/Mg^{2+} и инкубировали в течение 10 минут при 37°C с не содержащим ферментов раствором для

диссоциации клеток (Millipore, кат.# S-004-C) для открепления клеток. Затем клетки промывали один раз PBS с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ и подсчитывали с использованием счетчика клеток Cellometer™ Auto T4 (Nexcelom Bioscience, LLC). Приблизительно $2,0 \times 10^4$ клеток NIH3T3/hCD63, LNCAP, U87MG или NIH3T3 рассеивали по отдельности в 96-луночные планшеты с графитовыми электродами (Meso Scale Discovery, кат.# L15XB-6) и затем инкубировали в течение одного часа при 37°C. Участки неспецифического связывания блокировали с использованием 2% BSA (масс./об.) в PBS с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ в течение одного часа при комнатной температуре (RT). Растворы, содержащие антитела против CD63 или антитела для контроля изотипа в диапазоне концентраций (1,7 пМ - 100 нМ) в 0,5% BSA (масс./об.) в PBS с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, так же как контрольный буфер отдельно, затем добавляли в двух повторях к связанным с планшетом клеткам NIH3T3/hCD63, LNCAP, U87MG или NIH3T3 и инкубировали в течение одного часа при RT. Затем планшеты промывали для удаления несвязавшихся антител с использованием промывателя для планшетов AquaMax2000 с насадкой для промывки клеток (MDS Analytical Technologies). Связавшиеся с планшетом антитела детектировали с использованием 1 мкг/мл либо конъюгированного с SULFO-TAG™ поликлонального антитела козы против IgG человека, специфического для фрагмента Fcγ (Jackson ImmunoResearch, кат.# 109-005-098) либо конъюгированного с SULFO-TAG™ поликлонального антитела козы против IgG мыши, специфического для фрагмента Fcγ (Jackson ImmunoResearch, кат.# 115-005-164), в течение одного часа при RT. Планшеты промывали и затем инкубировали с буфером для считывания (MSD, кат.# R92TD-2), в соответствии с инструкциями производителя. Сигналы люминесценции измеряли с использованием устройства для визуализации SECTOR (MSD). Интенсивность люминесценции, измеренную в относительных световых единицах (RLU), регистрировали для указания интенсивности связывания каждого антитела в тестируемом диапазоне концентраций. Соотношение сигнала, детектированного с использованием связывания 3,7 нМ антитела с экспрессирующими CD63 человека клетками, по сравнению со связыванием той же концентрации антитела с отрицательными клетками, регистрировали в качестве показателя специфичности связывания CD63. Антитела с коэффициентом связывания более чем 3, классифицированы как специфические связывающие молекулы, и антитела с коэффициентом связывания, меньшим или равным 3, классифицированы как несвязывающие молекулы и отмечены NB в таблице 13. Кроме того, непосредственные сигналы связывания (в RLU) анализировали как функцию концентрации антитела, и данные приводили в соответствие с сигмоидной моделью зависимости ответа от дозы (по четырехпараметрической логистике) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™. Значение EC_{50} для связывания с экспрессирующими CD63 человека клетками, определенное как концентрация антитела, при которой детектировано 50% от максимального сигнала связывания, определено для указания активности каждого антитела и приведено в таблице 3 только для специфических связывающих молекул.

Данные для двух отдельных экспериментов, тестирующих различные антитела, приведены в таблицах 3А и 3В.

[0245] Как показано в таблице 3А, четыре антитела против CD63, полученные, как описано в этом примере, и сравнительное Ab (сравнительное антитело 1) специфически связывались с CD63 человека, экспрессированным на модифицированных клетках NIH3T3/hCD63, так же как с эндогенно экспрессированным на линиях клеток LNCAP и U87MG. Четыре антитела против CD63, описанные в этом примере, связывались с клетками NIH3T3/hCD63 с значениями EC_{50} , лежащими в диапазоне от 280 пМ до 970 пМ, и коэффициентами связывания, по сравнению с отрицательной линией клеток, лежащими в диапазоне от 91- до 281-кратного. Четыре антитела против CD63 по настоящему изобретению связывались с клетками U87MG с значениями EC_{50} , лежащими в диапазоне от 500 пМ до 1,4 нМ, и коэффициентами связывания, по сравнению с отрицательной линией клеток, лежащими в диапазоне от 52 до 272-кратного. Четыре антитела против CD63, полученные, как описано в этом примере, связывались с клетками LNCAP с значениями EC_{50} , лежащими в диапазоне от 210 пМ до 1,7 нМ и коэффициентами связывания, по сравнению с отрицательной линией клеток, лежащими в диапазоне от 7 до 20-кратного. Более низкие коэффициенты связывания на клетках LNCAP согласовывались с более низким количеством копий CD63 на этих клетках, по сравнению с клетками U87MG. Антитела для контроля изотипа являлись несвязывающими молекулами, как ожидали, с коэффициентами связывания с клетками, меньшими или равными 3.

Таблица 3А. Связывание антител против CD63 с экспрессирующими CD63 человека клетками, как измерено посредством детекции на основе электрохемилюминесценции

Антитело	Активность связывания с клетками, EC_{50} (М)			Соотношение, при концентрации Ab 3,7, нМ сигнала связывания (RLU) с клетками с CD63 человека, по сравнению с отрицательными NIH3T3		
	NIH3T3/hCD63	U87MG	LNCAP	NIH3T3/hCD63	U87MG	LNCAP
H1M12451N	2,9E-10	7,9E-10	3,5E-10	256	171	18
H2M12395N	5,7E-10	9,5E-10	1,7E-09	91	52	7
H4H12450N	2,8E-10	5,0E-10	2,1E-10	230	175	20
H2M12450N	9,7E-10	1,4E-09	1,4E-09	281	272	20
КОНТРОЛЬ						
Сравнительное Ab 1	5,7E-10	6,7E-10	2,0E-09	253	271	16
Контроль изотипа для IgG4 человека	NB	NB	NB	1	1	1
Контроль изотипа для IgG2 мыши	NB	NB	NB	3	2	2

NB - несвязывающая молекула; антитела с коэффициентом связывания, меньшим или равным 3, классифицированы как несвязывающие молекулы.

[0246] Как показано в таблице 3В, девятнадцать из двадцати тестируемых антител против CD63, так же как сравнительное Ab (сравнительное антитело 1), специфически связывались с CD63 человека, экспрессируемым на модифицированных клетках NIH3T3/hCD63 и на эндогенно экспрессирующих линиях клеток U87MG и LNCAP. Одно антитело против CD63, H4H11998P2, специфически связывалось с NIH3T3/hCD63 и U87MG, но не связывалось с LNCAP. Двадцать тестируемых антител против CD63 связывались с клетками NIH3T3/hCD63 с значениями EC₅₀, лежащими в диапазоне от 0,320 нМ до 7,4 нМ, с коэффициентами связывания, по сравнению с отрицательной линией клеток, лежащими в диапазоне от 14 до 608-кратного, и связывались с клетками U87MG с значениями EC₅₀, лежащими в диапазоне от 0,29 нМ до 17 нМ, с коэффициентами связывания, лежащими в диапазоне от 5 до 405-кратного. Девятнадцать антител против CD63 связывались с клетками LNCAP с значениями EC₅₀, лежащими в диапазоне от 0,15 пМ до 55 нМ, с коэффициентами связывания, по сравнению с отрицательной линией клеток, лежащими в диапазоне от 4 до 51-кратного. Одно антитело против CD63, H4H11998P2, являлось несвязывающей молекулой для клеток LNCAP с коэффициентом связывания с клетками 1. Более низкие коэффициенты связывания на клетках LNCAP согласовывались с более низким количеством копий CD63 на этих клетках, по сравнению с клетками U87MG. Антитела для контроля изотипа являлись несвязывающими молекулами, как ожидали, с коэффициентами связывания с клетками, меньшими или равными 3, или сигналом связывания менее чем 100 RLU, для тестируемых линий клеток с CD63 человека.

Таблица 3В. Связывание антител против CD63 с экспрессирующими CD63 человека клетками, как измерено посредством детекции на основе электрохемилюминесценции

Антитело	Активность связывания с клетками, EC ₅₀ (М)			Соотношение, при концентрации Ab 3,7, нМ сигнала связывания (RLU) с клетками с CD63 человека, по сравнению с отрицательными NIH3T3		
	NIH3T3/hCD63	U87MG	LNCAP	NIH3T3/hCD63	U87MG	LNCAP
H2bM12454N	3,2E-10	4,7E-10	1,8E-10	175	132	14
H2aM12394N	3,8E-10	1,4E-09	7,5E-10	61	50	4
H2aM12387N	3,9E-10	2,9E-10	1,5E-10	228	172	18
H2aM12392N	4,0E-10	5,3E-10	2,3E-10	608	405	51
H2bM12385N	4,5E-10	6,4E-10	2,9E-10	71	47	5
H2bM13022N	4,5E-10	8,5E-10	3,2E-10	95	71	8
H1M12390N	4,8E-10	3,6E-10	3,0E-10	559	339	31

H1M12388N	5,2E-10	3,0E-10	2,5E-10	434	284	31
H1M12386N	5,2E-10	3,1E-10	2,9E-10	220	129	16
H2aM12452N	6,1E-10	2,0E-09	7,4E-10	593	260	37
H1M12362N	6,3E-10	5,6E-10	5,7E-10	283	174	16
H3M12361N	8,1E-10	1,3E-09	1,1E-09	243	111	19
H3M12366N	8,3E-10	2,0E-09	1,8E-09	310	107	7
H4H11990P2	9,3E-10	4,8E-09	5,1E-09	168	66	6
H4H11997P2	9,4E-10	1,7E-09	1,9E-09	266	99	11
H4H11996P2	9,8E-10	8,1E-09	4,4E-09	188	57	7
H4H11992P2	1,5E-09	5,5E-09	3,6E-09	87	33	4
H4H11993P2	2,5E-09	1,7E-08	6,7E-09	227	62	8
H4H11995P2	5,0E-09	1,3E-08	5,5E-08	212	61	5
H4H11998P2	7,4E-09	IC	NB	14	5	1
КОНТРОЛЬ						
Сравнительное Ab 1	9,6E-10	1,1E-09	5,3E-10	589	243	25
Контроль изотипа для IgG4 человека	NB	NB	NB	1	4(*)	1
Контроль изотипа для IgG2 мыши	NB	NB	NB	3	2	2

NB - несвязывающая молекула; антитела с коэффициентом связывания, меньшими или равными 3, или сигналом связывания менее чем 100 RLU.

(*) - сигнал связывания с U87MG составлял менее, чем 100 RLU, и контроль изотипа классифицирован как несвязывающая молекула.

IC - незаключительный; не наблюдали соответствия сигмоидной кривой для расчета значения EC₅₀.

[0247] *Интернализация/цитотоксичность, опосредованная исходными антителами против CD63 человека*

[0248] Оценивали способность антител против CD63, описанных в настоящем описании, к связыванию и интернализации экспрессирующими CD63 клетками. Для анализа, клетки T47D (ATCC, кат. # HTB-133) рассеивали в 96-луночные покрытые коллагеном планшеты (Greiner, кат.# 655956) в RPMI (Irvine Scientific, кат. #9160), содержащей 10% FBS (ATCC, кат.# 30-2020), пенициллин/стрептомицин/L-глутамин (Gibco, кат. #10378-016), 100 мкМ пируват натрия (Millipore, кат.#TM5-005-C), 1 мМ HEPES (ThermoFisher, кат.# 15630080), 10 мкг/мл бычьего инсулина (Gemini BioProducts, кат.#700-912P) (средах для роста) и оставляли для инкубации в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. Для окрашивания, планшеты с клетками в четырех повторях инкубировали с 10

мкг/мл антител против CD63, которые разводили в 2% FBS в PBS, без кальция и магния (Irving, кат. # 9240) (буфер для окрашивания) в течение 30 минут при 4°C. Клетки промывали дважды буфером для окрашивания, затем инкубировали с конъюгированными с Alexa-Fluor 488 вторичным Ab (Jackson ImmunoResearch, кат. # 115-547-003 или Jackson ImmunoResearch, кат. # 109-547-003) при 10 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C, и затем промывали еще два раза буфером для окрашивания. Два планшета немедленно фиксировали и окрашивали 4% параформальдегидом (PFA; ThermoFisher, кат. #28908)+5 мкМ DRAQ5 (ThermoFisher, кат. #62251) в PBS в течение 20 минут (планшеты без интернализации). Оставшиеся два планшета инкубировали со средами для роста при 37°C в течение 2 часов, с последующей фиксацией и окрашиванием в течение 20 минут с использованием раствора 4% PFA+5мкМ DRAQ5, разведенного в PBS (планшеты для интернализации). После фиксации, все планшеты промывали один раз с использованием PBS. Один планшет без интернализации и один планшет для интернализации инкубировали с антителом против Alexa Fluor 488 (Regeneron) при 50 мкг/мл в PBS в течение ночи при 4°C для остановки поверхностной флуоресценции Alexa Fluor 488. Остальные планшеты инкубировали только с PBS. Конфокальные изображения получали на Opera Phenix (Perkin Elmer) при 40X увеличении. Программное обеспечение Harmony (Perkin Elmer) использовали для идентификации меченных DRAQ5 клеток и определяли общее количество Alexa-Fluor 488 относительных флуоресцентных единиц (RFU) на клетку. Общее связывание при 4°C (значения RFU при 4°C для лунок без остановки), общее связывание при 37°C (значения RFU при 37°C для лунок без остановки), общее количество RFU для интернализации, и % интернализации определяли для каждого антитела, как показано в таблице 1. Для всех расчетов, фоновую флуоресценцию для контроля из лунок только с 2^м Ab вычитали из каждой лунки. Общее количество интернализированных RFU рассчитывали следующим образом: Общее количество RFU при 37°C для образцов без остановки - Поверхностные RFU при 37°C. Поверхностные RFU определяли как RFU без остановки при 37°C - RFU после остановки при 37°C)/QE. QE (эффективность остановки) определяли как: 1-(общее количество RFU при 4°C для образца после остановки/общее количество RFU при 4°C для образца без остановки). % интернализации определяли по следующей формуле: (общее количество интернализированных RFU при 37°C/общее количество RFU при 37°C)*100.

[0249] Как показано в таблице 4, для всех 4 антител против CD63 по настоящему изобретению показана интернализация в клетки T47D, лежащая в диапазоне от 60,9% до 73,7% интернализации. Для контроля изотипа не показано никакой поддающейся измерению интернализации.

Таблица 4: Интернализация и поверхностное связывание антител против CD63 клетками T47D

Антитело	Общее количество RFU при 4°C	Общее количество RFU при 37°C (2 час)	Общее количество интернализованных RFU	% интернализации
H4H12450N	2098644	2083920	1419840	68,1
Контроль изотипа hIgG4	137648	-80525	-75133	ND*
H2aM12450N	2359553	2938050	1790248	60,9
H1M12451N	1902759	2321763	1710839	73,7
H2M12395N	1499634	1693000	1238752	73,2
Контроль изотипа mIgG1	-93885	57417	66563	ND*
Контроль изотипа mIgG2a	-73427	65365	73850	ND*

ND*: % интернализацию невозможно было определить из-за слабого связывания и/или невозможности определить эффективность остановки

[0250] Для оценки способности антитела против CD63, описанного в настоящем описании к интернализации экспрессирующими CD63 клетками, проводили непрямой анализ цитотоксичности *in vitro*. Положительные по CD63 человека клетки T47D (ATCC, кат. #HTB-133) и отрицательные по CD63 человека клетки NIH3T3 (ATCC, кат. #CRL-1658) соответственно рассеивали в покрытые PDL 96-луночные планшеты (BD Bioscoat, кат. #356461) либо при 6000 клеток на лунку в RPMI (Irvine Scientific, кат. #9160), содержащей 10% FBS (ATCC, кат. #30-2020), пенициллин/стрептомицин/L-глутамин (Gibco, кат. #10378-016), 50 мкМ бета-меркаптоэтанол (Sigma, кат. #M7522) (среды для роста), пируват натрия 100мМ (Millipore, кат. #TMS-005-C), HEPES 1M (Irvine Scientific, кат. #9319) и бычий инсулин, 10 мкг/мл (Gemini BioProducts, кат. #700-912P), либо при 2000 клеток на лунку в DME с высоким содержанием глюкозы (Irvine Scientific, кат. #9033), 10% сыворотки теленка (Hyclone, кат. #SH30072,03), плюс пенициллин/стрептомицин/L-глутамин (Gibco, кат. #10378-016) и выращивали в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. Для кривых жизнеспособности клеток, клеток инкубировали в течение 5 минут при 37°C с серийно разведенным антителом против CD63 (H2M12450N) или несвязывающим антителом для контроля изотипа при концентрациях, лежащих в диапазоне от 3,0 пМ до 2,2 нМ. Затем добавляли вторичное антитело Fab против mFc, конъюгированное с цитотоксической нагрузкой MMAF (Moradec, кат. #AM-201AF-50) при 20 нМ в каждую лунку. Среды отдельно служили в качестве отрицательного контроля, и 33 мкМ дигитонин (Promega, кат. #G9441) использовали для определения максимальной цитотоксичности. После 72-часовой инкубации, жизнеспособность клеток измеряли с использованием набора для подсчета клеток Cell Counting Kit-8 (Dojindo, кат. #CK04), по протоколам производителя, со временем инкубации в диапазоне 1-3 часов. Оптическую плотность при 450 нм (OD₄₅₀) измеряли в считывателе для планшетов Envision (PerkinElmer). Фоновые уровни OD₄₅₀ для обработанных дигитонином клеток вычитали из всех лунок, и жизнеспособность выражали как процент от необработанного контроля (%)

жизнеспособности). Значения IC_{50} определяли из четырехпараметрического логистического уравнения для 8-точечной кривой ответа (GraphPad Prism). Все значения IC_{50} выражали в нМ концентрации, и регистрировали минимальный % жизнеспособных клеток, оставшихся после обработки.

[0251] Как обобщено в таблице 5, антитело против CD63, H2M12450N, уменьшало жизнеспособность T47D до 21% с значением IC_{50} 0,24 нМ, в то время как контроль изотипа уменьшал жизнеспособность только до 64%. Антитела оказывали от небольшого эффекта до отсутствия эффекта на жизнеспособность линии клеток NIH3T3.

Таблица 5. Интернализация антитела против CD63, измеренная посредством непрямого анализа цитотоксичности для клеток T47D и NIH3T3

Антитело	T47D (нМ), IC_{50}	% жизнеспособности T47D	NIH3T3 (нМ), IC_{50}	% жизнеспособности NIH3T3
H2M12450N	0,24	21	ND	83
Контроль изотипа	ND	64	ND	91

ND=Не определено

[0252] *Кинетика связывания по Biacore для связывания моноклональных антител против CD63 с реагентами CD63 с петлей (EC2), измеренная при 25°C и 37°C*

[0253] Равновесные константы диссоциации (K_D) для связывания различных реагентов с петлей (EC2) CD63 с очищенными моноклональными антителами против CD63 определяли с использованием основанного на поверхностном плазмонном резонансе в реальном времени биосенсора Biacore T200 или биосенсора Biacore 2000. Все исследования связывания проводили в рабочем буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3мМ ЭДТА и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (HBS-ET) при 25°C и 37°C. Поверхность сенсорного чипа Biacore CM5 сначала дериватизировали посредством присоединения по аминогруппе либо поликлонального антитела кролика против антитела мыши, специфического для Fc (GE Healthcare, кат.# BR100838), либо набора против Fab (GE Healthcare, кат.# 28958325) для моноклональных антител против CD63. Исследования связывания проводили либо для рекомбинантной внеклеточной петли 2 CD63 человека, экспрессированной с С-концевым Мус-Мус-гексагистицином (ЕС петля 2 hCD63-ММН; SEQ ID NO:338), либо для рекомбинантной внеклеточной петли 2 CD63 человека, экспрессированной с С-концевой меткой Fc человека (ЕС петля 2 hCD63-hFc; SEQ ID NO:339). Различные концентрации ЕС петля 2 hCD63-ММН или ЕС петля 2 hCD63-hFc (тестируемые либо для 50 нМ - 12,5 нМ в 4-кратном разведении, либо для 90 нМ-0,37 нМ в 3-кратных серийных разведениях), сначала получали в рабочем буфере HBS-ET и инъецировали над поверхностью с иммобилизованным моноклональным антителом против CD63 в течение 4 минут при скорости потока 35 мкл/минуту или 50 мкл/минуту, в то время как диссоциацию связанного с моноклональным антителом реагента CD63 мониторировали в течение 8 или 10 минут в рабочем буфере HBS-ET. Константы скорости связывания (k_a) и скорости диссоциации (k_d) определяли посредством приведения сенсограмм связывания в реальном времени в соответствие с моделью

связывания 1:1 с ограничением переноса массы с использованием программного обеспечения для подбора кривой Scrubber 2.0с. Равновесные константы диссоциации для связывания (K_D) и периоды времени полужизни при диссоциации ($t_{1/2}$) рассчитывали из кинетических констант скорости как:

$$K_D \text{ (М)} = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t_{1/2} \text{ (МИН)} = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

[0254] Параметры кинетики связывания для связывания белка с ЕС петлей 2 CD63 человека с различными моноклональными антителами против CD63 по настоящему изобретению при 25°C и 37°C показаны в таблицах 6-9.

[0255] При 25°C, 20 из 23 моноклональных антител против CD63 по настоящему изобретению связывались с ЕС петлей 2 CD63 человека-ММН с значениями K_D , лежащими в диапазоне от 676 пМ до 11,7 мкМ, как показано в таблице 6. При 37°C, 21 из 23 моноклональных антител против CD63 по настоящему изобретению связывались с ЕС петлей 2 CD63 человека-ММН с значениями K_D , лежащими в диапазоне от 1,15 нМ до 12,3 мкМ, как показано в таблице 7. При 25°C, 22 из 23 моноклональных антител против CD63 по настоящему изобретению связывались с ЕС петлей 2 CD63 человека-Fc с значениями K_D , лежащими в диапазоне от 129 пМ до 10,1 нМ, как показано в таблице 8. При 37°C, 22 из 23 моноклональных антител против CD63 по настоящему изобретению связывались с ЕС петлей 2 CD63 человека-Fc с значениями K_D , лежащими в диапазоне от 45,0 пМ до 14,5 нМ, как показано в таблице 9.

Таблица 6: Параметры кинетики связывания для связывания ЕС петли 2 CD63 человека-ММН с моноклональными антителами против CD63 при 25°C

Антитело	Уровень связывания mAb (RU)	100 нМ связанный Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM12450N	592	65	2,27E+05	2,79E-04	1,23E-09	41
H2aM12395N	472	42	1,66E+05	1,82E-03	1,10E-08	6
H1M12451N	525	52	8,59E+04	4,30E-04	5,00E-09	27
H1M12386N	405	65	5,40E+05	3,65E-04	6,76E-10	32
H1M12388N	408	59	8,15E+05	5,87E-04	7,20E-10	20
H2aM12387N	532	74	5,43E+05	5,40E-04	9,94E-10	21
H3M12361N	367	43	2,58E+05	8,05E-04	3,12E-09	14
H2aM12452N	348	35	8,13E+04	5,96E-04	7,33E-09	19
H2aM12392N	595	79	2,98E+05	9,22E-04	3,10E-09	13
H2bM12454N	485	61	3,84E+05	1,88E-03	4,89E-09	6
H1M12362N	308	51	1,13E+05	1,44E-03	1,27E-08	8
H2bM13022N	350	48	1,02E+05	1,32E-03	1,30E-08	9
H1M12390N	418	54	3,23E+05	3,36E-03	1,04E-08	3
H2bM12385	536	48	3,22E+05	3,31E-03	1,03E-08	3
H2aM12394N	670	27	5,91E+04	5,53E-04	9,36E-09	21
H3M12366N	239	21	IC	IC	IC	IC

H4H11990P2	707	94	1,93E+05	5,91E-03	3,06E-08	2
H4H11997P2	819	106	1,86E+05	3,71E-03	1,99E-08	3,1
H4H11998P2	633	11	2,64E+03	3,09E-02	1,17E-05	0,4
H4H11996P2	628	61	1,65E+05	1,40E-02	8,49E-08	0,8
H4H11995P2	643	8	IC	IC	IC	IC
H4H11992P2	743	53	1,25E+05	2,67E-02	2,13E-07	0,4
H4H11993P2	601	10	IC	IC	IC	IC

IC=незаключительное связывание

Таблица 7: Параметры кинетики связывания для связывания ЕС петли 2 CD63 человека-ММН с моноклональными антителами против CD63 при 37°C

Антитело	Уровень связывания mAb (RU)	100 нМ связанный Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM12450N	617	58	1,75E+05	2,01E-04	1,15E-09	57
H2aM12395N	535	31	1,65E+05	9,32E-03	5,64E-08	1
H1M12451N	597	44	8,89E+04	1,90E-03	2,14E-08	6
H1M12386N	455	65	6,50E+05	2,35E-03	3,61E-09	5
H1M12388N	462	60	6,51E+05	3,27E-03	5,02E-09	4
H2aM12387N	590	77	6,79E+05	3,54E-03	5,21E-09	3
H3M12361N	425	39	4,95E+05	2,89E-03	5,85E-09	4
H2aM12452N	421	34	3,85E+05	2,69E-03	6,98E-09	4
H2aM12392N	626	68	4,47E+05	3,24E-03	7,25E-09	4
H2bM12454N	586	56	5,59E+05	5,91E-03	1,06E-08	2
H1M12362N	369	32	3,69E+05	7,20E-03	1,95E-08	2
H2bM13022N	395	31	3,11E+05	6,71E-03	2,15E-08	2
H1M12390N	440	38	4,19E+05	1,49E-02	3,56E-08	1
H2bM12385	642	44	2,71E+05	1,09E-02	4,00E-08	1
H2aM12394N	753	19	3,62E+04	2,77E-03	7,67E-08	4
H3M12366N	292	0	NB	NB	NB	NB
H4H11990P2	840	81	1,60E+05	1,98E-02	1,24E-07	0,6
H4H11997P2	899	74	1,32E+05	1,92E-02	1,45E-07	0,6
H4H11998P2	639	3	5,28E+05	9,17E-02	1,74E-07	0,1
H4H11996P2	704	46	1,08E+05	3,89E-02	3,61E-07	0,3
H4H11995P2	674	3	7,94E+04	1,28E-01	1,62E-06	0,1
H4H11992P2	889	30	6,60E+03	8,14E-02	1,23E-05	0,1
H4H11993P2	723	3	IC	IC	IC	IC

IC=незаклучительное связывание

NB=отсутствие связывания

Таблица 8: Параметры кинетики связывания для связывания ЕС петли 2 CD63 человека-hFC с моноклональными антителами против CD63 при 25°C

Антитело	Уровень связывания mAb (RU)	100 нМ связанный Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM12450N	592	134	3,20E+05	4,66E-05	1,50E-10	248

H2aM12395N	472	117	6,77E+05	5,10E-04	7,53E-10	23
H1M12451N	525	107	1,19E+05	8,40E-05	7,04E-10	138
H1M12386N	405	160	6,54E+05	1,13E-04	1,73E-10	102
H1M12388N	408	131	7,28E+05	1,73E-04	2,38E-10	67
H2aM12387N	532	164	8,54E+05	1,10E-04	1,29E-10	105
H3M12361N	367	83	4,41E+05	1,32E-04	2,99E-10	87
H2aM12452N	348	91	1,22E+05	2,28E-04	1,87E-09	51
H2aM12392N	595	169	5,10E+05	1,99E-04	3,91E-10	58
H2bM12454N	485	142	6,88E+05	3,60E-04	5,23E-10	32
H1M12362N	308	125	4,77E+05	3,99E-04	8,40E-10	29
H2bM13022N	350	117	4,60E+05	2,80E-04	6,10E-10	41
H1M12390N	418	150	5,23E+05	9,91E-04	1,89E-09	12
H2bM12385	536	121	5,92E+05	9,84E-04	1,66E-09	12
H2aM12394N	670	59	8,18E+04	1,44E-04	1,76E-09	80
H3M12366N	239	51	IC	IC	IC	IC
H4H11990P2	707	275	4,30E+05	8,99E-05	2,09E-10	128
H4H11997P2	819	291	4,17E+05	6,20E-05	1,49E-10	186
H4H11998P2	633	136	1,75E+05	4,53E-04	2,58E-09	26
H4H11996P2	628	257	4,61E+05	1,35E-04	2,92E-10	86
H4H11995P2	643	198	5,52E+05	5,55E-03	1,01E-08	2
H4H11992P2	743	304	6,41E+05	2,57E-04	4,01E-10	45
H4H11993P2	601	194	3,64E+05	7,28E-04	2,00E-09	16

IC=незаключительное связывание

Таблица 9: Параметры кинетики связывания для связывания ЕС петли 2 CD63 человека-hFC с моноклональными антителами против CD63 при 37°C

Антитело	Уровень связывания mAb (RU)	100 нМ связанный Ag (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM12450N	617	138	4,11E+05	4,89E-05	1,19E-10	236
H2aM12395N	535	123	5,29E+05	1,79E-03	3,38E-09	6
H1M12451N	597	118	6,51E+05	3,31E-04	5,09E-10	35
H1M12386N	455	170	9,21E+05	6,31E-04	6,85E-10	18
H1M12388N	462	158	1,03E+06	8,87E-04	8,63E-10	13
H2aM12387N	590	196	1,10E+06	6,57E-04	5,96E-10	18
H3M12361N	425	97	6,51E+05	3,70E-04	5,68E-10	31
H2aM12452N	421	104	7,79E+05	8,57E-04	1,10E-09	13
H2aM12392N	626	177	7,65E+05	4,45E-04	5,82E-10	26
H2bM12454N	586	160	8,68E+05	7,77E-04	8,95E-10	15
H1M12362N	369	118	6,85E+05	6,69E-04	9,77E-10	17
H2bM13022N	395	107	5,57E+05	5,62E-04	1,01E-09	21
H1M12390N	440	134	9,07E+05	4,95E-04	5,46E-10	23
H2bM12385	642	133	8,27E+05	1,70E-03	2,05E-09	7
H2aM12394N	753	67	3,27E+05	5,04E-04	1,54E-09	23
H3M12366N	292	0	NB	NB	NB	NB
H4H11990P2	840	338	4,82E+05	4,96E-05	1,04E-10	233

H4H11997P2	899	342	4,25E+05	1,91E-05	4,50E-11	603
H4H11998P2	639	111	3,18E+05	2,07E-03	6,50E-09	6
H4H11996P2	704	294	5,38E+05	1,42E-04	2,64E-10	81
H4H11995P2	674	116	1,29E+06	1,88E-02	1,45E-08	1
H4H11992P2	889	358	6,47E+05	6,82E-04	1,05E-09	17
H4H11993P2	723	156	5,77E+05	4,57E-03	7,92E-09	3

IC=незаключительное связывание

[0256] *Перекрестная конкуренция в Octet между различными моноклональными антителами против CD63*

[0257] Конкуренцию при связывании между панелью моноклональных антител против CD63 определяли с использованием безмаркерного анализа интерферометрии биослоя с детекцией в реальном времени на платформе биосенсора Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент проводили при 25°C в буфере 10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 3мМ ЭДТА и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества Tween-20, 1 мг/мл BSA, pH7,4 (HBS-EBT), при встряхивании планшета со скоростью 1000 об./мин. Для оценки того, способны ли 2 антитела конкурировать друг с другом за связывание с их соответствующими эпитопами на рекомбинантной ЕС петле 2 CD63 человека, экспрессированной с С-концевой меткой тус-тус-гексагистидин (ЕС петля 2 hCD63-MMH; SEQ ID: xx), приблизительно ~0,61 нМ ЕС петлю 2 hCD63-MMH сначала связывали с покрытыми антителом против Penta-His наконечниками биосенсора Octet (ForteBio Inc, # 18-5122) посредством погружения наконечников биосенсора на 3 минуты в лунки, содержащие раствор 20 мкг/мл ЕС петли 2 hCD63-MMH. Затем наконечники биосенсора со связанным антигеном насыщали первым моноклональным антителом против CD63 (впоследствии обозначенным как mAb-1) посредством погружения в лунки, содержащие раствор 50 мкг/мл mAb-1 на 210 секунд. Затем наконечники биосенсора погружали в лунки, содержащие раствор 50 мкг/мл раствор второго моноклонального антитела против CD63 (впоследствии обозначенным как mAb-2) на 120 секунд. Наконечники биосенсора промывали в буфере HBS-EBT между каждым стадиями эксперимента. Ответ связывания мониторировали в реальном времени на всем протяжении эксперимента, и ответ связывания в конце каждой стадии регистрировали. Ответ связывания mAb-2 с ЕС петлей 2 hCD63-MMH, предварительно образовавшей комплекс с mAb-1, сравнивали, и конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных антител против CD63 определяли, как показано в таблице 10.

Таблица 10. Перекрестная конкуренция между различными моноклональными антителами против CD63

mAb-1	mAb-2, конкурирующее с mAb-1
H1M12451N	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N

	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
	H3M12361N
H2aM12394N	H1M12451N
	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
	H3M12361N
H2aM12395N	H1M12451N
	H2aM12394N

	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
	H3M12361N
H2aM12450N	H1M12451N
	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
	H3M12361N
H2aM12452N	H1M12451N

	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
	H3M12361N
H3M12366N	H1M12451N
	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
	H3M12361N

H2bM12454N	H1M12451N
	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
H2bM13022N	H1M12451N
	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
H4H11992P2	H1M12451N

	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
H4H11993P2	H1M12451N
	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
H4H11995P2	H1M12451N
	H2aM12394N

	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
H4H11996P2	H1M12451N
	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
H4H11997P2	H1M12451N
	H2aM12394N
	H2aM12395N

	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
H4H11998P2	H1M12451N
	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
H4H11990P2	H2aM12387N
	H2aM12392N
	H1M12451N
	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N

	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
H1M12386N	H1M12451N
	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12390N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
H1M12390N	H1M12451N
	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H2aM12452N

	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H2aM12387N
	H2aM12392N
H2aM12387N	H1M12451N
	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H3M12366N
	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12392N
H2aM12392N	H1M12451N
	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H3M12366N

	H2bM12454N
	H2bM13022N
	H4H11992P2
	H4H11993P2
	H4H11995P2
	H4H11996P2
	H4H11997P2
	H4H11998P2
	H4H11990P2
	H1M12386N
	H1M12390N
	H2aM12387N
H3M12361N	H1M12451N
	H2aM12394N
	H2aM12395N
	H2aM12450N
	H2aM12452N
	H3M12366N

[0258] *Получение биспецифических антител для определения интернализации биспецифического комплекса, имеющего связывающее плечо против CD63*

[0259] Для оценки способности антител против CD63, полученных, как описано в этом примере, к интернализации в качестве части биспецифической антигенсвязывающей молекулы, антитела переконструировали в биспецифические форматы, где одно связывающее плечо представляло собой пару VH/VL антитела против CD63 (см. таблицу 1 исходных антител), и другое представляло собой не относящееся к делу связывающее плечо. Использовали стандартные способы получения биспецифических антител, и иллюстративные способы описаны, например, в Публикации патентной заявки США No. 2010/0331527, и в Патенте США No. US5731168, содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Биспецифические антитела тестировали по их способности к интернализации с использованием экспрессирующих CD63 человека клеток. Для анализа, клетки HEK293, эндогенно экспрессирующие CD63 человека, рассеивали при плотности 10000 клеток/лунку в DMEM, содержащей 10% FBS и пенициллин-стрептомицин/L-глутамин (Gibco, кат.# 10378016), в черные 96-луночные планшеты с прозрачным дном, покрытые поли-D-лизином (Greiner, кат.# 655946). Через двое суток, среды заменяли на свежие среды, содержащие биспецифические антитела против CD63 и отрицательное контрольное антитело в сериях 2-кратного разведения, начиная с 10 мкг/мл до 0,157 мкг/мл, вместе с контролем только со средой. Затем клетки инкубировали при 37°C в течение 3 часов, чтобы позволить интернализацию антитела. После инкубации, клетки промывали с использованием PBS, фиксировали в 4%

параформальдегиде (Thermo Scientific, кат.# 28908) в течение 20 минут при комнатной температуре, и затем подвергали пермеабиллизации с использованием 0,2% Triton X-100 (Spectrum Chemical, кат.# TR135) в 5% нормальной сыворотке козы (NGS) (Gibco, кат.# PCN5000) в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали либо с 2 мкг/мл Fab осла против IgG мыши с Alexa Fluor-647 (Manufacture, кат.#115-606-006), либо с 2 мкг/мл Fab козы против IgG человека с Alexa Fluor-647 (Jackson ImmunoResearch, кат.#115-606-006) в 5% NGS в течение 1 час при комнатной температуре. Раствор вторичного антитела удаляли, затем клетки промывали с использованием PBS, и затем свежий PBS, содержащий 2 капли/мл NucBlue (Invitrogen, кат. # R37605), добавляли для окрашивания ядер живых клеток. Интернализацию антитела и ядра визуализировали при 40х в системе для визуализации ImageXpress High-Content (Molecular Devices), и интернализацию антитела количественно оценивали с использованием прикладного модуля Transfluor программного обеспечения MetaXpress (Molecular Devices). Интернализацию антитела регистрировали как интегрированную интенсивность пикселей на клетку $\pm$ стандартное отклонение (SD).

[0260] Как показано в таблице 11, для всех из биспецифических антител, включающих одно плечо, связывающееся с CD63 человека (происходящее из любого из H1M12451, H2M12450 или H2M12395), и не относящееся к делу несвязывающее плечо, показана эффективная интернализация в клетки HEK293. Для биспецифического антитела, включающего одно связывающее плечо из mAb12450, показан более высокий уровень интернализации, чем для других тестируемых биспецифических антител.

Таблица 11: Интернализация биспецифических антител против CD63 клетками HEK293

	Интернализация антитела (интегрированная интенсивность пикселей) $\pm$ SD			
Концентрация антитела (мкг/мл)	H2M12395N, биспецифическое	H2M12450N, биспецифическое	H1M12451N, биспецифическое	Отрицательно контрольное Ab
10	1,05E+06 $\pm$ 4,56E+05	4,34E+06 $\pm$ 8,77E+05	8,26E+05 $\pm$ 2,67E+05	4,58E+03 $\pm$ 6,50E+03
5	1,07E+06 $\pm$ 4,06E+05	4,31E+06 $\pm$ 5,48E+05	5,45E+05 $\pm$ 5,20E+04	1,23E+03 $\pm$ 8,85E+02
2,5	2,73E+05 $\pm$ 6,01E+04	3,92E+06 $\pm$ 5,80E+05	3,27E+05 $\pm$ 1,06E+05	7,70E+02 $\pm$ 6,09E+02
1,25	1,89E+05 $\pm$ 6,61E+04	2,72E+06 $\pm$ 2,63E+05	1,20E+05 $\pm$ 3,91E+04	1,43E+03 $\pm$ 1,19E+03
0,625	2,03E+05 $\pm$ 9,37E+04	1,75E+06 $\pm$ 1,39E+05	7,87E+04 $\pm$ 1,07E+04	3,37E+03 $\pm$ 5,22E+03

0,3125	3,95E+04±8,23E+03	8,57E+05±1,60E+05	3,77E+04±1,22E+04	1,99E+03±2,19E+03
0,15625	2,81E+04±1,30E+04	2,42E+05±2,54E+04	7,23E+03±6,09E+03	1,87E+03±1,16E+03
0	3,72E+03±1,66E+03	8,21E+03±3,47E+03	1,66E+04±1,80E+04	1,10E+03±1,56E+03

Пример 2: Конструирование полинуклеотида ScFv против hCD63::GAA и вектора для генотерапии

[0261] Вирусы AAV2/8, кодирующие для экспрессии GAA человека (hGAA; SEQ ID NO:369) или одноцепочечный вариабельный фрагмент (ScFv) против CD63 человека, слитый на его С-конце с GAA человека (ScFv против hCD63-hGAA), получают с использованием стандартного способа тройной трансфекции (Gray et al. 2011; см. также «Production of recombinant adeno-associated viral vectors and use in vitro and in vivo administration», Current Protocols in Neuroscience, John Wiley & Sons, New York (1999), pp. 4.17.1-4.17.25, Vol 1). Для продукции, 1×10^7 клеток НЕК293 рассеивают в 15 см чашки. На следующие сутки клетки трансфицируют с использованием (А) либо 8 мкг контрольного вектора рAAV, содержащего специфический для печени энхансер серпина а 1 (SEQ ID NO:367) и кодирующего под контролем промотора TTR (SEQ ID NO:368) GAA человека, либо тестируемого рAAV, содержащего специфический для печени энхансер серпина а 1 (SEQ ID NO:367) и кодирующего под контролем промотора TTR (SEQ ID NO:368) hCD63 ScFv-hGAA (см., например, **фигуру 2**) и (В) происходящего из рAAV RC2/8 вектора (Gao, 2002) и 16 мкг рHelper (Agilent, кат. #240074) с использованием опосредованной PEIpro (Polyplus transfection, New York, NY каталожный # 115-100) трансфекции в соотношении 1:1 (1 мкл PEIpro: 1 мкг ДНК). Через семьдесят два часа после трансфекции, клетки собирают и лизируют в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl, 1 мМ MgCl₂, 2,5 мМ KCl, 100 мМ NaCl, с использованием стандартного способа замораживания-размораживания. Затем, бензоназу (Sigma, кат.# E1014-25KU) добавляют в образцы при конечной концентрации 0,5 ед./мкл, и затем инкубируют при 37°C в течение 60 минут. Вирусы очищают с использованием ультрацентрифугирования в градиенте йодиксанола, как описано в (Zolotukhin et al., 1999, Gene Ther 1999;6:973-985) и затем титруют посредством qПЦР.

[0262] Образцы AAV обрабатывают ДНКазой I (Thermofisher Scientific, кат. #EN0525) при 37°C в течение одного часа и лизируют с использованием набора реагентов для выделения ДНК DNA extract All Reagents (Thermofisher Scientific Cat# 4403319 (Thermofisher Scientific кат.# 4403319). Инкапсидированные вирусные геномы количественно оценивают с использованием системы для ПЦР с детекцией в реальном времени QuantStudio 3 (Thermofisher Scientific) с использованием праймеров, нацеленных на ITR AAV2. Последовательности праймеров для ITR AAV2 представляют собой 5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3' (прямой ITR; SEQ ID NO:370) и 5'-

CGGCCTCAGTGAGCGA-3' (обратный ITR; SEQ ID NO:371) (Aurnhammer et al., 2012), происходящие из последовательности левого внутреннего инвертированного повтора (ITR) из AAV (SEQ ID NO:365) и последовательности правого внутреннего инвертированного повтора (ITR) из AAV (SEQ ID NO:366), соответственно. Последовательность зонда для ITR AAV2 представляет собой 5'-6-FAM-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCG-TAMRA-3' (SEQ ID NO:372) (Aurnhammer C., Наазу М., Muether N., et al., 2012, Hum. Gene Ther. Methods 23, 18-28). После стадии активации при 95°C в течение 10 мин, проводят двухстадийный цикл ПЦР при 95°C в течение 15 секунд и 60°C в течение 30 секунд, в течение 40 циклов. Универсальную готовую смесь для ПЦР с TaqMan (Thermofisher Scientific, кат. #4304437) используют для qПЦР. ДНК плазмиды (Agilent, кат. #240074) используют в качестве стандарта для определения абсолютных титров.

[0263] В антителах против CD63 человека и слитых с ними белках используют переменные домены против CD63, указанные в таблице 1. Варианты ScFv антител клонируют с переменными доменами в порядке тяжелая-легкая цепь с линкером глицин-серин между ними (5'-VH-Gly-Ser-VL-3').

[0264] AAV, кодирующие мультидоменные терапевтические средства против scFv против hCD63::GAA, имеющие аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO:364 (ФИГ. 2), получали и тестировали по эффективности обеспечения заместительной ферментной терапии

Пример 3: Содержание гликогена в модели на мышах болезни Помпе после AAV

[0265] Для определения эффекта доставленного посредством AAV слитого белка ScFv против hCD63-GAA (SEQ ID NO:364), по сравнению с доставленным посредством AAV GAA, в соответствующей модели накопления гликогена *in vivo*, оба терапевтических средства доставляли в модели на мышах болезни Помпе, в которой мыши являются гомозиготными по делеции гена GAA мыши и являются гомозиготными по экспрессии CD63 человека вместо CD63 мыши на фоне штамма 75% C57BL/6; 25% 129SvJ. Эти мыши обозначены в настоящем описании как мыши CD63 HumIn GAA KO, или альтернативно, как мыши CD63hu/hu; GAA^{-/-}.

[0266] Для эксперимента, CD63 HumIn GAA KO в возрасте 2 месяца вводят посредством инъекции в хвостовую вену любой из вирусов AAV2/8, содержащий геном либо со специфическим для печени промотором TTR, контролирующим GAA человека (AAV-hGAA; описанный в примере 2), либо со специфическим для печени промотором TTR, контролирующим ScFv против CD63 человека, слитый на его C-конце с GAA человека (AAV-ScFv против hCD63-hGAA; описанный в примере 2). Оба вируса AAV2/8 доставляют в любой из двух доз, 1e10 г.в./мышь или 1e11 г.в./мышь. В качестве контроля, не подвергнутых лечению мышей CD63 HumIn GAA KO и не подвергнутых лечению мышей CD63 HumIn с интактным геном GAA включают в анализ. Мышей содержат в течение 3 месяцев после лечения и отбирают кровь в увеличивающемся объеме

(ежемесячно) на протяжении этого периода для измерений в сыворотке уровней GAA и антител против GAA. Через 3 месяца, всех мышей умерщвляют, и индивидуальные ткани собирают для измерений гликогена, окрашивания PAS-Н, количественной оценки центральных ядер, измерения пролиферации лизосом и измерения экспрессии LC3b. Экспериментальные протоколы дозирования и лечения для групп мышей показаны в таблице 12.

Таблица 12: Экспериментальный протокол дозирования и лечения для групп мышей

Группа	Мыши	Количество мышей	Лечение	Доза
1	CD63 HumIn GAA KO	4	Нет	N/A
2	CD63 HumIn GAA KO	4	AAV-hGAA	1e10 г.в./мышь
3	CD63 HumIn GAA KO	4	AAV-hGAA	1e11 г.в./мышь
4	CD63 HumIn GAA KO	5	AAV-ScFv против hCD63-hGAA	1e10 г.в./мышь
5	CD63 HumIn GAA KO	4	AAV-ScFv против hCD63 ScFv-hGAA	1e11 г.в./мышь
6	CD63 HumIn GAA WT	2	None	N/A

Пример 4: Иммунологический ответ на GAA

[0267] Для измерения уровней в сыворотке антитела против GAA человека, сыворотку из всех групп лечения выделяют из крови, собранной в ходе терминального отбора крови, с использованием пробирок для отделения сыворотки (BD Biosciences, кат.#365967), согласно спецификациям производителя. Отдельно, 96-луночные планшеты с высоким связыванием белка (ThermoFisher, кат.#15041) покрывают с использованием 20 мкг hGAA (R&D Systems, кат.#8329-GH-025), разведенного в PBS, в течение ночи. Планшеты промывают с использованием PBS+0,05% Tween (PBS-T) 3 раза. Планшеты блокируют с использованием 0,5% BSA в PBS-T, и серийные разведения мышинной сыворотки, лежащие в диапазоне от 1:300 до 1:5,1e7, добавляют в планшет на ночь. Общее количество антител против IgG мыши (подклассы 1+2a+2b+3) измеряют с использованием конъюгированного с HRP антитела козы против IgG мыши (Jackson Immuno Research, кат.# 115-035-164) и набора субстратов BD Opt EIA. Колориметрические реакции останавливают с использованием 1 Н фосфорной кислоты. Затем оптическую плотность считывают при 450 нм в считывателе для планшетов Spectramax i3 (Molecular Devices). Кривые разведения приводят в соответствие с сигмоидными кривыми, и титры рассчитывают по кривым.

[0268] В проводимых сходным образом экспериментах, более высокие уровни GAA или scFv против hCD63::GAA (SEQ ID NO:364) после введения AAV коррелировали с более низкими титрами антител против GAA (данные не представлены). Сыворотку мышей GAA нуль, подвергнутых лечению с использованием высоких или низких титров

AAV-scFv против hCD63::GAA (SEQ ID NO:364) или AAV-GAA, оценивали по антителам против GAA на протяжении трех месяцев после инъекции. Наблюдали отрицательную корреляцию между титром антитела и воздействием GAA на сыворотку, и обратную корреляцию между дозами конструкции и титром антител против GAA (данные не представлены).

Пример 5: GAA в сыворотке

[0269] Для измерения уровней в сыворотке GAA человека в ходе эксперимента, образцы собирают в ежемесячных временных точках посредством отбора крови из хвоста. Сыворотку выделяют из крови с использованием пробирок для отделения сыворотки (BD Biosciences, кат.# 365967), согласно спецификациям производителя. Затем 1 мкл выделенной сыворотки наносят в предварительно залитый гель 4-20% Novex wedgewell, разделяют при 220 В в течение 45 минут и переносят на нитроцеллюлозную мембрану при 200 мА в течение 1 часа с использованием стандартных способов. Затем нитроцеллюлозную мембрану анализируют с использованием в качестве зонда первичного антитела GAA (Abcam, #ab137068), использованного в разведении 1:2000, и антитела против GAPDH (Abcam, #AB9484), использованного в разведении 1:1000, в 12 мл, и инкубируют в течение ночи при 4°C. После инкубации с первичным антителом, мембрану промывают три раза с использованием 1 x TBST в течение 5 минут на промывку. Вторичные антитела против IgG кролика (LiCor, 926-32211) и против IgG мыши (LiCor, 925-68070) (LiCor, Lincoln, NE), в разведении 1:15000 в 12 мл, затем добавляют к мембране и инкубируют в течение 1 час при комнатной температуре. После инкубации с вторичным антителом, мембрану промывают два раза с использованием 1 x TBST в течение 5 минут на промывку, и один раз с использованием 1 x TBS в течение 5 минут. Затем мембрану визуализируют и количественно оценивают с использованием устройства LiCor Odyssey (LI-COR Biotechnology).

[0270] В экспериментах, сходных с описанными выше, для мышей CD63 HumIn GAA KO, подвергнутых лечению с использованием высокой дозы (10^{11} г.в./мышь) AAV-ScFv против hCD63 -hGAA (SEQ ID NO:364) или AAV-hGAA, показаны значительные уровни GAA в сыворотке на протяжении эксперимента (данные не представлены).

[0271] Проводили количественные оценки, посредством ПЦР с детекцией в реальном времени, экспрессии, в лизатах печени, сердца и квадрицепсов через 3 месяца после инъекции. Экспрессию в печени детектировали для всех инъекций конструкции AAV, и проводили также сравнение уровня в сыворотке GAA с уровнем экспрессии РНК GAA. Данные (не показаны) позволяют предполагать, что для AAV, кодирующего слитый белок, указанный как SEQ ID NO:364 (и экспрессии, контролируемой специфическим для печени промотором), получают улучшенный профиль секреции для GAA.

Пример 6: Измерение гликогена в ткани и гистологическая характеристика тканей мышц

[0272] Измерение гликогена в ткани: Для измерения содержания гликогена в индивидуальных тканях, ткани сердца, квадрицепса, икроножной мышцы, диафрагмы,

камбаловидной мышцы и EDL вырезают у мышей из всех групп немедленно после асфиксии CO₂, и затем мгновенно замораживают в жидком азоте и хранят при -80°C. ~50 мг каждой ткани лизируют в настольном гомогенизаторе с использованием бусин из нержавеющей стали в дистиллированной воде в соотношении 1 мг на 25 мкл воды для измерений гликогена. Лизаты для анализа гликогена нагревают при 105° в течение 15 минут и центрифугируют при 21000 x g для очистки от дебриса. Измерения гликогена проводят с использованием набора для анализа гликогена (Sigma-Aldrich, #MAK016), согласно инструкциям производителя для флуориметрических анализов. Флуоресценцию каждого образца измеряют при возбуждении при 535 нм и излучении при 587 нм в флуоресцентном считывателе для планшетов (Molecular Devices, Spectramax i3). Расчетное количество гликогена рассчитывают с использованием следующей формулы, представленной производителем.

[0273] Сбор квадрицепсов для гистопатологии и количественной оценки: Образцы ткани квадрицепсов от мышей из каждой группы, кроме группы лечения низкой дозой (1e10 г.в./мышь) либо мгновенно замораживают немедленно после вырезания в жидком азоте и хранят при -80°C для количественной оценки экспрессии LC3b, либо помещают в блоки, содержащие среду O.C.T (Tissue-Tek, #4583).

[0274] Образцы ткани в среде O.C.T посылают в Histoserv, Inc (Germantown, MD) для получения срезов и окрашивания шифтовой периодной кислотой (PAS) для детекции полисахаридов. Дополнительные срезы получают и возвращают для окрашивания центральных ядер и пролиферации лизосом.

[0275] Окрашивание PAS: Окрашенные PAS срезы визуализируют с использованием сканера для предметных стекол Leica при 20x увеличении.

[0276] Количественная оценка центральных ядер и пролиферации лизосом: Неокрашенные срезы от Histoserv извлекают из морозильника и затем фиксируют 4% параформальдегидом в PBS в течение 15 минут в камере для окрашивания. Затем фиксированные стекла промывают два раза в течение 5 минут в PBS, и затем инкубируют с блокирующим буфером (eBiosciences, 00-4953-54) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем стекла окрашивают с использованием любого из антитела крысы против Lamp-1 (Abcam, #AB25245) в разведении 1:50 в блокирующем буфере, антитела кролика против ламинина (Sigma, #L9393) в разведении 1:1000 в блокирующем буфере, или блокирующего буфера без добавления антитела, в увлажненной камере для окрашивания, и затем переносят на 4°C для инкубации в течение ночи. На следующие сутки, стекла затем промывают два раза в течение 5 минут в PBS и затем окрашивают с использованием либо суперклонального вторичного антитела козы против IgG (H+L) кролика, конъюгированного с Alexa Fluor 647 (Life Tech Thermo, #A27040), либо очищенного перекрестной адсорбцией вторичного антитела козы против IgG (H+L) крысы, конъюгированного с Alexa Fluor 555 (Life Tech Thermo, #A21434), в камере для окрашивания, затем позволяют инкубацию в течение 1 час при комнатной температуре. Затем окрашенные стекла промывают два раза в течение 5 минут в PBS перед их

фиксацией с использованием Fluoromount-G с DAPI (Life Tech Thermo, #00-4959-52) и визуализацией в устройстве Zeiss LSM710 (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Число централизованных ядер количественно оценивают с использованием программного обеспечения Halo (Indica Labs, NM)

[0277] Количественная оценка экспрессии LC3b: Для количественной оценки экспрессии LC3b, мгновенно замороженные образцы размораживают, гомогенизируют и затем лизируют в буфере RIPA в соотношении 1 мг ткани на 25 мкл буфера RIPA (150 mM NaCl, 1,0% IGEPAL[®] CA-630, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS, 50 mM Трис, pH 8,0, Sigma Aldrich, R0278) посредством столкновения с бусинами в течение 45 секунд (MP Biomedical). Лизаты очищают от нерастворимого материала посредством центрифугирования при 21000 x g, и затем 300 мкг лизата в буфере RIPA наносят в предварительно залитый гель 4-20% Novex wedgewell, переносят на нитроцеллюлозную мембрану и анализируют посредством вестерн-блоттинга с использованием способа, сходного с описанным ранее для анализа уровней в сыворотке GAA, с использованием первичного антитела, узнающего LC3b-I и LC3b-II мыши (Sigma, #L7543), вместо первичного антитела против GAA. Затем мембрану визуализировали и количественно оценивали с использованием устройства LiCor Odyssey (LI-COR Biotechnology). Уровни LC3b-I и LC3b-II выражали как (среднее +/- стандартное отклонение) в условных единицах.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против CD63 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в таблице, или конкурирует за связывание с CD63 человека с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в таблице 1.

2. Антитело против CD63 или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где эталонное антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, указанных как SEQ ID NO: 2/10, SEQ ID NO: 18/26, SEQ ID NO: 34/42, SEQ ID NO: 50/58, SEQ ID NO: 66/74, SEQ ID NO: 82/90, SEQ ID NO: 98/106, SEQ ID NO: 114/122, SEQ ID NO: 130/138, SEQ ID NO: 146/154, SEQ ID NO: 162/170, SEQ ID NO: 178/186, SEQ ID NO: 194/202, SEQ ID NO: 210/218, SEQ ID NO: 226/234, SEQ ID NO: 242/250, SEQ ID NO: 258/266, SEQ ID NO: 274/282, SEQ ID NO: 290/282, SEQ ID NO: 298/282, SEQ ID NO: 306/282, SEQ ID NO: 314/282, SEQ ID NO: 322/282 и SEQ ID NO: 330/282.

3. Антитело против CD63 или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или п.2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же самым эпитопом на CD63 человека, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в таблице 1.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же самым эпитопом на CD63 человека, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, SEQ ID NO: 18/26, SEQ ID NO: 34/42, SEQ ID NO: 50/58, SEQ ID NO: 66/74, SEQ ID NO: 82/90, SEQ ID NO: 98/106, SEQ ID NO: 114/122, SEQ ID NO: 130/138, SEQ ID NO: 146/154, SEQ ID NO: 162/170, SEQ ID NO: 178/186, SEQ ID NO: 194/202, SEQ ID NO: 210/218, SEQ ID NO: 226/234, SEQ ID NO: 242/250, SEQ ID NO: 258/266, SEQ ID NO: 274/282, SEQ ID NO: 290/282, SEQ ID NO: 298/282, SEQ ID NO: 306/282, SEQ ID NO: 314/282, SEQ ID NO: 322/282 и SEQ ID NO: 330/282.

5. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая первый антигенсвязывающий домен, конкурирующий за связывание с CD63 человека с выделенным антителом против CD63 или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-4, и второй антигенсвязывающий домен, связывающий антиген-мишень.

6. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.5, где антиген-мишень представляет собой опухолеассоциированный антиген.

7. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.5 или п.6, где первый антигенсвязывающий домен не связывается с клетками человека, экспрессирующими CD63, но не антиген-мишень, например, связывается только с клетками человека, экспрессирующими как CD63, так и антиген-мишень.

8. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 5-7, где каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена является полностью человеческим.

9. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 5-8, где антигенсвязывающая молекула связывает как CD63 человека, так и человеческий антиген-мишень, экспрессированные на клетке, и индуцирует интернализацию CD63 и/или деградацию человеческого антигена-мишени в этой клетке.

10. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 5-9, где антитело не подвергается интернализации клетками, которые экспрессируют CD63 человека, но не экспрессируют человеческий антиген-мишень.

11. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 5-10, где антитело является полностью человеческим.

12. Биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из пп. 5-11, где первый антигенсвязывающий домен связывает CD63 человека с низкой аффинностью связывания, так что антитело не связывается с клетками, экспрессирующими только CD63 человека, но связывается с клетками, экспрессирующими как CD63 человека, так и антиген-мишень.

13. Мультидоменный терапевтический белок, содержащий антитело против CD63 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4 и домен фермента.

14. Мультидоменный терапевтический белок по п.13, где домен фермента содержит GAA или его биологически активную часть.

15. Мультидоменный терапевтический белок по п.13 или п.14, содержащий аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO:364.

16. Полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую антитело против CD63 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 5-12, или мультидоменный терапевтический белок по любому из пп. 13-15.

17. Полинуклеотид по п.16, где нуклеотидная последовательность представляет собой AAV вектор, кодирующий мультидоменный терапевтический белок по любому из пп. 13-15.

18. Полинуклеотид по п.16 или п.17, где нуклеотидная последовательность дополнительно содержит последовательность, указанную как SEQ ID NO:365 и SEQ ID NO:366.

19. Полинуклеотид по любому из пп. 16-18, где нуклеотидная последовательность дополнительно содержит специфический для печени энхансер и/или специфический для печени промотор.

20. Полинуклеотид по п.19, где специфический для печени энхансер содержит последовательность, указанную как SEQ ID NO:367, и/или специфический для печени промотор содержит последовательность, указанную как SEQ ID NO:368.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против CD63 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 5-12, мультидоменный терапевтический белок по любому из пп. 13-15 или полинуклеотид по любому из пп. 16-20 и фармацевтически приемлемый носитель.

22. Соединение, содержащее антитело против CD63 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по любому из пп. 5-12, мультидоменный терапевтический белок по любому из пп. 13-15 или полинуклеотид по любому из пп. 16-20, для применения в медицине.

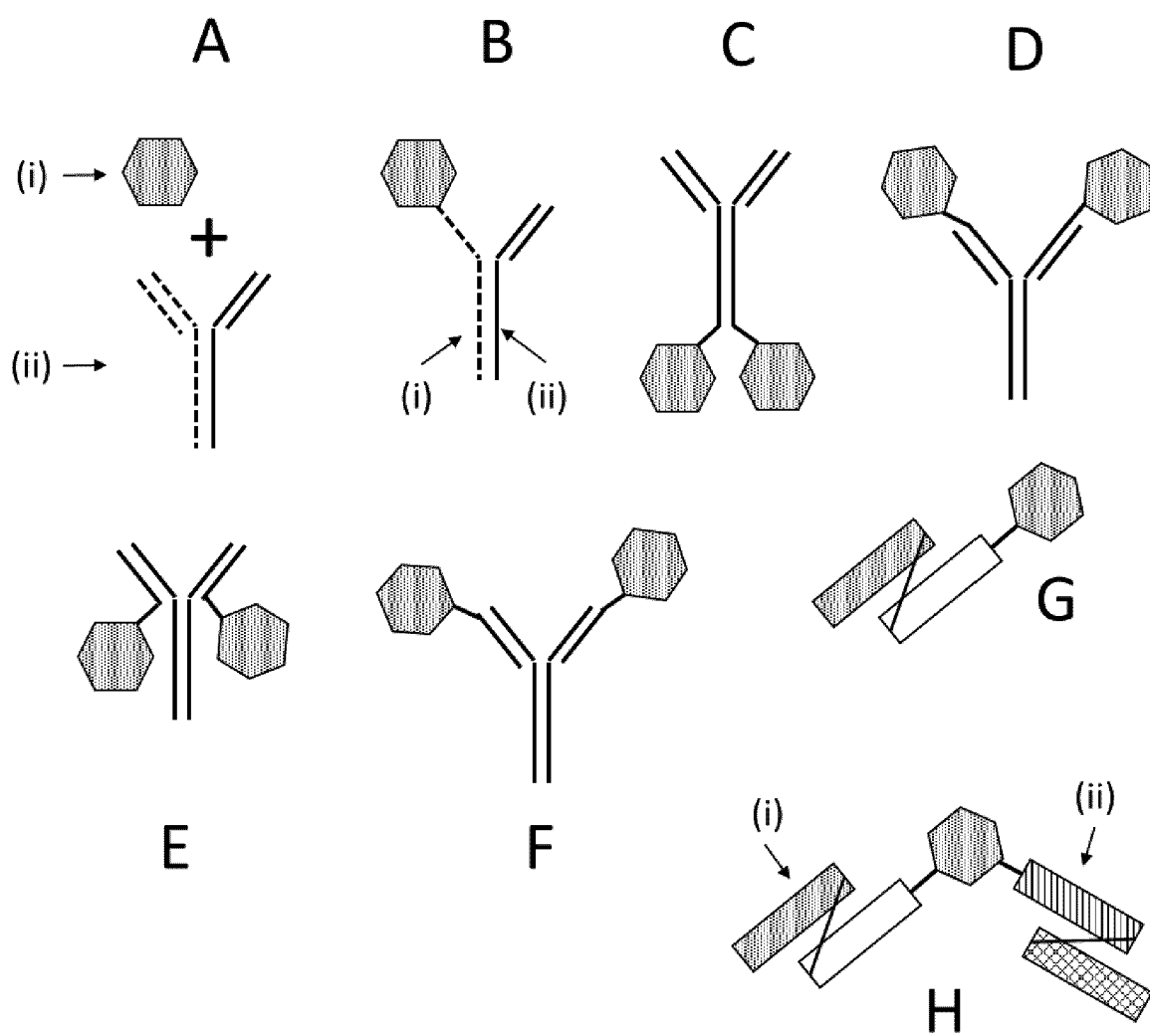
23. Соединение по п.22, для применения в лечении связанного с CD63 нарушения.

24. Соединение по п.23, где связанное с CD63 нарушение выбрано из группы, состоящей из зависимых от тучных клеток (MC-) заболеваний, ревматоидного артрита, зависимых от IgE аллергических реакций и опосредованной Fc-ER1 аллергической реакции, астмы, злокачественной опухоли и/или метастазирования.

25. Соединение по п.22 для применения в идентификации и/или выделении экзосом.

По доверенности

ФИГ.1



ФИГ.2

ITR	(Необязательный) Специфический для печени энхансер	(Необязательно, специфический для печени) промотор	Сигнальный пептид	scFv против CD63	GAA	полиА	ITR
-----	---	---	----------------------	------------------------	-----	-------	-----