

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092849** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.16

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.05.21

(54) МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ И МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К TMEFF2 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/675,957

(32) 2018.05.24

(33) US

(86) PCT/IB2019/054184

(87) WO 2019/224713 2019.11.28

(88) 2020.01.02

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Купер Филип, Эрнст Робин,
Ганезан Раджкumar, Кейн Коллин,
Расселл Майкл, Сингх Санджайа,
Венкатарамани Сатядеви, У Шэн-
Джун (US)

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

(57) Предложенное в настоящем изобретении описание относится к моноспецифическим и мультиспецифическим антителам к TMEFF2 и способам получения и применения описанных антител.

25 EVQLLESGGGLVQR-GGSLRPSCAASGFTFS
27 EVQLLESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGFTFS
87 EVQLLESGGGLVQP-GGSLRLSCAASGFTFS
89 EVQLLESGGGLVQP-GGSLRLSCAASGFTFS

25 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGGGFTDY
27 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGGGFTSY
87 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGGGFTDY
89 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGGGFTDY

25 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAED
27 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAED
87 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED
89 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAED

25 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLVTVSS
27 TAFYYCARMPLNSPHDCWGQGLVTVSS
87 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLVTVSS
89 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLVTVSS

202092849

A1

A1

202092849

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565838EA/085

МОНОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ И МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К TMEFF2 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 31 января 2019 г., называется JBI5160WOPCT1_SL.txt и имеет размер 144156 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Предложенное в настоящем документе описание относится к моноспецифическим и мультиспецифическим антителам к TMEFF2 и способам получения и применения описанных антител.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Рак предстательной железы является вторым по распространенности видом рака у мужчин во всем мире и шестой ведущей причиной смерти связанной с раком. Во всем мире ежегодно регистрируется приблизительно 1100000 новых случаев заболевания и 300000 смертельных исходов, что составляет 4 процента всех случаев смерти по причине рака. Согласно оценкам ожидается, что из каждых 6 мужчин у 1 будет диагностировано данное заболевание в течение его жизни. Риск рака предстательной железы сильно коррелирует с возрастом: около трех четвертей случаев у мужчин старше 65 лет, при этом наибольшее число случаев у тех, кто находился в возрасте старше 70-74 лет. По оценкам патологоанатомических данных около половины мужчин в возрасте от 50 и 80% мужчин в возрасте 80 лет имеют гистологические признаки рака предстательной железы. На ранних стадиях 5-летняя выживаемость приближается к 100%. Однако при метастазировании рака 5-летняя выживаемость снижается до 28%, и сохраняется потребность в эффективных способах лечения рака предстательной железы на поздней стадии.

Депривационная терапия тестикулярным андрогеном, как правило, приводит к стабилизации или регрессии заболевания (у 80% пациентов). Текущие способы лечения рака предстательной железы включают хирургическое вмешательство, лучевую терапию и гормональную терапию. Как правило, к гормональной терапии последовательно добавляют противораковую вакцину сипулейцел-Т, радиофармацевтический агент (такой как хлорид радия-223), вторичные гормональные терапевтические средства (такие как абиратерон или энзалутамид) и/или химиотерапевтические средства (доцетаксел и кабазитаксел). Хотя каждый из этих методов лечения может задержать рост рака на несколько месяцев и облегчить симптомы, вызванные заболеванием, в конечном итоге развивается метастатический рак предстательной железы. Если раковые заболевания предстательной железы растут, несмотря на снижение уровней тестостерона посредством гормональной терапии, варианты лечения ограничены.

Таким образом, существует потребность в разработке дополнительных

терапевтических средств для лечения рака предстательной железы.

Изложение сущности изобретения

В изобретении предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с мембранной проксимальной областью SEQ ID NO: 110 в TMEFF2.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с эталонным антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 25 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 28, VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88 или VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается в пределах остатков HGKCEHSINMQEPSC (SEQ ID NO: 57) или DAGYTGQHCCKDYSL (SEQ ID NO: 58) с мембранной проксимальной областью TMEFF2.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2, имеющее определенные последовательности определяющих комплементарность областей тяжелой цепи и легкой цепи, как описано в настоящем документе.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2, имеющее последовательности переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи, как описано в настоящем документе.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2, имеющее определенные последовательности тяжелой и легкой цепей, как описано в настоящем документе.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно;

VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28; и/или

HC с SEQ ID NO: 32 и VL с SEQ ID NO: 35.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно;

VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29; и/или

HC с SEQ ID NO: 33 и VL с SEQ ID NO: 36.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его

антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно;

VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30; и/или

HC с SEQ ID NO: 34 и VL с SEQ ID NO: 37.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно;

VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31; и/или

HC с SEQ ID NO: 33 и VL с SEQ ID NO: 38.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно;

VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88; и/или

HC с SEQ ID NO: 91 и VL с SEQ ID NO: 92.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно;

VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90; и/или

HC с SEQ ID NO: 93 и VL с SEQ ID NO: 94.

В изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, кодирующий VH антитела к TMEFF2 с SEQ ID NO: 25, 26, 27, 87 или 89 и/или VL с SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 88 или 90, или содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101 или 102.

В настоящем изобретении также предложен вектор, содержащий полинуклеотид настоящего изобретения.

В изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор по изобретению.

В изобретении также предложен способ получения антитела к TMEFF2 или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях, когда антитело или антигенсвязывающий фрагмент экспрессируется, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, продуцируемого клеткой-хозяином.

В изобретении также предложен способ лечения TMEFF2-положительного рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного антитела к TMEFF2 или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению субъекту, подлежащему лечению TMEFF2-положительного рака.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, связывающееся с антителом к TMEFF2 по изобретению.

В изобретении также предложен набор, содержащий антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем антитело связывается с мембранной проксимальной областью с SEQ ID NO: 110 в TMEFF2.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело конкурирует за связывание с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с эталонным антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 25 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 28, VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88 или VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело связывает эпитоп с SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 58 на TMEFF2.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первую тяжелую цепь (HC1) с SEQ ID NO: 32, первую легкую цепь (LC1) с SEQ ID NO: 35, вторую тяжелую цепь (HC2) с SEQ ID NO: 76 и вторую легкую цепь (LC2) с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который

связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 32, LC1 с SEQ ID NO: 35, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 36, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 36, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент

содержит HC1 с SEQ ID NO: 34, LC1 с SEQ ID NO: 37, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 34, LC1 с SEQ ID NO: 37, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 38, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 38, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2,

HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 91, LC1 с SEQ ID NO: 92, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 91, LC1 с SEQ ID NO: 92, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 93, LC1 с SEQ ID NO: 94, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 93, LC1 с SEQ ID NO: 94, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В изобретении также предложен полинуклеотид, кодирующий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

В изобретении также предложен способ получения биспецифического антитела к TMEFF2/CD3, включающий культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях при которых экспрессируется антитело, и выделение и очистку биспецифического антитела к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента, продуцируемого клеткой-хозяином.

В изобретении также предложен способ получения биспецифического антитела к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий:

объединение моноспецифического двухвалентного антитела TMEFF2, имеющего две идентичные HC1 и две идентичные LC1, и моноспецифического двухвалентного антитела CD3, имеющего две идентичные HC2 и две идентичные LC2, в смеси с молярным соотношением около 1:1;

введение в смесь восстанавливающего агента;

инкубирование смеси в течение от приблизительно девяноста минут до приблизительно шести часов;

удаление восстанавливающего агента; и

очистку биспецифического антитела к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента, которое содержит HC1, LC1, HC2 и LC2.

В изобретении также предложен способ лечения TMEFF2-положительного рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению субъекту, подлежащему лечению TMEFF2-положительного рака.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, которое связывается с биспецифическим антителом к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению.

В изобретении также предложен набор, содержащий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 по изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На ФИГ. 1 показано выравнивание выбранных переменных областей тяжелой цепи (VH) антитела к TMEFF2. Области VH идентифицированы по их SEQ ID NO: в начале каждой строки.

На ФИГ. 2 показано выравнивание выбранных переменных областей легкой цепи (VL) антитела к TMEFF2. Области VH идентифицированы по их SEQ ID NO: в начале каждой строки.

На ФИГ. 3 показано уничтожение клеток LnCaP с течением времени, измеренное по повышенной активности каспазы 3/7 для выбранных биспецифических антител к

TMEFF2/CD3.

На ФИГ. 4 показано уменьшение среднего объема опухоли со временем после имплантации опухоли посредством выбранных биспецифических антител к TMEFF2/CD3 в модели рака предстательной железы LnCaP *ex vivo* у самцов мышей NGS.

На ФИГ. 5 А показано уменьшение среднего объема опухоли у каждой мыши, получавшей 0,5 мг/кг TMCB93, в модели рака предстательной железы *ex vivo* LnCaP у самцов мышей NGS.

На ФИГ. 5 В показано уменьшение среднего объема опухоли у каждой мыши, получавшей 0,5 мг/кг TMCB132, в модели рака предстательной железы LnCaP у самцов мышей NGS.

На ФИГ. 6 показана эффективность TMEB762xCD3B376 у установленных ксенотрансплантатов LNCaP у гуманизированных Т-клетками мышей NSG.

На ФИГ. 7 показана Т-клеточная активация в раковых клетках предстательной железы LnCaP в ответ на введение TMCB132.

На ФИГ. 8 показана опосредованная Т-клетками цитотоксичность TMCB132.

На ФИГ. 9 показана противоопухолевая эффективность TMCB132 у гуманизированных Т-клетками мышей.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Все публикации, включая, без ограничений, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном описании, включены в настоящий документ путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе.

Следует понимать, что применяемые в настоящем документе термины предназначены только для цели описания конкретных вариантов осуществления и не имеют ограничительного характера. Все применяемые в настоящем документе технические и научные термины, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное обычному специалисту в области, к которой относится изобретение.

В настоящем документе описаны иллюстративные способы и материалы, хотя при практическом осуществлении для проверки настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе. При описании и изложении формулы настоящего изобретения будут применяться следующие термины.

При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если содержание текста ясно не указывает на иное. Так, например, ссылка на «клетку» включает в себя комбинацию двух или более клеток и т. п.

Если из контекста явно не следует иное, в данном описании и формуле изобретения слова «содержать», «содержащий» и т. п. следует толковать в охватывающем смысле, в отличие от исключающего или исчерпывающего смысла; то есть в смысле «включая, без ограничений».

Термины «специфическое связывание», или «специфически связывает», или

«связывает» относятся к связыванию антитела с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем с другими антигенами. Как правило, антитело связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой диссоциации (K_D) около 5×10^{-8} М или менее, например, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее или около 1×10^{-12} М или менее, как правило, с K_D , которая по меньшей мере в сто раз ниже его K_D связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином). Константу диссоциации можно измерить с использованием описанных в настоящем документе протоколов. Однако антитела, которые связываются с антигеном или эпитопом в пределах антигена, могут иметь перекрестную реактивность к другим родственным антигенам, например к такому же антигену от других биологических видов (гомологов), например человека или обезьяны, например *Macaca fascicularis* (яванского макака) или *Pan troglodytes* (шимпанзе). Если моноспецифическое антитело связывает один антиген или один эпитоп, биспецифическое антитело связывает два разных антигена или два разных эпитопа.

Термин «антитела» подразумевается в широком значении и включает в себя молекулы иммуноглобулинов, включая моноклональные антитела, в том числе мышинные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, мультиспецифические антитела, такие как биспецифические, триспецифические, тетраспецифические, и т.д., димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности. «Полноразмерные антитела» состоят из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), между которыми расположены каркасные области (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от аминок- к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

«Области, определяющие комплементарность (CDR)» представляют собой области антител, которые связываются антиген. CDR можно определить с помощью различных схем, например, по Кабат (Wu et al. (1970) J Exp Med 132: 211-50) (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Чотиа (Chothia et al. (1987) J Mol Biol 196: 901-17), IMGT (Lefranc *et al.* (2003) Dev Comp Immunol 27: 55-77) и AbM (Martin and Thornton (1996) J Biomol Biol 263: 800-15). Описано соответствие между различными схемами и нумерациями вариабельных областей (см., например, Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27: 55-77; Honegger and

Pluckthun, (2001) *J Mol Biol* 309:657-70; база данных International ImMunoGeneTics (IMGT); Веб-ресурсы, www.imgt.org). Для разметки CDR можно использовать доступные программы, такие как abYsis от UCL Business PLC. Используемые в настоящем документе термины «CDR», «HCDR1», «HCDR2», «HCDR3», «LCDR1», «LCDR2» и «LCDR3» включают в себя CDR, определенные любым из способов, описанных выше, по Кабат, Чотиа, IMGT или AbM, если в описании явным образом не указано иное.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина могут относиться к пяти основным классам - IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ).

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая связывает антиген. Антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой синтетические, ферментативно получаемые или модифицированные методами генной инженерии полипептиды, и они включают в себя VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, F(ab')₂, Fd и Fv, доменные антитела (dAb), состоящие из одного домена VH или одного домена VL, вариабельные домены IgNAR акулы, адаптированные к верблюду VH-домены, минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих CDR-области антитела, например участки FR3-CDR3-FR4, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, а также LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3. Домены VH и VL могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL могут объединяться в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструктами антител с образованием моновалентного антигенсвязывающего сайта, такими как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных патентных публикациях № WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804 и WO1992/01047.

Термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из по существу гомогенной популяции молекул антител, т. е. индивидуальных антител, составляющих популяцию, идентичных за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление С-концевого лизина из тяжелой цепи антитела или посттрансляционные модификации, такие как изомеризация или деамидирование аминокислот, окисление метионина или аспарагина или деамидирование глутамина. Моноклональные антитела обычно связывают один антигенный эпитоп. Биспецифические моноклональные антитела связываются с двумя разными антигенными эпитопами. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, например биспецифическим, а также моновалентным, двухвалентным или мультивалентным.

Термин «выделенный» относится к однородной популяции молекул (таких как синтетические полинуклеотиды или белок, такой как антитело), которые были по существу отделены и/или очищены от других компонентов той системы, в которой данные молекулы формировались, такой как рекомбинантная клетка, а также к белку, который был подвергнут по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не содержит иных клеточных материалов и/или химических веществ, и охватывает антитела, которые выделены с более высокой чистотой, такой как 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% чистотой.

Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, в котором по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, а по меньшей мере один каркас получен из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может включать в себя замены в каркасных областях, в результате чего каркасы могут не являться точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или человеческих генных последовательностей зародышевой линии.

Термин «человеческое антитело» относится к антителу, которое оптимизировано для обеспечения минимального иммунного ответа при введении человеческому индивиду. Вариабельные области человеческого антитела получены из последовательностей иммуноглобулинов человека. Если антитело человека содержит константную область или часть константной области, то константная область также получена из последовательностей иммуноглобулинов человека. Человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи, которые «получены из» последовательностей человеческого происхождения, если вариабельные области антитела человека получены из системы, в которой используется человеческий иммуноглобулин зародышевого типа или перестроенные гены иммуноглобулина. Такими примерами систем являются библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенные животные, отличные от человека, такие как мыши или крысы, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов. «Человеческое антитело», как правило, содержит аминокислотные отличия по сравнению с иммуноглобулинами, экспрессируемыми у людей, из-за различий между системами, используемыми для получения антител человека и локусов человеческих иммуноглобулинов, внедрения соматических мутаций, намеренного введения замен в каркасные участки или CDR, или во все из них. Как правило, «человеческое антитело» по аминокислотной последовательности по меньшей мере на около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой генами иммуноглобулина человеческой зародышевой линии или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях «человеческое антитело» может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов каркасных последовательностей человека, например, как описано в Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86, или

синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемых на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96 и международной патентной публикации № WO2009/085462.

Антитела с по меньшей мере одной CDR получены из видов, отличных от человека, не подходят под определение антитела человека.

Термин «рекомбинантный» относится к ДНК, антителам и другим белкам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными методами, когда сегменты из разных источников соединены с получением рекомбинантной ДНК, антител или белков.

Термин «эпитоп» означает часть антигена, с которым специфически связывается антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных группировок фрагментов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и могут иметь конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из непрерывных и/или прерывающихся аминокислот, образующих конформационное пространственное звено. В случае прерывающегося эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в 3-мерном пространстве посредством сворачивания молекулы белка.

Термин «биспецифический» относится к антителу, которое специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа в пределах одного антигена. Биспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca cynomolgus* (яванский макак, крабод) или *Pan troglodytes* или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термин «мультиспецифический» относится к антителу, которое специфически связывается с двумя или более разными антигенами или двумя или более разными эпитопами в пределах одного антигена. Мультиспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, крабод) или *Pan troglodytes* или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термин «вариант» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификациями, например одной или более заменами, вставками или делециями.

Термин «вектор» относится к полинуклеотиду, который способен к удвоению внутри биологической системы, или может быть перемещен между такими системами. Векторные полинуклеотиды обычно содержат некоторые функциональные элементы, такие как точки начала репликации, сигналы полиаденилирования или селективные маркеры, служащие для облегчения дупликации или поддержания данных полинуклеотидов в биологической системе, такой как клетка, вирус, животное, растение, а также в

реконструированных биологических системах, использующих биологические компоненты, способные к дупликации вектора. Векторный полинуклеотид может представлять собой молекулу ДНК или РНК или их гибрид, одноцепочечную или двухцепочечную молекулу.

Термин «экспрессионный вектор» относится к вектору, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для управления трансляцией полипептида, кодируемого полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в экспрессионном векторе.

Термин «полинуклеотид» относится к синтетической молекуле, содержащей цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. кДНК является примером синтетического полинуклеотида.

Термин «полипептид» или «белок» относится к молекуле, которая содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться «пептидами».

Термин « TMEFF2 » относится к трансмембранному белку человека с EGF и двумя фоллистатин-подобными доменами 2, также называемый томорегулином 2. Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого TMEFF2 приведена в **SEQ ID NO: 1**. Внеклеточный домен TMEFF2 показан в **SEQ ID NO: 2** и охватывает остатки 40-374 полноразмерного TMEFF2. Внеклеточный домен TMEFF2 содержит три отдельных поддомена: Kazal-подобный 1 (остатки 85-137), Kazal-подобный 2 (остатки 176-229) и EGF-домен (остатки 261-301). Иллюстративный константный домен TMEFF2 приведен в **SEQ ID NO: 3**. Термин «мембранная проксимальная область TMEFF2 » относится к области TMEFF2 с **SEQ ID NO: 110**, которая содержит домен EGF и N-С-концевые линкерные области (например, остатки 230-320 полноразмерного человеческого TMEFF2 с SEQ ID NO: 1). Предполагается, что все ссылки на белки, полипептиды и белковые фрагменты в настоящем документе относятся к человеческой версии соответствующего белка, полипептида или белкового фрагмента, если явно не указано иное. Таким образом, « TMEFF2 » означает человеческий TMEFF2, если не указано что он получен от видов, отличных от человека, например, «мышинный TMEFF2 » или «обезьяний TMEFF2» и т. д.

SEQ ID NO: 1 (полноразмерный человеческий TMEFF2)

MVLWESPRQCSSWTLCEGFCWLLLLPVMLLIVARPVKLAAFPTSLSDCQTPTGW
NCSGYD
DRENDLFLCDTNTCKFDGECLRIGDTVTCVCQFKCNNDYVPVCGSNGESYQNEC
YLRQAA
CKQQSEILVVSEGSCATDAGSGSGDGVHEGSGETSQKETSTCDICQFGAECDEDA
EDVWC
VCNIDCSQTNFNPLCASDGKSYDNACQIKEASCQKQEKIEVMSLGRCQDNTTTTT
KSEDG

HYARTDYAENANKLEESAREHHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAG
YTGQHC

EKKDYSVLVVP GPVRFQYVLIAAVIGTIQIAVICVVVLCITRK CPRSNRIHRQKQ
NTGH

YSSDNTTRASTRLI

SEQ ID NO: 2 (внеклеточный домен человеческого TMEFF2)

FPTSLSDCQTPTGWNCSGYDDRENDLFLCDTNTCKFDGECLRIGDTVTCVCQFK
CNNDYV

PVCGSNGESYQNECYLRQAACKQQSEILVVSEGSCATDAGSGSGDGVHEGSGET
SQKETS

TCDICQFGAECDEDAEDVWCVCNIDCSQTNFNPLCASDGKSYDNACQIKEASCQ
KQEKIE

VMSLGRCQDNTTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLEESAREHHIPCPEHYNGFC
M

HGKCEHSINMQEPSCRC DAGYTGHCEKKDYSVLVVP GPVRFQYVLIAAVIGTIQIAVI
CVVVLCITRK CPRSNRIHRQKQNTGHISSDNTTRASTRLI

домен EGF TMEFF2 SEQ ID NO: 3

HHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAGYTGHCE

мембранная проксимальная область TMEFF2 SEQ ID NO: 110

NTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLEESAREHHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSIN
MQEPSCRC DAGYTGHCEKKDYSVLVVP GPVRFQYV

Термин CD3 относится к антигену, который экспрессируется на Т-клетках в составе мультимолекулярного комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) и который состоит из гомодимера или гетеродимера, образованного в результате ассоциации двух или четырех цепей рецептора: CD3-эпсилон, CD3-дельта, CD3-дзета и CD3-гамма. CD3-эпсилон человека содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO: 4**. Предполагается, что все ссылки на белки, полипептиды и белковые фрагменты в настоящем документе относятся к человеческой версии соответствующего белка, полипептида или белкового фрагмента, если явно не указано иное. Таким образом, «CD3» означает человеческий CD3, если не указано что он получен от видов, отличных от человека, например, «мышинный CD3», «обезьяний CD3» и т. д.

SEQ ID NO: 4 (CD3-эпсилон человека)

MQSGTHWRVLGLCLLSVG VWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPG
SEILWQ

HNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYL
RARVCE

NCMEMDVMSVATIVIVDITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQR
GQNKERP

PPVPNPDYEPIRK GQRDLYSGLNQRR

SEQ ID NO: 5 (внеклеточный домен CD3- эпсилон человека)

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGS
DEDHL

SLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD

Термины « биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3», « антитело к TMEFF2/CD3 », «антитело к TMEFF2xCD3» и т. п. относятся к антителу, которое связывается с TMEFF2 и CD3.

Термин «в комбинации с» означает, что два или более терапевтических средства вместе вводят субъекту в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

Термин « TMEFF2-положительный рак » относится к раковой ткани или раковой клетке, которая демонстрирует измеряемый уровень белка TMEFF2. Уровень белка TMEFF2 может быть измерен с помощью хорошо известных анализов с использованием, например, ИФА, иммунофлуоресценции, проточной цитометрии или радиоиммуноанализа на живых или лизированных клетках.

Термин «проба» относится к сбору аналогичных текучих сред, клеток или тканей, выделенных из организма пациента, а также к текучим средам, клеткам или тканям, находящимся внутри пациента. Примерами проб являются биологические текучие среды, такие как кровь, сыворотка и серозные текучие среды, плазма, лимфа, моча, слюна, кистозная текучая среда, слезы, кал, мокрота, слизистые выделения секреторных тканей и органов, влагалищные выделения, асцитные жидкости, такие как связанные с несолидными опухолями, текучие среды в плевре, перикарде, брюшине, брюшной и других полостях тела, текучие среды, собранные посредством смыва из бронхов, жидкие растворы, контактировавшие с субъектом или биологическим источником, например, среда для культуры клеток и органов, включая кондиционированную среду клеток и органов, промывные жидкости и т. п., биоптаты тканей, аспираты, взятый тонкой иглой, или ткань опухоли после хирургической резекции.

Термин «раковая клетка» или «опухолевая клетка» относится к раковой, предраковой или трансформированной клетке, либо *in vivo*, *ex vivo*, либо в культуре тканей, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения. Эти изменения не обязательно затрагивают поступление нового генетического материала. Хотя трансформация может быть вызвана инфицированием трансформирующим вирусом и встраиванием новой геномной нуклеиновой кислоты или поглощением экзогенной нуклеиновой кислоты, она также может возникнуть спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутация эндогенного гена. Трансформация/рак проявляются в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, модулировании уровней маркера, специфичных для опухоли, инвазивности, росте опухоли у приемлемых животных-хозяев, таких как бестимусные мыши и т. п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)).

Термин «около» означает «в пределах приемлемого диапазона ошибки» для

конкретного значения, определенного обычным специалистом в данной области, причем ошибка отчасти зависит от того, каким образом измерено или определено это значение, т. е. от ограничений системы измерения. Если в примерах или в других разделах настоящего описания в контексте конкретного анализа, результата или варианта осуществления явным образом не указано иное, термин «около» означает «в пределах одного среднеквадратичного отклонения» в соответствии с практикой, принятой в данной области, или «в диапазоне до 5%», в зависимости от того, что больше.

Термин «пациент» включает в себя любого человека или не относящееся к человеку животное. Термин «не относящееся к человеку животное» включает в себя всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, цыплята, амфибии, рептилии и т. д. Если не указано иное, термины «пациент» или «субъект» применяются взаимозаменяемо.

Термины «лечить» или «лечение» обозначают как терапевтическое лечение, так и профилактические или превентивные меры, причем целью является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства. Преимущественные или желательные клинические результаты включают в себя ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) течения заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное улучшение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Термин «лечение» может также означать продление времени жизни по сравнению с ожидаемым в отсутствие лечения пациента. Требуемые лечения пациенты включают тех, которые уже имеют состояние или расстройство, а также тех, которые имеют предрасположенность к развитию состояния или расстройства, или тех, у которых такое состояние или расстройство необходимо предотвратить.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к некоторому количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела субъекта, а также от способности терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать у субъекта желаемый ответ. Примеры показателей эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств, которые включают в себя, например, улучшенное самочувствие пациента.

Нумерация аминокислотных остатков в константной области антитела в тексте описания приведена в соответствии с каталогом ЕС, как описано в публикации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), если явно не указано иное.

В настоящем документе применяются традиционные одно- и трехбуквенные коды обозначения аминокислот, как показано в таблице 1.

Таблица 1

Аминокислота	Трехбуквенный код	Однобуквенный код
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспартат	Asp	D
Цистеин	Cys	C
Глутамат	Gln	E
Глутамин	Glu	Q
Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Фенилаланин	Phe	Ж
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Д
Валин	Val	V

Композиции изобретения

В настоящем изобретении предложены антитела к TMEFF2 или их антигенсвязывающие фрагменты, мультиспецифические антитела, содержащие антигенсвязывающие фрагменты антител к TMEFF2 по изобретению и биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 или их антигенсвязывающие фрагменты. В настоящем изобретении предложены полипептиды и полинуклеотиды, кодирующие антитела по изобретению, или комплементарные к ним нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и способы их получения и применения.

Антитела к TMEFF2

Экспрессия TMEFF2 значительно повышена в тканях предстательной железы и аденокарциноме предстательной железы по сравнению с другими нормальными тканями. Мембранные TMEFF2 сохраняются во время прогрессирования заболевания, что служит возможной мишенью для противоопухолевых терапевтических средств. Известно, что TMEFF2 расщепляется протеазой с получением растворимых форм антигена. В настоящем изобретении были созданы антитела к мембранной проксимальной области TMEFF2 с целью максимального увеличения связывания антитела с мембранным TMEFF2 и сведения к минимуму вероятности связывания полученных антител с растворимыми формами TMEFF2.

В изобретении предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с мембранной проксимальной областью SEQ ID NO: 110 в TMEFF2. Антитела к TMEFF2 по изобретению, связывающие мембранную проксимальную область TMEFF2, не интернализируются клетками. Без стремления к ограничению какой-либо конкретной теорией можно ожидать, что

неинтернализующие антитела к TMEFF2 обладают повышенным онкогенным эффектом, опосредованным эффекторными функциями антитела, в результате отсутствия интернализации и деградации TMEFF2 по сравнению с интернализирующими антителами к TMEFF2.

Термин « связывание с мембранной проксимальной областью» означает, что 90% эпитопных остатков антитела, идентифицированных путем обмена водорода/дейтерия (обмен H/D), находятся внутри мембранной проксимальной области TMEFF2. Остатки эпитопа представляют собой остатки, защищенные исследуемым антителом по меньшей мере на 5% разности уровней дейтерирования посредством обмена H/D. Примерами таких антител являются антитела TMEB675, TMEB570, TMEB674, TMEB565, TMEB762 и TMEB757.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается в пределах остатков HGKCEHSINMQEPSC (SEQ ID NO: 57) или DAGYTGQHCEKKDYSVL (SEQ ID NO: 58) с мембранной проксимальной областью TMEFF2. Примерное антитело к TMEFF2, связывающееся в пределах остатков HGKCEHSINMQEPSC (SEQ ID NO: 57) представляет собой TMEB570. Примерное антитело к TMEFF2, связывающееся в пределах остатков DAGYTGQHCEKKDYSVL (SEQ ID NO: 58) представляет собой TMEB675. Также ожидается, что варианты TMEB675 TMEB762 и TMEB757 будут связываться с мембранной проксимальной областью TMEFF2 в пределах остатков DAGYTGQHCEKKDYSVL (SEQ ID NO: 58).

При анализе обмена H/D рекомбинантно экспрессируемый ECD TMEFF2 инкубируют в присутствии или в отсутствие антитела в дейтерированной воде в течение предварительно заданных периодов времени, что приводит к включению дейтерия в обмениваемые атомы водорода, не защищенные антителом, с последующим расщеплением белка протеазой и анализом пептидных фрагментов с использованием жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС). Анализ H/D обмена можно проводить с использованием известных протоколов. Пример протокола описан в примере 5.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с эталонным антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 25 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 28, VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88 или VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90.

Конкуренцию за связывание исследуемого антитела с мембранной проксимальной областью TMEFF2 и эталонного антитела можно анализировать *in vitro* с использованием хорошо известных методов. Например, связывание меченного NHS-эфиром MSD Sulfo-TagTM тестового антитела с мембранной проксимальной областью TMEFF2 в присутствии

немеченого эталонного антитела можно оценить с помощью ИФА, или анализов Bioacore или проточной цитометрии могут быть использованы для демонстрации конкуренции. Исследуемое антитело конкурирует за связывание с TMEFF2 с эталонным антителом, если исследуемое антитело ингибирует связывание эталонного антитела с мембранной проксимальной областью TMEFF2 на 85% или более, например 90% или более или 95% или более.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 с

SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно;

SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно;

SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно;

SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно; или

SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с константой равновесной диссоциации (K_D) около $0,4 \times 10^{-9}$ М или менее, при этом K_D измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса в ацетатном буфере при pH 4,5-5,0 при комнатной температуре.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с K_D от около $0,1 \times 10^{-10}$ М до около $0,4 \times 10^{-9}$ М.

Аффинность антитела к мембранной проксимальной области TMEFF2 может быть определена экспериментально с использованием любого подходящего метода. Иллюстративный способ включает применение оборудования ProteOn XPR36, Biacore 3000 или KinExA, твердофазный иммуносорбентный ферментный анализ (ИФА) или анализы конкурентного связывания, известные специалистам в данной области. Измеренное значение аффинности антитела к TMEFF2 может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярности, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например, K_D , K_{on} и K_{off}), как правило, выполняют в стандартизированных условиях и с применением стандартизированного буферного раствора, такого как буферный раствор, описанный в настоящем документе. Специалистам в данной области будет понятно, что внутренняя ошибка измерений аффинности, например, с применением Biacore 3000 или ProteOn (измеряемая как стандартное отклонение, CO), как правило, для измерений может находиться в пределах 5-33%, оказываясь в границах типичных пределов обнаружения. Следовательно, термин «около» в отношении значения K_D характеризует типичное стандартное отклонение в анализе. Например, типичное CO для K_D , равной 1×10^{-9} М, составляет до $\pm 0,33 \times 10^{-9}$ М.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его

антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, содержащее каркас вариабельной области тяжелой цепи (VH), полученный из VH3_3-23 (SEQ ID NO: 53) или VH1_1-69 (SEQ ID NO: 54).

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, содержащее каркас вариабельной области легкой цепи (VL), полученный из VKI_L11 (SEQ ID NO: 55) или VKIII_A27 (SEQ ID NO: 56).

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, содержащее каркас VH и каркас VL, полученные из VH3_3-23 с SEQ ID NO: 53 и VKI_L11 с SEQ ID NO: 55 соответственно.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, содержащее каркас VH и каркас VL, полученные из - VH1_1-69 с SEQ ID NO: 54 и VKIII_A27 с SEQ ID NO: 56 соответственно.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, содержащее каркас VH и каркас VL, полученные из - VH1_1-69 с SEQ ID NO: 54 и VKI_L11 с SEQ ID NO: 55 соответственно.

Антитела, содержащие вариабельные участки тяжелой или легкой цепи, «полученные из» конкретного каркаса или последовательности зародышевой линии, представляют собой антитела, полученные из системы, в которой используются зародышевые гены человеческого иммуноглобулина, например, из трансгенных мышей, крыс или кур, или из библиотек фаговых дисплеев, как описано ниже в данном документе. Антитело, содержащее конкретный каркас, полученный из последовательности зародышевой линии, может содержать аминокислотные отличия по сравнению с последовательностью, из которой оно получено, например, вследствие возникающих в естественных условиях соматических мутаций или намеренных замен.

В изобретение также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 39, а VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 32 и VL с SEQ ID NO: 35.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 46, а VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 49.

В изобретение также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его

антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 40, а VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 33 и VL с SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 47, а LC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 50.

В изобретение также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 41, а VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 34 и VL с SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 48, а LC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 51.

В изобретение также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 40, а VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 45.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 33 и VL с SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 47, а LC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 52.

В изобретение также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 95, а VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 91 и VL с SEQ ID NO: 92.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 97, а LC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 98.

В изобретение также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 99, а VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 100.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 93 и VL с SEQ ID NO: 94.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 101, а LC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 102.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мультиспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с Т-клеточным антигеном.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD3.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD3-эпсилон.

Последовательности VH, VL, HCDR, LCDR, HC и LC типичных антител к TMEFF2 по изобретению представлены в таблицах 5-12.

Хотя варианты осуществления, проиллюстрированные в примерах, содержат пары переменных доменов (одну из тяжелой цепи и одну из легкой цепи), специалисту в данной области будет понятно, что альтернативные варианты осуществления могут содержать одиночные переменные домены тяжелой или легкой цепи. Одиночный переменный домен можно применять для скрининга переменных доменов, способных к формированию двухдоменного специфического антигенсвязывающего фрагмента, способного связываться с TMEFF2. Скрининг можно проводить посредством скрининга фагового дисплея, например, с применением иерархического двойного комбинаторного подхода, раскрытого в международной патентной публикации № WO1992/01047. Согласно этому подходу отдельную колонию, содержащую клон либо с VH-, либо с VL-цепью, применяют для инфицирования полной библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (VL или VH), и полученный двухцепочечный специфичный антигенсвязывающий домен отбирают в соответствии с методиками фагового дисплея, применяя известные способы и способы, описанные в настоящем документе. Таким образом, отдельные полипептидные

цепи VH и VL можно использовать для идентификации дополнительных антител к TMEFF2 с использованием способов, раскрытых в межд. пат. публик. № WO1992/01047.

Гомологичные антитела

Варианты антител к TMEFF2 или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению, содержащие аминокислотные последовательности VH или VL, представлены в **таблице 9**, находятся в пределах объема изобретения. Например, варианты могут содержать одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен в VH и/или VL постольку, поскольку гомологичные антитела сохранили или имеют улучшенные функциональные свойства по сравнению с исходными антителами, такие как сопоставимое связывание с TMEFF2 или улучшенная стабильность. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей может составлять около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% с аминокислотной последовательностью VH или VL по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления гомологичные антитела к TMEFF2 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению связываются с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с константой равновесной диссоциации (K^D), равной около $0,4 \times 10^{-9}$ М или менее, при этом K^D измеряют с использованием поверхностного плазмонного резонанса в ацетатном буфере при pH 4,5-5,0 при комнатной температуре.

В некоторых вариантах осуществления гомологичные антитела к TMEFF2 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению связываются с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с K_D от около $0,1 \times 10^{-10}$ М до около $0,4 \times 10^{-9}$ М.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. Необязательно любые замены не выполняются в рамках CDR.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. Необязательно любые замены не выполняются в рамках CDR.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. Необязательно любые замены не выполняются в рамках CDR.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. Необязательно любые замены не выполняются в рамках CDR.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. Необязательно любые замены не выполняются в рамках CDR.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90, причем VH, VL или как VH, так и VL необязательно содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать аминокислотных замен. Необязательно любые замены не выполняются в рамках CDR.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH, имеющий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную VH с SEQ ID NO: 25, 26, 27, 87 или 89. Необязательно любое изменение последовательностей с SEQ ID NO не выполняется в рамках CDR.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VL, имеющий аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную VL с SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 88 или 90. Необязательно любое изменение последовательностей с SEQ ID NO не выполняется в рамках CDR.

Выравнивание аминокислотных последовательностей доменов VH выбранных антител к TMEFF2 показано на Фиг. 1, а выравнивание аминокислотных последовательностей доменов VL отобранных антител к TMEFF2 показано на Фиг. 2. Цепи VH и VL идентифицированы по их SEQ ID NO: в начале каждой строки. Возможные сайты замен в VH и/или VL представляют собой положения остатков, которые различаются между антителами. Например, замены могут быть произведены в положениях остатков 14, 20, 54, 56, 59, 76, 82, 84, 93, 107 в VH SEQ ID NO: 25, 27, 87 и 89 (нумерация на основе SEQ ID NO 25). Аналогичным образом, замены могут быть произведены в положениях остатков 1, 95 и 107 в VL с SEQ ID NO: 28, 30, 88 и 90. Типичные замены, которые могут быть выполнены, представляют собой консервативные аминокислотные замены или замены аминокислотными остатками, присутствующими в соответствующем положении остатка в каждом антителе к TMEFF2.

Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от числа идентичных положений, общих для последовательностей (т. е. $\% \text{ идентичности} = \frac{\text{число идентичных положений}}{\text{общее число положений}} \times 100$), с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, который необходимо встроить для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller (*Comput Appl Biosci* 4:11-17 (1988)), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицы массы остатков PAM120, штрафа на длину гэпа 12 и штрафа гэпа 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Нидлмана и Ванча (*J Mol Biol* 48:444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступно на [www. Gcg.com](http://www.Gcg.com)), используя либо матрицу Blossum 62, либо матрицу PAM250, со штрафом за открытие гэпов 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафом за удлинение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Антитела с консервативными модификациями

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий VH, содержащий последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и VL, содержащий последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где одна или более из последовательности CDR содержат определенные аминокислотные последовательности на основе антител, описанных в данном документе (например, антител, представленных в **таблицах 5-12**), или их консервативных модификаций, и при этом антитела сохраняют желаемые функциональные свойства исходных антител.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие консервативные модификации, связываются с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с константой равновесной диссоциации (K_D), равной около $0,4 \times 10^{-9}$ М или менее, при этом K_D измеряют с использованием поверхностного плазмонного резонанса в ацетатном буфере при pH 4,5-5,0 при комнатной температуре.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие консервативные модификации, связываются с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с K_D от около $0,1 \times 10^{-10}$ М до около $0,4 \times 10^{-9}$ М.

В изобретение также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно и их консервативные модификации.

В изобретение также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и

LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно и их консервативные модификации.

В изобретение также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно и их консервативные модификации.

В изобретение также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно и их консервативные модификации.

В изобретение также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно и их консервативные модификации.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28 и их консервативные модификации.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29 и их консервативные модификации.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30 и их консервативные модификации.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31 и их консервативные модификации.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88 и их консервативные модификации.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90 и их консервативные модификации.

Термин «консервативные модификации» означает модификации аминокислот, которые незначительно изменяют или влияют на характеристики связывания антитела, содержащего такие модификации аминокислот. Консервативные модификации включают замены, добавления и делеции аминокислот. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, в которых аминокислота заменена аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Классы аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи, четко определены и включают аминокислоты с кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), основными

боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин, триптофан), ароматическими боковыми цепями (например, фенилаланин, триптофан, гистидин, тирозин), алифатическими боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), амидами (например, аспарагин, глутамин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и серосодержащими боковыми цепями (цистеин, метионин). Дополнительно любой нативный остаток в полипептиде может быть замещен аланином, согласно способу, описанному ранее как аланин-сканирующий мутагенез (MacLennan *et al.*, (1988) *Acta Physiol Scand Suppl* 643:55-67; Sasaki *et al.*, (1988) *Adv Biophys* 35:1-24). Аминокислотные замены в антителах по изобретению могут быть выполнены известными способами, например методом ПЦР-опосредованного мутагенеза (патент США № 4683195). Альтернативно библиотеки вариантов можно создавать, например, путем применения случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например кодонов DVK, кодирующих 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). Характеристики полученных в результате вариантов антител могут быть исследованы с использованием анализов, описанных в настоящем документе.

Иммуноконъюгаты

Термин «иммуноконъюгат» означает антитело по изобретению, конъюгированное с одной или более гетерологичными молекулами.

В изобретении также предложен иммуноконъюгат, содержащий выделенное антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное с гетерологичной молекулой.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная молекула представляет собой обнаруживаемую метку.

Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, конъюгированный с обнаруживаемой меткой, можно использовать для оценки экспрессии TMEFF2 на различных образцах. Обнаруживаемые метки включают композиции, которые при конъюгировании с выделенным антителом по изобретению, или его антигенсвязывающим фрагментом делают его обнаружимым посредством спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических или химических средств.

Примеры обнаруживаемых меток включают в себя радиоактивные изотопы, магнитные гранулы, металлические гранулы, коллоидные частицы, флуоресцентные красители, электроноплотные реагенты, ферменты (например, широко используемые в иммуноферментном анализе (ИФА)), биотин, дигоксигенин, гаптены, люминисцентные молекулы, хемилюминисцентные молекулы, флуорохромы, флуорофоры, гасящие флуоресценцию агенты, цветные молекулы, радиоактивные изотопы, сцинтиллирующие средства, авидин, стрептавидин, белок А, белок G, антитела или их фрагменты,

полигистидин, Ni^{2+} , Flag-маркеры, тус-маркеры, тяжелые металлы, ферменты, щелочная фосфатаза, пероксидаза, люцифераза, доноры/акцепторы электронов, сложные эфиры акридиния и колориметрические субстраты.

Обнаруживаемая метка может испускать сигнал спонтанно, например, когда обнаруживаемая метка представляет собой радиоактивный изотоп. В других случаях обнаруживаемая метка испускает сигнал после стимуляции внешним полем.

Примерами радиоактивных изотопов могут быть γ -излучающие, Оже-электрон-излучающие, β -излучающие, альфа-излучающие или позитрон-излучающие радиоактивные изотопы. К примерам радиоактивных изотопов относятся ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{19}F , ^{55}Co , ^{57}Co , ^{60}Co , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{75}Br , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{90}Sr , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{115}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{226}Ra , ^{225}Ac и ^{227}Ac .

К примерам атомов металлов относятся металлы с атомным номером более 20, например атомы кальция, атомы скандия, атомы титана, атомы ванадия, атомы хрома, атомы марганца, атомы железа, атомы кобальта, атомы никеля, атомы меди, атомы цинка, атомы галлия, атомы германия, атомы мышьяка, атомы селена, атомы брома, атомы криптона, атомы рубидия, атомы стронция, атомы иттрия, атомы циркония, атомы ниобия, атомы молибдена, атомы технеция, атомы рутения, атомы родия, атомы палладия, атомы серебра, атомы кадмия, атомы индия, атомы олова, атомы сурьмы, атомы теллура, атомы йода, атомы ксенона, атомы цезия, атомы бария, атомы лантана, атомы гафния, атомы тантала, атомы вольфрама, атомы рения, атомы осмия, атомы иридия, атомы платины, атомы золота, атомы ртути, атомы таллия, атомы свинца, атомы висмута, атомы франция, атомы радия, атомы актиния, атомы церия, атомы празеодима, атомы неодима, атомы прометия, атомы самария, атомы европия, атомы гадолиния, атомы тербия, атомы диспрозия, атомы гольмия, атомы эрбия, атомы туллия, атомы иттербия, атомы лютеция, атомы тория, атомы протактиния, атомы урана, атомы нептуния, атомы плутония, атомы америция, атомы кюрия, атомы берклия, атомы калифорния, атомы эйнштейния, атомы фермия, атомы менделевия, атомы nobелия или атомы лоуренсия.

Приемлемые красители включают в себя любые присутствующие на рынке красители, такие как, например, 5(6)-карбоксифлуоресцеин, малеимид IRDye 680RD или IRDye 800CW, красители на основе комплекса рутений/полипиридил и т. п.

К приемлемым флуорофорам относятся флуоресцеин изотиоцианат (FITC), флуоресцеин тиосемикарбазид, родамин, Texas Red, красители CyDye (например, Cy3, Cy5, Cy5.5), красители Alexa Fluor (например, Alexa488, Alexa555, Alexa594; Alexa647), флуоресцентные красители ближнего ИК-диапазона (NIR) (700-900 нм) и карбоцианиновые и аминотирильные красители.

Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, конъюгированный с обнаруживаемой меткой, можно использовать в качестве агента визуализации.

Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению можно конъюгировать с обнаруживаемой меткой с использованием известных методов.

В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка находится в комплексе с хелатирующим агентом.

В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемая метка конъюгирована с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению через линкер.

Обнаруживаемая метка может быть связана прямо или косвенно с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению с использованием известных методов. К подходящим линкерам, известным в данной области, относятся, например, простетические группы, нефенольные линкеры (производные N-сукцинимидилбензоатов; додекарборат), хелатирующие группы как макролитических, так и ациклических хелаторов, например производные 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10,-тетрауксусной кислоты (DOTA), производные диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA), производные S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусной кислоты (NOTA) и производные 1,4,8,11-тетраазациклододекан-1,4,8,11-тетрауксусной кислоты (TETA), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол) пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), дифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидные соединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(п-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные фтористые соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол) и другие хелатирующие группы. Подходящие пептидные линкеры хорошо известны.

Биспецифические антитела к TMEFF2/CD3

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем антитело связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2. Без ограничений, накладываемых какой-либо конкретной теорией, биспецифические антитела, связывающиеся с мембранной проксимальной областью TMEFF2, могут быть более эффективными в опосредовании опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем антитело конкурирует за связывание с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с эталонным антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 25 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 28, VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88 или VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/ CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает мембранную проксимальную область TMEFF2 с константой диссоциации (K_D) около $0,4 \times 10^{-9}$ М или менее, при этом K_D измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса в ацетатном буфере при pH 4,5-5,0 при комнатной температуре.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с K_D от около $0,1 \times 10^{-10}$ М до около $0,4 \times 10^{-9}$ М.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с

SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно;

SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно;

SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно; о

SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно; или

SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с

SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно; или

SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором первый домен содержит

VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28;

VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29;

VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30;

VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31;

VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88; или

VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором второй домен содержит

VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; или

VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 59 и VL с SEQ ID NO: 111.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2,

HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первую тяжелую цепь (HC1) с SEQ ID NO: 32, первую легкую цепь (LC1) с SEQ ID NO: 35, вторую тяжелую цепь (HC2) с SEQ ID NO: 76 и вторую легкую цепь (LC2) с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 32, LC1 с SEQ ID NO: 35, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 36, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 36, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 34, LC1 с SEQ ID NO: 37, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 34, LC1 с SEQ ID NO: 37, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 38, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, а второй домен

содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 38, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первую тяжелую цепь (HC1) с SEQ ID NO: 91, первую легкую цепь (LC1) с SEQ ID NO: 92, вторую тяжелую цепь (HC2) с SEQ ID NO: 76 и вторую легкую цепь (LC2) с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 91, LC1 с SEQ ID NO: 92, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первую тяжелую цепь (HC1) с SEQ ID NO: 93, первую легкую цепь (LC1) с SEQ ID NO: 94, вторую тяжелую цепь (HC2) с SEQ ID NO: 76 и вторую легкую цепь (LC2) с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к

TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 93, LC1 с SEQ ID NO: 94, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

Сконструированные и модифицированные антитела

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут быть дополнительно сконструированы для создания модифицированных антител со сходными или измененными свойствами по сравнению с исходными антителами. В антителах по изобретению могут быть сконструированы области VH, VL, VH и VL, константные области, каркас тяжелой цепи, каркас легкой цепи или любой или все из шести CDR.

Антитела по изобретению могут быть сконструированы посредством прививания CDR. Одну или более последовательностей CDR антител по изобретению можно прививать на другую каркасную последовательность. Прививание CDR можно выполнить с помощью известных способов и способов, описанных в настоящем документе.

Пригодные для использования каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных источников, включающих в себя генные последовательности антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК и кодируемые белковые последовательности человеческих генов переменных доменов легкой и тяжелой цепей зародышевой линии можно найти в международной информационной системе **IMGT®**, информационной системе **ImMunoGeneTics information system®** [www. Imgt.org](http://www.imgt.org). Каркасные последовательности, которые можно применять для замены существующих каркасных последовательностей в антителах по изобретению, могут быть такими, которые показывают наибольшую процентную (%) идентичность с исходными переменными доменами по всей длине VH или VL или по длине FR1, FR2, FR3 и FR4. Кроме того, приемлемые каркасы можно дополнительно выбирать на основании VH и VL в отрезках CDR1 и CDR2 или идентичных LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1 и HCDR2 канонической структуры. Приемлемые каркасы можно выбирать с помощью известных способов, таких как адаптация для человеческого каркаса, описанная в патенте США № 8,748,356, или супергуманизация, описанная в патенте США № 7,709,226.

Каркасные последовательности исходных и сконструированных антител можно подвергать дополнительной модификации, например, посредством обратных мутаций, для восстановления и/или улучшения связывания полученных антител с антигеном, как описано, например, в патенте США № 6,180,370. Каркасные последовательности исходных

или сконструированных антител можно дополнительно подвергать модификациям посредством введения мутаций в одном или более остатках в пределах каркасной области (или альтернативно в пределах одной или более областей CDR) для удаления Т-клеточных эпитопов и, следовательно, снижения потенциальной иммуногенности антитела. Такой подход также называют «деиммунизацией» и он более подробно описан в патентной публикации США № US20070014796.

Остатки CDR антител по изобретению могут быть мутированы для модуляции аффинности антител к TMEFF2 и/или CD3.

Остатки CDR антител по изобретению могут быть мутированы, для сведения к минимуму риска посттрансляционной модификации. Аминокислотные остатки предполагаемых мотивов для дезаминирования (NS), катализированного кислотой гидролиза (DP), изомеризации (DS) или окисления (W) можно замещать любой из природных аминокислот с целью мутагенеза мотивов, и полученные антитела можно проверять на их функциональность и стабильность с применением способов, описанных в настоящем документе.

Антитела по изобретению модифицируют с целью улучшения стабильности, селективности, перекрестной реактивности, аффинности, иммуногенности или достижения других желательных биологических или биофизических свойств, что также находится в рамках объема изобретения. На стабильность антитела влияет ряд факторов, включающих: (1) внутреннюю укладку отдельных доменов, влияющих на их собственную стабильность; (2) поверхностные взаимодействия белков, влияющие на объединение в пары HC и LC; (3) глубину расположения полярных и заряженных остатков; (4) сеть Н-мостиков между полярными и заряженными остатками; и (5) поверхностный заряд и распределение полярных остатков наряду с другими внутри- и межмолекулярными взаимодействиями (Worn *et al.*, (2001) *J Mol Biol* 305:989-1010). Остатки, способные дестабилизировать структуру, можно идентифицировать на основании кристаллической структуры антитела или, в определенных случаях, путем молекулярного моделирования, а влияние остатков на стабильность антитела можно исследовать путем создания и оценки вариантов, несущих мутации в идентифицированных остатках. Один из способов повышения стабильности антитела заключается в увеличении средней температуры перехода (T_m), измеряемой с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Как правило, T_m белка имеет положительную корреляцию с его стабильностью и отрицательную корреляцию с его подверженностью нарушениям третичной структуры и денатурации в растворах, а также деградации, которая зависит от склонности белка к нарушению третичной структуры (Remmele *et al* (2000) *Biopharm* 13:36-46). В ряде исследований была установлена корреляция между степенью физической стабильности составов, измеренной как термостабильность с помощью DSC, и измерениями физической стабильности, проведенными другими способами (Gupta *et al.*, (2003) *AAPS PharmSci* 5E8; Zhang *et al.*, (2004) *J Pharm Sci* 93:3076-89; Maa *et al.*, (1996) *Int J Pharm* 140:155-68; Bedu-Addo *et al.*, (2004) *Pharm Res* 21:1353-61; Remmele *et al.*, (1997) *Pharm Res* 15:200-8). Результаты

исследований структур позволяют предположить, что T_m Fab влияет на долговременную физическую стабильность соответствующего mAb.

Циркулирующие эндогенные карбоксипептидазы могут удалять С-концевой лизин (CTL) из введенных антител (Cai *et al.*, (2011) *Biotechnol Bioeng* 108:404-412). Удаление CTL во время получения можно контролировать на уровне ниже максимального посредством контроля концентрации внеклеточного Zn^{2+} , этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) или ЭДТА- Fe^{3+} , как описано в патентной публикации США № US20140273092. Содержание CTL в антителах можно измерять с помощью известных способов.

В антителах по изобретению можно выполнять замены в Fc, чтобы модулировать эффекторные функции и/или фармакокинетические свойства антитела. В традиционной иммунной функции взаимодействие комплексов антитело-антиген с клетками иммунной системы приводит к широкому ряду ответов в диапазоне от эффекторных функций, таких как антителозависимая цитотоксичность, дегрануляция тучных клеток и фагоцитоз, до иммуномодулирующих сигналов, таких как регулирование пролиферации лимфоцитов и секреция антител. Все из этих взаимодействий инициируются посредством связывания домена Fc антител или иммунных комплексов со специализированными рецепторами клеточной поверхности на клетках. Разнообразие клеточных ответов, запускаемых антителами и иммунными комплексами, происходит от гетерогенности рецепторов Fc: FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32A) и FcγRIII (CD16) представляют собой активирующие Fcγ-рецепторы (то есть, усиливают иммунную систему), тогда как FcγRIIb (CD32B) представляет собой ингибирующий Fcγ-рецептор (то есть подавляют иммунную систему). Связывание с рецептором FcRn модулирует период полужизни антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по изобретению содержат по меньшей мере одну замену в области Fc.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по изобретению содержат один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать замен в области Fc.

Положения Fc, которые могут быть заменены для модуляции периода полужизни антитела. Примерами замен, которые можно выполнять по отдельности или в комбинации для увеличения периода полужизни антитела, являются замены M428L/N434S, M252Y/S254T/T256E, T250Q/M428L, N434A и T307A/E380A/N434A. Примерами замен, которые можно выполнять по отдельности или в комбинации для уменьшения периода полужизни антитела, являются замены H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по изобретению содержат в области Fc по меньшей мере одну замену, которую выбирают из группы, состоящей из M428L/N434S, M252Y/S254T/T256E, T250Q/M428L, N434A, T307A/E380A/N434A, H435A, P257I/N434H, D376V/N434H,

M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по изобретению содержат в области Fc по меньшей мере одну замену, которая уменьшает связывание антитела с активирующим рецептором Fcγ (FcγR) и/или уменьшает эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) или фагоцитоз (ADCP).

Положения Fc, которые могут быть заменены для уменьшения связывания антитела с активирующим FcγR и, следовательно, для снижения эффекторной функции, представляют собой замены L234A/L235A в IgG1, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S в IgG2, F234A/L235A в IgG4, S228P/F234A/L235A в IgG4, N297A во всех изотипах Ig, V234A/G237A в IgG2, K214T/E233P/L234V/L235A/G236-делеция/A327G/P331A/D365E/L358M в IgG1, H268Q/V309L/A330S/P331S в IgG2, S267E/L328F в IgG1, L234F/L235E/D265A в IgG1, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S в IgG1, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S в IgG4 и S228P/F234A/L235A/G236-делеция/G237A/P238S в IgG4.

Для усиления стабильности IgG4 в антителах IgG4 можно выполнять известную замену S228P.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по изобретению содержат замену S228P, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по изобретению содержат замену F234A, L235A bkb F234A/L235A, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по изобретению содержат замену S228P, F234A и L235A, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

Способы создания гомологичных антител, антител с консервативными модификациями, а также сконструированных и модифицированных антител

Антитела по изобретению, которые имеют измененные аминокислотные последовательности по сравнению с исходными антителами, можно создать с помощью стандартных технологий клонирования и экспрессии. Например, можно выполнять направленный точечный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез с целью встраивания мутации (-й), а влияние на связывание антитела или на другое целевое функциональное свойство можно оценивать известными способами и способами, описанными в примерах в настоящем документе.

Изотипы и аллотипы антител

Антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по изобретению могут иметь изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по данному изобретению представляют собой изотип IgG1.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по данному изобретению представляют собой изотип IgG2.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по данному изобретению представляют собой изотип IgG3.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по данному изобретению представляют собой изотип IgG4.

Иммуногенность терапевтических антител связана с повышенным риском реакций на инфузию и сниженной длительностью терапевтического ответа (Baert *et al.*, (2003) *N Engl J Med* 348:602-08). Степень, с которой терапевтические антитела индуцируют иммунный ответ в организме-хозяине, отчасти может определяться аллотипом антитела (Stickler *et al.*, (2011) *Genes and Immunity* 12:213-21). Аллотип антитела связан с вариациями аминокислотной последовательности в конкретных положениях в последовательностях константных областей антитела. В **таблице 2** приведены выбранные аллотипы IgG1, IgG2 и IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по данному изобретению представляют собой аллотип G2m(n).

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по изобретению относятся к аллотипу G2m(n-).

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по данному изобретению относятся к аллотипу G2m (n)/(n-).

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по данному изобретению относятся к аллотипу G4m(a).

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по изобретению относятся к аллотипу G1m(17).

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 или биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по изобретению относятся к аллотипу G1m(17,1).

Таблица 2

Аллотип	Аминокислотный остаток в положении различия (нумерация остатков: по каталогу EU)							
	IgG2		IgG4		IgG1			
	189	282	309	422	214	356	358	431
G2m(n)	T	M						
G2m(n-)	P	V						
G2m(n)/(n-)	T	V						
nG4m(a)			L	R				
G1m(17)					K	E	M	A
G1m(17,1)					K	D	L	A

Антиидиотипические антитела

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически

связывающееся с антителом к TMEFF2 или биспецифическим антителом к TMEFF2/CD3 по изобретению.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающееся с антителом к TMEFF2, содержащим VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающееся с антителом к TMEFF2, содержащим VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающееся с антителом к TMEFF2, содержащим VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающееся с антителом к TMEFF2, содержащим VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающееся с антителом к TMEFF2, содержащим VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88.

В изобретении также предложено антиидиотипическое антитело, специфически связывающееся с антителом к TMEFF2, содержащим VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90.

Антиидиотипическое (Id) антитело является антителом, распознающим антигенные детерминанты (например, паратоп или CDR) антитела. Id-антитело может быть блокирующим или неблокирующим антиген. Блокирующее антиген Id-антитело можно использовать для обнаружения свободного антитела в пробе (например, описанного в настоящем документе антитела к TMEFF2 по изобретению). Неблокирующее Id-антитело можно применять для обнаружения всех антител (свободных, частично связанных с антигеном или полностью связанных с антигеном) в пробе. Id-антитело можно получать путем иммунизации животного антителом, для которого получают анти-Id-антитело.

Анти-Id-антитело также можно применять в качестве иммуногена для индукции иммунного ответа у еще одного животного, получая так называемое анти-анти-Id-антитело. Анти-анти-Id-антитело может быть эпитопно идентично первичному mAb, которое индуцировало анти-Id. Таким образом, используя антитела к идиотипическим детерминантам mAb, можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела идентичной специфичности. Антиидиотипические антитела можно изменять (тем самым продуцируя варианты антиидиотипических антител) и/или дериватизировать любым приемлемым методом, таким как раскрытый в настоящем документе.

Создание моноспецифических антител по изобретению

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 являются человеческими.

В некоторых вариантах осуществления антитела к TMEFF2 являются

гуманизированными.

Моноспецифические антитела по изобретению могут быть созданы с использованием различных технологий. Например, для создания моноклональных антител можно применять способ гибридом по Kohler and Milstein, *Nature* 256:495, 1975. В методе гибридом мышь или другое животное-хозяина, например хомяка, крысу или обезьяну, иммунизируют TMEFF2 или фрагментами TMEFF2 человека, шимпанзе или макака, такими как мембранный проксимальный домен TMEFF2, с последующим слиянием спленоцитов от иммунизированных животных с клетками миеломы с использованием стандартных способов с образованием клеток гибридомы (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Колонии, возникающие из одиночных клеток иммортализованной гибридомы, подвергают скринингу на основании продукции антител с желательными свойствами, такими как специфичность связывания, перекрестная реактивность или ее отсутствие и аффинность к антигену.

Для продукции антител к TMEFF2 изобретения можно использовать различных животных-хозяев. Например, для создания мышинных антител к человеческому TMEFF2 можно использовать мышей Balb/c. Антитела, полученные от мышей линии Balb/c и от других животных, отличных от человека, могут быть гуманизированы с применением разнообразных технологий для создания последовательностей, имеющих большее сходство с человеческими последовательностями.

Примеры методик гуманизации, включающих в себя отбор человеческих акцепторных каркасов, известны и включают в себя прививание CDR (патент США № 5,225,539), прививание SDR (патент США № 6,818,749), изменение поверхности (Padlan, (1991) *Mol Immunol* 28:489-499), изменение поверхности определяющих специфичность остатков (патентная публикация США № 2010/0261620), адаптацию человеческого каркаса (патент США № 8,748,356) или супергуманизацию (патент США № 7,709, 226). В этих способах CDR исходных антител переносят на человеческие каркасы, которые можно выбирать на основании их общей гомологии с исходными каркасами, на основании сходства длины CDR или идентичности канонической структуры либо их комбинации.

Гуманизированные антитела могут быть дополнительно оптимизированы для улучшения их селективности или аффинности к требуемому антигену посредством включения измененных остатков, поддерживающих каркас, с сохранением аффинности связывания (обратных мутаций) такими методиками, которые описаны в международных патентных публикациях № WO1090/007861 и WO1992/22653, или посредством встраивания вариации в любую из CDR, например, для улучшения аффинности антитела.

Для получения человеческих антител против белка-мишени можно применять трансгенных животных, несущих в своем геноме локусы иммуноглобулинов (Ig) человека, таких как мыши, крысы, куры, которые описаны, например, в патенте США № 6,150,584, международной патентной публикации № WO99/45962, международных патентных публикациях № WO2002/066630, WO2002/43478, WO2002/043478 и WO1990/04036, Lonberg et al (1994) *Nature* 368:856-9; Green et al (1994) *Nature Genet.* 7:13-21; Green &

Jakobovits (1998) *Exp. Med.* 188:483-95; Lonberg and Huszar (1995) *Int Rev Immunol* 13:65-93; Bruggemann et al., (1991) *Eur J Immunol* 21:1323- 1326; Fishwild et al., (1996) *Nat Biotechnol* 14:845-851; Mendez et al., (1997) *Nat Genet* 15:146-156; Green (1999) *J Immunol Methods* 231:11-23; Yang et al., (1999) *Cancer Res* 59:1236-1243; Bruggemann and Taussig (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8:455-458. Эндогенные локусы иммуноглобулинов у таких животных можно разрывать или удалять, и в геном животного можно встраивать по меньшей мере один полный или частичный локус иммуноглобулина человека посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации, с применением трансхромосом или с применением минигенов. Такие компании, как Regeneron ([www. Regeneron.com](http://www.Regeneron.com)), Harbour Antibodies ([www. Harbourantibodies.com](http://www.Harbourantibodies.com)), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) ([www. Omtinc.net](http://www.Omtinc.net)), KyMab ([www. Kymab.com](http://www.Kymab.com)), Trianni ([www. Trianni.com](http://www.Trianni.com)) и Ablexis ([www. Ablexis.com](http://www.Ablexis.com)) могут быть задействованы для получения человеческих антител, направленных против выбранного антигена, с применением технологий, описанных выше.

Человеческие антитела можно выбирать из библиотеки фагового дисплея, причем фаг сконструирован с возможностью экспрессии человеческих иммуноглобулинов или их участков, таких как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные либо спаренные переменные области антител (Knappik et al., (2000) *J Mol Biol* 296:57-86; Krebs et al., (2001) *J Immunol Meth* 254:67-84; Vaughan et al., (1996) *Nature Biotechnology* 14:309-314; Sheets et al., (1998) *PITAS (USA)* 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter (1991) *J Mol Biol* 227:381; Marks et al., (1991) *J Mol Biol* 222:581). Антитела по изобретению могут быть выделены, например, из библиотеки фагового дисплея, экспрессирующей переменные области тяжелой и легкой цепей антитела в виде гибридных белков с белком оболочки бактериофага pIX, как описано в публикации Shi et al., (2010) *J Mol Biol* 397:385-96 и в международной патентной публикации № WO09/085462). В библиотеках можно проводить скрининг на связывание фагов с TMEFF2 или CD3 человека и/или яванского макака, и полученные положительные клоны могут быть дополнительно охарактеризованы; из лизатов клонов могут быть выделены Fab и экспрессированы в виде полноразмерных IgG. Такие способы использования фагового дисплея для выделения человеческих антител описаны, например, в патенты США № 5223409, 5403484, 5571698, 5427908, 5580717, 5969108, 6172197, 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081.

Получение иммуногенных антигенов и продукция моноклональных антител могут быть выполнены с применением любой приемлемой методики, такой как продукция рекомбинантного белка. Иммуногенные антигены можно вводить животным в форме очищенного белка или белковых смесей, включающих в себя целые клетки или клеточные либо тканевые экстракты, или антиген может быть образован *de novo* в организме животного из нуклеиновых кислот, кодирующих указанный антиген или его часть.

Создание биспецифических антител к TMEFF2/CD3 по изобретению

Биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 по изобретению могут быть получены путем комбинирования TMEFF2-связывающих доменов VH/VL, выделенных в данном документе, с любыми CD3-связывающими доменами VH/VL, включая описанные в данном

документе и общедоступные. Примерами CD3-связывающих доменов VH/VL, которые можно применять, являются домены антител CD3B219 и CD3B376, как описано в данном документе. Примеры TMEFF2-связывающих доменов VH/VL, которые можно использовать, представляют собой домены антител TMEB675, TMEB570, TMEB674, TMEB565, TMEB762 и TMEB757. Созданные биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 можно протестировать на их связывание с TMEFF2 и CD3 и на их желательные функциональные характеристики, такие как опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих TMEFF2 (например, LNCaP).

Биспецифические антитела изобретения можно создать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, вводя в СНЗ-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замены, способствующие образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием совместной экспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов. Восстанавливаются дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных областях исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидную связь тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй молекулы исходного моноспецифического антитела, и одновременно СНЗ-домены исходных антител высвобождаются и происходит переформирование путем диссоциации-ассоциации. СНЗ-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча, или полумолекулы, каждое из которых связывается с отдельным эпитопом, т.е. эпитопом на TMEFF2 и эпитопом на CD3. Например, биспецифические антитела по изобретению могут быть получены с использованием технологии DuoBody®, описанной в межд. пат. публ. № WO2011/131746. В случае антител IgG1 можно применять мутации F405L в одной тяжелой цепи и K409R в другой тяжелой цепи. Для антител IgG2 можно применять IgG2 дикого типа и антитело IgG2 с заменами F405L и R409K. Для антител IgG4 можно применять IgG4 дикого типа и антитело IgG4 с заменами F405L и R409K. Для создания биспецифических антител конструируют первое моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое двухвалентное антитело так, чтобы в области Fc они имели вышеупомянутую мутацию; антитела инкубируют вместе в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы остатки цистеина в шарнирных областях могли подвергаться изомеризации дисульфидной связи; получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально возвращать к невозстанавливающим. Иллюстративные восстанавливающие агенты, которые могут применяться, представляют собой 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиозеритритол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (TCSEF), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол. Например, можно использовать инкубирование

в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20 °C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-МЕА или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при уровне pH 5-8, например при pH=7,0 или при pH=7,4.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 представляет собой изотип IgG1 и содержит замену F405L в первой тяжелой цепи (HC1) и замену K409R во второй тяжелой цепи (HC2) по сравнению с IgG1 дикого типа с **SEQ ID NO: 84**.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 представляет собой изотип IgG4 и содержит замену F405L/R409K в HC2 по сравнению с IgG4 дикого типа с **SEQ ID NO: 85**.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 представляет собой изотип IgG4 и содержит замены S228P, F234A и L235A в HC1 и S228P, F234A, L235A, F405L и R409K в HC2 по сравнению с IgG4 дикого типа с **SEQ ID NO: 85**.

SEQ ID NO: 84 IgG1 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
N
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR
W
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 85 IgG4 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHDHPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
Y
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT
K
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQE
G
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO 103: IgG1, F405L

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
N
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
E

LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSR
W

QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 109: IgG1, K409R

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
N

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
E

LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSR
W

QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 104 IgG4-F405L/R409K

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
Y

RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT
K

NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQE
G

NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Биспецифические антитела можно также получать с таких применением конфигураций, как «выступ во впадину» (Genentech), CrossMAb (Roche) и электростатическое соответствие (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), LUZ-Y (Genentech), доменное антитело, сконструированное посредством обмена цепей (SEEDbody) (EMD Serono) и Biclonic (Merus).

Для получения полноразмерных биспецифических антител можно применять стратегию «выступ во впадину» (см., например, международную публикацию No. WO 2006/028936) выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СН3 в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СН3, способствуя образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с «впадиной» и тяжелой цепи с «выступом» образуется гетеродимер. Примерами пар замен в СН3, образующих выступ и впадину, являются следующие (указаны как модифицированное положение в первом домене СН3 первой тяжелой

цепи/модифицированное положение во втором домене CH3 второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Технология CrossMAb, в дополнение к использованию стратегии «выступ во впадину» для промотирования обмена Fab-плеча, использует замену домена CH1/CL в одной половине плеча, чтобы гарантировать правильное спаривание легкой цепи полученного биспецифического антитела (см., например, патент США № 8242247).

Для получения полноразмерных биспецифических антител по изобретению могут применяться другие стратегии перенаправления посредством обмена варибельного или константного или обоих доменов между тяжелой цепью и легкой цепью или внутри тяжелой цепи в биспецифических антителах (либо в одном, либо в обоих плечах). Такие обмены включают в себя, например, обмены VH-CH1 с VL-CL, VH с VL, CH3 с CL и CH3 с CH1, как описано в патентных публикациях № WO2009/080254, WO2009/080251, WO2009/018386 и WO2009/080252.

Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности CH3 и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности CH3, как описано в патентной публикации США № US2010/0015133; патентной публикации США № US2009/0182127; патентной публикации США № US2010/028637 или патентной публикации США № US2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать посредством следующих замен (указаны модифицированные положения в первом CH3-доме первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором CH3-доме второй тяжелой цепи): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в патентной публикации США № US2012/0149876 или патентной публикации США № US2013/0195849.

Для получения биспецифических антител по изобретению можно использовать технологию SEEDbody. Для стимуляции гетеродимеризации антитела SEEDbody в своих константных доменах имеют замену выбранных остатков IgG остатками IgA, как описано в патенте США № US20070287170.

Как правило, мутации получают на уровне ДНК в молекуле, такой как константный домен антитела, с помощью стандартных способов.

Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева

В изобретении также предложены выделенные полинуклеотиды, которые кодируют антитела к TMEFF2 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению. В изобретении также предложены выделенные полинуклеотиды, которые кодируют биспецифические антитела к TMEFF2/CD3 или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению. Выделенные полинуклеотиды, способные кодировать сегменты

вариабельных доменов, предлагаемые в настоящем документе, можно включать в одни и те же или разные векторы для продукции антител или антигенсвязывающих фрагментов. Полинуклеотид может быть комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислотой (кДНК) и может быть оптимизирован кодонами для экспрессии в приемлемом хозяине. Оптимизация по кодонам является хорошо известной технологией.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе полинуклеотиды (и пептиды, которые они кодируют) включают лидерную последовательность. Можно использовать любую лидерную последовательность, известную в данной области. Лидерная последовательность может включать в себя, сайт рестрикции или сайт инициации трансляции.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH антитела по изобретению, VL антитела по изобретению, тяжелую цепь антитела по изобретению или легкую цепь антитела по изобретению.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 25, 26, 27, 87 или 89.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий VL с SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 88 или 90.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий HC1, LC1, HC2 или LC2 антител к TMEFF2/CD3 по изобретению.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий HC1 с SEQ ID NO: 32, 33, 34, 91 или 93.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий LC1 с SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 92 или 94.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий HC2 с SEQ ID NO: 76 или 78.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий LC2 с SEQ ID NO: 77 или 79.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101 или 102.

В изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 105, 106, 80, 81, 107, 108, 82 и 83.

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие VH или VL, или их антигенсвязывающий фрагмент антител по изобретению, или тяжелую цепь и легкую цепь антител по изобретению, могут быть функционально связаны с одним или более регуляторными элементами, такими как промотор или энхансер, которые позволяют экспрессировать нуклеотидную последовательность в предполагаемой клетке-хозяине. Полинуклеотид может представлять собой кДНК.

В настоящем изобретении также предложен вектор, содержащий полинуклеотид настоящего изобретения. Такие векторы могут представлять собой плазмидные векторы,

вирусные векторы, векторы для экспрессии бакуловирусов, векторы на основе транспозонов или любые другие векторы, приемлемые для введения синтетического полинуклеотида настоящего изобретения в данный организм или в данное генетическое окружение любым способом. Например, полинуклеотиды, кодирующие переменные области легкой и/или тяжелой цепей антител по изобретению, необязательно соединенные с константными областями, встроены в экспрессионные векторы. Легкую и/или тяжелую цепи можно клонировать в одном или в разных экспрессионных векторах. Участки ДНК, кодирующие иммуноглобулиновые цепи, могут быть функционально связаны в экспрессионном (-ых) векторе (-ах) с управляющими последовательностями, обеспечивающими экспрессию иммуноглобулиновых полипептидов. К таким управляющим последовательностям относятся сигнальные последовательности, промоторы (например, естественно ассоциированные или гетерологичные промоторы), энхансерные элементы и последовательности терминации транскрипции, и их выбирают так, чтобы они были совместимы с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии антитела. После введения вектора в соответствующего хозяина проводят инкубацию хозяина в условиях, приемлемых для высокоуровневой экспрессии белков, кодируемых введенными полинуклеотидами.

К рекомбинантным экспрессионным векторам, входящим в объем описания, относятся синтетические или происходящие от кДНК фрагменты нуклеиновых кислот, которые кодируют по меньшей мере один рекомбинантный белок, такой как VH, VL, HC или LC антитела, который может быть функционально связан с приемлемыми регуляторными элементами. К таким регуляторным элементам могут относиться промотор транскрипции, последовательности, кодирующие приемлемые участки связывания мРНК с рибосомой, и последовательности, контролирующие терминацию транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы, особенно экспрессионные векторы млекопитающих, также могут включать в себя один или более нетранскрибируемых элементов, например точку начала репликации, приемлемый промотор и энхансер, связанные с экспрессируемым геном, другие 5' или 3' фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5' или 3' нетранслируемые последовательности (например, необходимые участки связывания с рибосомой), сайт полиаденилирования, донорный и акцепторный сайты сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Кроме того, может быть встроена точка начала репликации, обеспечивающая способность к репликации в клетке-хозяине.

Последовательности контроля транскрипции и трансляции в экспрессионных векторах, предназначенных для трансформации клеток позвоночных, могут быть получены из вирусных источников. Примеры векторов, которые можно сконструировать, описаны в публикации Okayama and Berg, 3 *Mol. Cell. Biol.* 280 (1983).

В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент, помещают под контроль эффективного конститутивного промотора, такого как, например, промоторы следующих генов: гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), аденозиндезаминазы, пируваткиназы,

бета-актина, человеческого миозина, человеческого гемоглобина, человеческого мышечного креатина и других. Кроме того, многие вирусные промоторы функционируют конститутивно в эукариотических клетках и являются приемлемыми для применения в описанных вариантах осуществления. К таким вирусным промоторам относятся, без ограничений, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), ранний и поздний промоторы SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Малони, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса Эпштейна - Барр (EBV), вируса саркомы Рауса (RSV) и других ретровирусов и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. В одном варианте осуществления кодирующую последовательность антитела к TMEFF2 или его антигенсвязывающего фрагмента помещают под контроль индуцибельного промотора, например промотора металлотионеина, промотора, индуцируемого тетрациклином, промотора, индуцируемого доксициклином, промоторов, содержащих один или более стимулируемых интерфероном реагирующих элементов (ISRE), как промоторы протеинкиназы R 2',5'-олигоаденилатсинтаз, генов Mx, ADAR1 и т. п.

Векторы, описанные в настоящем документе, могут содержать один или более участков внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение последовательности IRES в слитые векторы может быть полезно для усиления экспрессии некоторых белков. В некоторых вариантах осуществления векторная система может включать в себя один или более участков полиаденилирования (например, SV40), которые могут находиться выше или ниже любой из вышеупомянутых последовательностей нуклеиновых кислот. Компоненты вектора могут быть сшиты друг с другом или расположены так, чтобы обеспечить оптимальное разнесение в пространстве для экспрессии генных продуктов (т. е. путем введения «спейсерных» нуклеотидов между открытыми рамками считывания (ORF)), или расположены другим способом. Регуляторные элементы, такие как мотив IRES, также могут быть расположены с возможностью обеспечения оптимального разнесения в пространстве для экспрессии.

Векторы могут содержать селективные маркеры, хорошо известные в данной области. Селективные маркеры включают в себя маркеры положительной и отрицательной селекции, гены резистентности к антибиотикам (например, ген резистентности к неомизину, ген резистентности к гигромицину, ген резистентности к канамицину, ген резистентности к тетрациклину, ген резистентности к пенициллину), гены глутаматсинтазы, HSV-TK, производные HSV-TK для ганцикловирной селекции или ген бактериальной пуриноклеозидфосфорилазы для селекции по 6-метилпурину (Gadi et al., 7 *Gene Ther.* 1738-1743 (2000)). Нуклеотидная последовательность, кодирующая селективный маркер или сайт клонирования, может располагаться выше или ниже нуклеотидной последовательности, кодирующей интересующий полипептид или сайт клонирования.

Примерами векторов, которые могут применяться, являются бактериальные: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, Ла-Холья, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США); pTgc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540

и pRIT5 (Pharmacia, г. Уппсала, Швеция). Эукариотические: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (Pharmacia), pEE6.4 (Lonza) и pEE12.4 (Lonza).

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 25 и/или VL с SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 39 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 26 и/или VL с SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 40 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 27 и/или VL с SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 41 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 26 и/или VL с SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 40 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 45.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 87 и/или VL с SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 95 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 89 и/или VL с SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 99 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 100.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 66 и/или VL с SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 105 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 106.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 74 и/или VL с SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 107 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий HC с SEQ ID NO: 32 и/или LC с SEQ ID NO: 35.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 46 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 49.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид,

кодирующий HC с SEQ ID NO: 33 и/или LC с SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 47 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 50.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий HC с SEQ ID NO: 34 и/или LC с SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 48 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 51.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий HC с SEQ ID NO: 33 и/или LC с SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 47 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 52.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 91 и/или VL с SEQ ID NO: 92.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 97 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 98.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH с SEQ ID NO: 93 и/или VL с SEQ ID NO: 94.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 101 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 102.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий HC с SEQ ID NO: 76 и/или LC с SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 80 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 81.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий HC с SEQ ID NO: 78 и/или LC с SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид с SEQ ID NO: 82 и/или полинуклеотид с SEQ ID NO: 83.

Векторы, описанные в настоящем документе, можно использовать для трансформации различных клеток генами, кодирующими описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Например, векторы можно использовать для получения клеток, продуцирующих антитело к TMEFF2 или антигенсвязывающий фрагмент. Таким образом, в данном изобретении также предложены клетки-хозяева, содержащие один или более векторов настоящего изобретения.

Методики введения в клетки чужеродных генов известны и могут быть использованы для конструирования рекомбинантных клеток по данному изобретению.

Термин «клетка-хозяин» относится к клетке, в которую был встроен вектор. Следует понимать, что термин «клетка-хозяин» служит для обозначения не только конкретной заявленной клетки, но и потомства такой клетки, а также стабильной клеточной линии, полученной из конкретной заявленной клетки. Так как в последующих поколениях могут возникать некоторые модификации вследствие либо мутации, либо воздействий среды,

такое потомство может быть неидентичным исходной клетке, но оно также может быть охвачено термином «клетка-хозяин», используемым в настоящем документе.

Такими клетками-хозяевами могут быть эукариотические, прокариотические, растительные клетки или клетки архей. Кишечная палочка (*Escherichia coli*), бациллы, такие как сенная палочка (*Bacillus subtilis*), и другие энтеробактерии, такие как сальмонеллы, серратия и различные виды псевдомонад, являются примерами прокариотических клеток-хозяев. Для экспрессии также можно использовать другие микроорганизмы, такие как дрожжи. Сахаромицеты (например, *S. cerevisiae*) и *Pichia* являются примерами приемлемых дрожжевых клеток-хозяев. Примерами эукариотических клеток могут быть клетки млекопитающих, насекомых, птиц или другие клетки животного происхождения. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные клеточные линии, такие как гибридомы или клеточные линии миеломы, например мышинные клеточные линии SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Примером клеточной линии миеломы человека является U266 (ATCC CRL-TIB-196). Другие используемые клеточные линии включают в себя линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), например, CHOK1SV (Lonza Biologics, г. Уолкерсвилл, штат Мэриленд, США), Potelligent® CHOK2SV (Lonza), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

Клетки, трансформированные экспрессионными векторами, описанными в настоящем документе, можно подвергнуть селекции или скринингу для рекомбинантной экспрессии антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Положительные по рекомбинации клетки размножают и проводят скрининг субклонов, проявляющих нужный фенотип, например высокий уровень экспрессии, усиленные характеристики роста или способность вырабатывать белки с нужными биохимическими свойствами, например, вследствие модификации белков или видоизмененных посттрансляционных модификаций. Эти фенотипы могут быть обусловлены внутренними свойствами данного субклона или мутацией. Мутации можно осуществлять путем применения химических агентов, УФ-света, радиации, вирусов, инсерционных мутагенов, ингибирования восстановления ошибок спаривания ДНК или комбинации таких способов.

В изобретении также предложен способ продукции антитела по изобретению, включающий в себя культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях экспрессии антитела и выделение антитела, продуцированного клеткой-хозяином. Способы получения антител и их очистки хорошо известны специалистам в данной области. После синтеза (химического либо рекомбинантного) полные антитела, их димеры, отдельные легкие и/или тяжелые цепи или другие фрагменты антител, такие как VH и/или VL, можно очищать в соответствии со стандартными процедурами, включающими осаждение сульфатом аммония, применение аффинных колонок, колоночную хроматографию,

высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), электрофорез в геле и т. п. (по существу см. Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982)). Заявленное антитело может быть по существу чистым, например, чистым на по меньшей мере от около 80% до 85%, чистым на по меньшей мере от около 85% до 90%, чистым на по меньшей мере от около 90% до 95%, чистым на по меньшей мере от около 98% до 99% или более, например, не содержащим загрязняющих веществ, таких как клеточный дебрис, макромолекулы и т. д., отличных от заявленного антитела.

Полинуклеотидные последовательности по изобретению могут быть включены в векторы с применением стандартных способов молекулярной биологии. Трансформацию клетки-хозяина, культивирование, экспрессию и очистку антитела выполняют с применением хорошо известных способов.

В изобретении также предложен способ получения антитела к TMEFF2 по изобретению, включающий:

объединение в экспрессионном векторе первого полинуклеотида, кодирующего VH антитела, и второго полинуклеотида, кодирующего VL антитела;

трансформацию этим экспрессионным вектором клетки-хозяина;

культивирование клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, в которых экспрессируются VL и VH и образуется антитело; и

выделение антитела из клетки-хозяина или культуральной среды.

Фармацевтические композиции/введение

В изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело изобретения и фармацевтически приемлемый носитель. Для терапевтического применения возможна подготовка антител по изобретению в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество антитела в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или несущей среде, с которыми вводят антитело настоящего изобретения. Такие несущие среды могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Например, можно применять 0,4%-й солевой раствор и 0,3%-й раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с применением хорошо известных стандартных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH и буферные агенты, стабилизирующие, загущающие, увлажняющие и окрашивающие агенты и т. д. Концентрация антител по изобретению в таком фармацевтическом составе может варьировать от менее около 0,5%, обычно по меньшей мере около 1% и до 15 или 20% вес., и может выбираться преимущественно на основании необходимой дозы, объемов текучей среды, значений вязкости и т. д. в соответствии с выбранным способом введения.

Приемлемые несущие среды и составы, включающие другие человеческие белки, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, см., в особенности pp. 958-989.

Способом введения антител по изобретению может быть любой приемлемый путь, такой как парентеральное введение, например внутрикожное, внутримышечное, внутривенное или подкожное, трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное) или другие способы, известные специалисту, как хорошо известно в данной области.

Антитела по изобретению также можно вводить профилактически, чтобы снизить риск развития заболевания, такого как рак.

Таким образом, фармацевтическую композицию изобретения для внутримышечной инъекции можно получать с содержанием 1 мл стерильной забуференной водой и от около 1 нг до около 100 мг/кг, например от около 50 нг до около 30 мг/кг или, предпочтительнее, от около 5 мг до около 25 мг/кг антитела изобретения.

Способы применения антител к TMEFF2 и биспецифических антител к TMEFF2/CD3

В изобретении также предложен способ лечения TMEFF2-положительного рака у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента для лечения TMEFF2-положительного рака.

В изобретении также предложен способ лечения TMEFF2-положительного рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела к TMEFF2 или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению субъекту, подлежащему лечению TMEFF2-положительного рака.

Предполагается участие множества генов в развитии рака предстательной железы. Одним из белков, участвующих в развитии и прогрессировании рака предстательной железы и, таким образом, являющихся перспективной мишенью для новых терапевтических средств против рака предстательной железы, является трансмембранный белок с EGF-подобными и двумя фоллистатин-подобными доменами (TMEFF2). TMEFF2 представляет собой трансмембранный белок типа I, состоящий из двух фоллистатин-подобных доменов (FS), EGF-подобного домена, трансмембранного (TM) домена и короткого цитоплазматического хвоста. Самая высокая экспрессия белка TMEFF2 была обнаружена в двух органах: головном мозге и предстательной железе (Liang et al. 2000; Horie et al. 2000). Повышенная экспрессия TMEFF2 также была обнаружена в клеточных линиях рака предстательной железы и клинических образцах (Glynne-Jones et al. 2001; Gery et al. 2002; Afar et al. 2004), что указывает на то, что TMEFF2 играет значительную роль в прогрессировании рака предстательной железы. Экспрессия гена Tmeff2 находится под контролем андрогенного рецептора. У большого числа андрогензависимых онкологических пациентов наблюдались высокие уровни мРНК TMEFF2.

Таким образом, антитела к TMEFF2 могут быть потенциально важными инструментами диагностики, прогноза или лечения рака предстательной железы.

Предполагается, что термин «рак» включает в себя все типы раковых разрастаний или онкогенных процессов, метастазирования в тканях или злокачественной трансформации клеток, тканей или органов независимо от типа гистопатологии или стадии инвазивности. Примеры TMEFF-положительного рака включают рак предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой аденокарциному.

В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой метастатический рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы метастазировал в прямую кишку, лимфатический узел или кость, либо их любую комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой рецидивирующий или рефрактерный рак предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы чувствителен к андроген-депривационной терапии.

В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы не чувствителен к андроген-депривационной терапии.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в терапии.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении TMEFF2-положительного рака.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении рака предстательной железы TMEFF2.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для производства лекарственного средства для лечения TMEFF2-положительного рака.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении TMEFF2-положительного рака, такого как рак предстательной железы, причем биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 содержит первый домен, который связывается с TMEFF2, и второй домен, который связывается с CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первую тяжелую цепь (HC1) с SEQ ID NO: 32, первую легкую цепь (LC1) с SEQ ID NO: 35, вторую тяжелую цепь (HC2) с SEQ ID NO: 76 и вторую легкую цепь (LC2) с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении TMEFF2-положительного рака, такого как рак предстательной железы, причем биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 содержит первый домен, который связывается с TMEFF2, и второй домен, который связывается с CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 32, LC1 с SEQ ID NO: 35, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении TMEFF2-положительного рака, такого как рак предстательной железы, причем биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 содержит первый домен, который связывается с TMEFF2, и второй домен, который связывается с CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 36, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении TMEFF2-положительного рака, такого как рак предстательной железы, причем биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 содержит первый домен, который связывается с TMEFF2, и второй домен, который связывается с CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 36, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении TMEFF2-положительного рака, такого как рак предстательной железы, причем биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 содержит первый домен, который связывается с TMEFF2, и второй домен, который связывается с CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 34, LC1 с SEQ ID NO: 37, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении TMEFF2-положительного рака, такого как рак предстательной железы, причем биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 содержит первый домен, который связывается с TMEFF2, и второй домен, который связывается с CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 34, LC1 с SEQ ID NO: 37, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении TMEFF2-положительного рака, такого как рак предстательной железы, причем биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 содержит первый домен, который связывается с TMEFF2, и второй домен, который связывается с CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, а второй домен

содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 38, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении TMEFF2-положительного рака, такого как рак предстательной железы, причем биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 содержит первый домен, который связывается с TMEFF2, и второй домен, который связывается с CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 38, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении TMEFF2-положительного рака, такого как рак предстательной железы, причем биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 содержит первый домен, который связывается с TMEFF2, и второй домен, который связывается с CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 91, LC1 с SEQ ID NO: 92, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении TMEFF2-положительного рака, такого как рак предстательной железы, причем биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 содержит первый домен, который связывается с TMEFF2, и второй домен, который связывается с CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 91, LC1 с SEQ ID NO: 92, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении TMEFF2-положительного рака, такого как рак предстательной железы, причем биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 содержит первый домен, который связывается с TMEFF2, и второй домен, который связывается с CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 93, LC1 с SEQ ID NO: 94, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в лечении TMEFF2-положительного рака, такого как рак предстательной железы, причем биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 содержит первый домен, который связывается с TMEFF2, и второй домен, который связывается с CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 93, LC1 с SEQ ID NO: 94, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

Антитела по изобретению можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой хирургическое вмешательство, химиотерапию, терапию по депривации андрогенов или лучевую терапию, или любую их комбинацию.

Наборы

В изобретении также предложен набор, содержащий антитело к TMEFF2 или биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 по изобретению. Набор можно применять для терапевтических областей применения или в виде диагностических наборов. Набор можно применять для обнаружения наличия TMEFF2, CD3 или TMEFF2 и CD3 в образце.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело по изобретению и

реактивы для обнаружения антитела. Набор может содержать один или более из других элементов: инструкцию по применению; другие реагенты, например метку, терапевтический агент или агент, используемый для хелатирования или иного сочетания, антитело для мечения, или терапевтический агент, или радиозащитную композицию; устройства или другие материалы для подготовки антитела к введению; фармацевтически приемлемые носители и устройства или другие материалы для введения пациенту.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело по изобретению, находящееся в контейнере, и инструкции по применению набора.

В некоторых вариантах осуществления антитело в наборе является меченым.

В изобретении также предложен набор, содержащий антитело к TMEFF2, содержащее VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28.

В изобретении также предложен набор, содержащий антитело к TMEFF2, содержащее VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29.

В изобретении также предложен набор, содержащий антитело к TMEFF2, содержащее VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30.

В изобретении также предложен набор, содержащий антитело к TMEFF2, содержащее VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31.

В изобретении также предложен набор, содержащий антитело к TMEFF2, содержащее VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88.

В изобретении также предложен набор, содержащий антитело к TMEFF2, содержащее VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90.

В изобретении также предложен набор, содержащий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67.

В изобретении также предложен набор, содержащий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75.

В изобретении также предложен набор, содержащий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67.

В изобретении также предложен набор, содержащий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75.

В изобретении также предложен набор, содержащий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL SEQ

ID NO: 30, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67.

В изобретении также предложен набор, содержащий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL SEQ ID NO: 30, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75.

В изобретении также предложен набор, содержащий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67.

В изобретении также предложен набор, содержащий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75.

В изобретении также предложен набор, содержащий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67.

В изобретении также предложен набор, содержащий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75.

В изобретении также предложен набор, содержащий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67.

В изобретении также предложен набор, содержащий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75.

Способы обнаружения доменов TMEFF2 или CD3

В изобретении также предложен способ обнаружения TMEFF2 в образце, включающий получение образца, приведение образца в контакт с антителом к TMEFF2 изобретения и обнаружение в образце антитела, связанного с TMEFF2.

В изобретении также предложен способ обнаружения TMEFF2 и CD3 в пробе, включающий в себя получение пробы, приведение пробы в контакт с биспецифическим антителом TMEFF2/CD3, которое содержит первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, по изобретению и обнаружение антитела, связанного с TMEFF2 и CD3, в образце.

В некоторых вариантах осуществления пробу можно получать из мочи, крови, сыворотки крови, плазмы крови, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток,

циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т. е. свободных клеток), тканей (например, резецированной хирургическим путем опухолевой ткани, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т. п.

Описанные в данном документе антитела по изобретению, связанные с TMEFF2 или TMEFF2 и CD3, могут быть обнаружены известными методами. Примеры способов включают в себя прямое мечение антител с использованием флуоресцентных или хемилюминесцентных меток или радиоактивных меток или присоединение к антителам по изобретению легко обнаруживаемой функциональной группы, такой как биотин, ферменты или эпитопные метки. Примерами меток и функциональных групп являются рутений, ¹¹¹In-DOTA, ¹¹¹In-диэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA), пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и бета-галактозидаза, полигистидин (His-метка), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители и красители Alexafluor®.

Антитела по изобретению можно применять в разнообразных анализах для обнаружения TMEFF2, TMEFF2 или CD3 в образце. Примерами анализов являются анализ методом вестерн-блоттинга, радиоиммунологический анализ, поверхностный плазмонный резонанс, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммуноанализ, иммуногистохимический анализ, сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или твердофазный ИФА.

Далее настоящее изобретение будет описано со ссылкой на приведенные ниже конкретные примеры, не имеющие ограничительного характера.

Пример 1. Генерация антигена

Человеческий внеклеточный домен (ECD) TMEFF2 получали по последовательности с UniProt с номером доступа Q9UIK5. Конструкция ECD была сконструирована с последовательностями 6X His-меткой и Avi-меткой на С-конце (конструкция TMEW1; **SEQ ID NO: 6**). Конструкцию, содержащую домены FS2 и EGF (аминокислоты 151-320 конструировали в виде слияния человеческого сывороточного альбумина (HSA) с последовательностями 6X His-метки и Avi-метки (конструкция TMEW7; **SEQ ID NO: 7**). Конструкцию, содержащую мембранный проксимальный домен TMEFF2 (остатки 230-320), сконструировали с 6xHis-меткой (конструкция TMEW19; **SEQ ID NO: 8**) или слитые с крысиным Fc IgG1 с His-меткой (конструкция TMEW20; **SEQ ID NO: 9**). Остатки 230-320 TMEFF2 содержат EGF домен, который охватывает остатки 261-301 TMEFF2. Экспрессионные конструкции ECD человеческого TMEFF2 временно трансфицировали в клетки, полученные из HEK293, Expi293 (Gibco/Thermo Fisher Scientific), с использованием Expiectamine в соответствии с протоколом производителя. Перед сбором клетки инкубировали в течение 5 суток при 37 °C в атмосфере с 8% CO₂ на орбитальной качалке. Экспрессированные клетки удаляли центрифугированием, а растворимые белки TMEFF2 с His-метками очищали от среды с использованием аффинной хроматографии на иммобилизованных металлах с использованием смолы Fast Flow Ni

Sephacrose 6 (GE Healthcare) с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией на Superdex 200 (SEC) (GE Healthcare) в фосфатном буфере Дульбекко с pH 7,2 (1х ФСБД). Аминокислотные последовательности генерированных антигенов показаны в **таблице 3**.

Таблица 3.

Идентификатор белка по АА	Описание	Аминокислотная последовательность
TMEW1 (SEQ ID NO: 6)	TMEFF2-FL-ECD-His-Avi-метка	FPTSLSDCQTPTGWNC SGYDDRENDLFLCDT NTCKFDGECLRIGDTVTCVCQFKCNNDYVPV CGSNGESYQNECYLRQAACKQQSEILVVSEG SCATDAGSGSGDGVHEGSGETSQKETSTCDIC QFGAECDEDAEDVWCVCNIDCSQTNFNPLCA SDGKSYDNACQIKEASCQKQEKIEVMSLGRC QDNTTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLEESA REHHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCR CDAGYTGQHCEKKDYSVLYVVP GPVRFQYV GGGSHHHHHHLNDIFEAQKIEWHE
TMEW7 (SEQ ID NO: 7)	FS2-EGF-Tev-HSA(C34S)-His-Avi-метка	SGETSQKETSTCDICQFGAECDEDAEDVWCV CNIDCSQTNFNPLCASDGKSYDNACQIKEASC QKQEKIEVMSLGRCQDNTTTTTTKSEDGHYAR TDYAENANKLEESAREHHIPCPEHYNGFCMH GKCEHSINMQEPSCRC DAGYTGQHCEKKDYS VLYVVP GPVRFQYVVGSGSGSENLYFQGV RSS SDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQY LQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDVM CTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELL FFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL R DEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAV ARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCH GDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVE SKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDY SVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQYKFKQ

		NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGS KCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHE KTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETY VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAL VELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGS HHHHHHLNDIFEAQKIEWHE
TMEW19 (SEQ ID NO: 8)	spTMEFF2(230- 320)G3S-H6	NTTTTTSKSEDGHYARTDYAENANKLEESARE HHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAGYTGQHCEKKDYSVLVVPGPVRFQYVG GGSHHHHHH
TMEW20 (SEQ ID NO: 9)	spTMEFF2(230- 320)-G3S-FcIgG1 крысы	NTTTTTSKSEDGHYARTDYAENANKLEESARE HHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAGYTGQHCEKKDYSVLVVPGPVRFQYVG GGSPRNCGGDCKPCICTGSEVSSVFIPPKPKD VLTITLTPKVTCVVVDISQDDPEVHFSWFVDD VEVHTAQTRPPEEQFNSTFRSVSELPILHQDW LNGRTFRCKVTSAAFPSPIEKTISKPEGRTQVP HVVYTMSPKTKEEMTQNEVSITCMVKGFYPPI YVEWQMNGQPQENYKNTPTMDTDGSYFLY SKLNVKKEKWQQGNTFTCSVLHEGLHNHNT EKSLSHSPGKGGGSHHHHHH

Пример 2. Создание антител к TMEFF2

Создание антител с использованием трансгенных крыс, экспрессирующих локусы иммуноглобулина человека (OmniRat®)

Крысы OmniRat® содержат химерный человеческий/крысиный локус IgH (содержащий 22 человеческих сегмента V_{Hs} , все человеческие сегменты D и J_H в естественной конфигурации, связанные с крысиным локусом C_H), а также полностью человеческие локусы IgL (12 V_{ks} , связанных с J_k - C_k , и 16 V_{ls} , связанных с J_l - C_l). (см. например, Osborn, et al. (2013) J Immunol 190(4): 1481-1490). Соответственно, крысы демонстрируют сниженную экспрессию крысиного иммуноглобулина, и в ответ на иммунизацию внедренные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепей переключаются на экспрессию другого класса и подвергаются соматической мутации для создания высокоаффинных химерных человеческих/крысиных моноклональных антител IgG с полностью человеческими вариабельными областями. Получение и применение OmniRat® и геномные модификации в таких крысах описаны в WO14/093908.

OmniRat иммунизировали конструкцией TMEFF2 человека FS2-EGF-Tev-

HSA(C34S)-His-Avi-метка (TMEW7, SEQ ID NO: 7) и стимулировали конструкцией spTMEFF2 (230-320)G3S-FcIgG1 крысы (TMEW20, SEQ ID NO: 9). После 89 дневной схемы иммунизации собирали лимфатические узлы крыс и использовали их для создания гибридом, а супернатанты гибридом подвергали скринингу на связывание с белком человеческого TMEFF2-FL-ECD-His-Avi-метка (TMEW1) с помощью ИФА и/или SPARCL (люминесценция в аналитическом реагенте пространственной близости). Несколько супернатантов были отобраны для вторичного ELISA и SPARCL-скрининга связывания с TMEFF ECD, FS2-EGF или доменом EGF только TMEFF2. На основании результатов скрининга несколько клонов гибридомы секвенировали, экспрессировали и охарактеризовали по функциональности.

Создание антител из библиотек фаговых дисплеев

Fab, связывающие TMEFF2, были выбраны стандартными методами из двух наборов библиотек фагового дисплея *de novo* pIX, как описано в Shi *et al.*, J Mol Biol 397:385-96, 2010 и WO2009/085462). Вкратце, два набора библиотек, называемые V3.0 и V5.0, создавали путем диверсификации человеческих каркасов, в которых гены VH зародышевой линии IGHV1-69*01, IGHV3-23*01 и IGHV5-51*01 рекомбинировали с человеческим минигеном IGJ-4 *посредством* петли H3 (миниген IGJ-6 также использовался в V5.0), а человеческие гены VL-каппа зародышевой линии O12 (IGKV1-39*01), L6 (IGKV3-11*01), A27 (IGKV3-20*01) и B3 (IGKV4-1*01) рекомбинировали с минигеном IGKJ-1 для сборки полных доменов VH и VL. Для диверсификации были выбраны положения в переменных областях тяжелой и легкой цепей вокруг петель H1, H2, L1, L2 и L3, которые часто контактируют с белковыми и пептидными антигенами. Диверсификация последовательности в выбранных положениях ограничивалась остатками, встречающимися в каждом положении в семействах генов зародышевой линии IGHV или IGLV для соответствующих генов IGHV или IGLV. Диверсификацию в петле H3 создавали с использованием синтетических петель коротких или средних размеров длиной 7-14 аминокислот для библиотек V3.0 и длиной 6-19 аминокислот для библиотек V5.0. Распределение аминокислот в H3 выполняли аналогично наблюдаемой вариации аминокислот в человеческих антителах. Каркасы, использованные для создания библиотек, получали название в соответствии с их происхождением от человеческого гена зародышевой линии VH и VL. В обоих наборах V3.0 и V5.0 каждую из трех библиотек тяжелых цепей объединяли с четырьмя легкими цепями зародышевой линии или библиотеками легких цепей зародышевой линии для создания 12 уникальных комбинаций VH:VL для каждого набора библиотек, используемых в экспериментах по отбору.

Клонирование V-области

Общую РНК из лизатов клеток гибридомы фага очищали с использованием набора RNeasy 96 (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Полученную РНК количественно определяли с использованием Drop Sense и либо хранили при -80 °C, либо использовали для синтеза кДНК с использованием системы синтеза SuperScript III First-Strand методом ОТ-ПЦР (Invitrogen). Синтез кДНК первой цепи проводили с

использованием ген-специфических праймеров, отождествленных с константными участками тяжелой, каппа- и лямбда-цепей соответственно. Реакционную смесь для ОТ-ПЦР, содержащую до 3 мкг очищенной РНК, ген-специфического праймера, смеси дНТФ, реакционного буфера, 25 mM MgCl₂, DTT, RNaseOUT™ (40 Ед/мкл, Invitrogen) и SuperScript™ III RT (200 Ед/мкл, Invitrogen, № по кат. 18080-051), инкубировали при 50°C в течение 50 минут и при 85°C в течение 5 минут. Полученную одноцепочечную кДНК хранили при - 20°C или использовали непосредственно для ПЦР-амплификации. Реакцию ПЦР проводили с использованием Pfx полимеразы Platinum (Invitrogen). Фрагменты ν -области амплифицировали путем отжига прямого и обратного праймеров с лидерными последовательностями и константными областями тяжелой, каппа- и лямбда-цепей соответственно с использованием оптимизированных условий ПЦР. Полученные ПЦР-фрагменты секвенировали, аминокислотные последовательности выделенных ν -областей оптимизировали по кодонам и клонировали в экспрессионный вектор на основе pUnderd, несущий константную область IgG4 с мутациями S228P, F234A и L235A (изотип IgG4PAA).

Трансфекция и очистка Expi293 в малых масштабах

Выбранные антитела, идентифицированные в ходе операций иммунизации или фагового дисплея, клонировали и экспрессировали как IgG1PAA и очищали в небольшом объеме 2 мл. Клетки Expi293™ (ThermoFisher Scientific) высевали с плотностью $1,25 \times 10^5$ – $2,25 \times 10^5$ жизнеспособных клеток/мл в среде экспрессии Expi293™ и культивировали в встряхиваемых колбах объемом 125 мл - 2 л при 37 °C, 7% CO₂. Клетки пересевали, когда плотность достигала логарифмической фазы роста при 3×10^6 – 5×10^6 жизнеспособных клеток/мл с 98-99% жизнеспособности.

В день трансфекции определяли плотность жизнеспособных клеток и процент жизнеспособности. Клетки трансфицировали с плотностью 3×10^6 жизнеспособных клеток/мл в соответствии с протоколом трансфекции производителя (ThermoFisher, публикация № MAN0007814). Культуру собирали на 6 сутки после трансфекции путем центрифугирования при 850xG в течение 15 минут перед очисткой. Антитела очищали из осветленных супернатантов с использованием смолы mAb Select Sure (GE Healthcare) и диализировали в PBS. Концентрации белка определяли путем измерения A280 нм на фильтрате с помощью прибора DropSense (Trinean).

Пример 3. Характеризация антител к TMEFF2

Антитела к TMEFF2 связывают TMEFF2 с высокой аффинностью

Связывание выбранных антител IgG4PAA к TMEFF2 с ECD TMEFF2 (TMEW1: TMEFF2-FL ECD-His-Avi-метка) и/или мембранной проксимальной областью (TMEW19: spTMEFF2(230-320)G3S-H6) оценивали с использованием Proteon (TMEB674, TMEB675, TMEB 565 и TMEB570) или Biacore SPR (TMEB762 и TMEB757). Кинетические параметры связывания выбранных антител приведены в таблице 4. Было обнаружено, что антитела к TMEFF2 связываются как с мембранной проксимальной областью TMEFF2 ECD, так и с TMEFF2 с пикомолярной аффинностью.

Таблица 4.

Антитело	Антиген	Домен TMEFF2	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (нМ)
TMEB674	TMEW1	ECD	2,01E+06	1,62E-04	0,10
TMEB674	TMEW19	МП*	8,37E+05	1,75E-04	0,20
TMEB675	TMEW1	ECD	2,65E+06	1,53E-04	0,10
TMEB675	TMEW19	МП	9,72E+05	1,58E-04	0,20
TMEB565	TMEW1	ECD	3,84E+05	9,13E-06	0,02
TMEB565	TMEW19	МП	7,77E+05	6,39E-06	0,01
TMEB570	TMEW1	ECD	4,64E+05	5,13E-05	0,11
TMEB570	TMEW19	МП	7,62E+05	4,67E-05	0,06
TMEB762	TMEW1	ECD	5,41E+05	1,74E-04	0,32
TMEB757	TMEW1	ECD	5,42E+05	1,67E-04	0,31
*МП: мембранная проксимальная область					

ППР ProteOn

Связывание mAb к TMEFF2 с ECD и мембранной проксимальной областью TMEFF2 человека измеряли методом ППР ProteOn (Bio-Rad). Очищенные mAb (разведенные до конечной концентрации 1 мкг/мл в PBST) использовали в качестве лигандов в анализе и иммобилизовали посредством захвата Fc к антителам козьего античеловеческого (GAN) Fc IgG. Для аминного связывания GAN Fc IgG смесь 1:1 EDC (40 мМ) и NHS (10 мМ) смешивали непосредственно перед инъекцией для активации поверхности чипа и вводили в вертикальную ориентацию. Затем антитело GAN-Fc (30 мкг/мл) в ацетатном буфере (pH 5,0) пропускали по поверхности в течение 300 секунд при 30 мкл/мин в вертикальной ориентации. Впоследствии любые оставшиеся реакционноспособные карбоксильные группы на поверхности деактивировали путем инъекции 1 М этаноламина (pH 8,5) в той же ориентации. Антитела использовали в концентрации 1 мкг/мл для иммобилизации. Антитела протекали по поверхности в горизонтальном направлении. Человеческий ECD TMEFF2 или проксимальную область мембраны в серии 3-кратных разбавлений 5 концентраций (самая высокая концентрация в диапазоне 100-600 нМ) протекали в качестве анализата в вертикальной ориентации для связывания с захваченными молекулами. Буферный образец также вводили в 6-й канал в вертикальном направлении для контроля любого смещения исходного сигнала. Стадии ассоциации и диссоциации для всех концентраций отслеживали в течение 3 минут и 30 (или 15) минут соответственно при скорости потока 100 мкл/мин. Связывающую поверхность регенерировали для следующего цикла взаимодействия с использованием 18 секундного импульса 0,8% фосфорной кислоты для удаления связанного антигена. Исходные данные обрабатывали путем вычитания двух наборов эталонных данных из данных ответа: 1) сигналы между пятнами для коррекции неспецифических взаимодействий между антигеном и пустой поверхностью чипа; 2) сигналы пустого канала (где через чип пропускали только PBST) для коррекции неспецифического смещения исходного уровня.

ППР Biacore 8 K

Связывание mAb к TMEFF2 с человеческим ECD TMEFF2 измеряли методом ППР Biacore 8 K. Формат анализа заключался в захвате mAb с помощью поверхности Fc человека

высокой плотности с последующей инъекцией титрования концентрации TMEFF2 человека с помощью метода кинетики одного цикла. Козьи антитела к человеческому Fc IgG (Jackson ImmunoResearch, № по кат. 109-005-098) напрямую иммобилизовали посредством аминного связывания в концентрации 30 мкг/мл в 10 mM ацетатном буфере, pH 4,5, на проточных ячейках 1 и 2 на чипе датчика CM5 (GE) со скоростью потока 30 мкл/мин в буфере HBSP (GE). MAб захватывали на поверхности антител к человеческому Fc IgG с концентрацией 0,5 мкг/мл (~ 200-300 OE) на проточной кювете 2. Затем рабочий буфер заменяли на HBSP+100 мкг/мл BSA. ECD TMEFF2 с концентрацией 30 нМ в серии разведений в 3 раз вводили от низкой до высокой концентрации с использованием метода кинетики с одним циклом. Скорость диссоциации отслеживали через 30 минут после последнего введения или введения наибольшей концентрации, а затем поверхность регенерировали, используя 0,8% фосфорную кислоту (Bio-Rad). Также проводили холостой анализ буферного раствора, захватывая те же mAb и используя те же условия анализа образца. Исходные данные обрабатывали путем вычитания двух наборов эталонных данных из данных ответа: 1) эталонная проточная кювета 1 вычтена из проточной кюветы 2 и 2) с пустым буфером из экспериментального прогона. Обработанные данные для всех концентраций для каждого mAb в целом соответствовали простой модели связывания Ленгмюра 1:1 для получения оценок констант кинетики (k_{on} , k_{off}) и аффинности (KD).

Термостабильность антител к TMEFF2

TMEB675 показал более низкий, чем обычный профиль термостабильности методом ДСК (дифференциальная сканирующая калориметрия) с началом разворачивания $T_m = 52^\circ\text{C}$ и первым термическим переходом (T_{m1}) при $60,4^\circ\text{C}$. Более точное исследование последовательности TMEB675 (см. пример 4) показало наличие соматических гипермутаций (SHM) в каркасной области тяжелой и легкой цепей. Несколько реконструированных вариантов субклонировали, экспрессировали, очищали и профилировали методом ДСК. Полученные mAb TMEB762 и TMEFB757 продемонстрировали желаемый профиль термостабильности ($T_{m1} = 69,4^\circ\text{C}$ и $T_{m1} = 69,7^\circ\text{C}$ соответственно). По сравнению с TMEB675, TMEB762 имело следующие аминокислотные модификации в тяжелой цепи: R14P, P20L и H81Q, тогда как TMEFB757 имело следующие аминокислотные модификации в тяжелой цепи: R14P и P20L. По сравнению с TMEB675, TMEB762 имело следующие аминокислотные модификации в легкой цепи: A1D и A91P, тогда как TMEFB757 имело модификацию A91P в легкой цепи. Нумерация остатков соответствует схеме Кабат. Кинетические параметры связывания TMEB675, TMEB762 с TMEFF2 ECD приведены в таблице 4.

Пример 4. Определение структурных характеристик антител к TMEFF2

Последовательности кДНК и трансляции аминокислот антител получали с использованием стандартных методик. После определения последовательности полипептидов некоторые кДНК антител, кодирующие переменные области или полноразмерные антитела, были оптимизированы по кодонам с помощью стандартных способов экспрессии в увеличенном количестве.

В **таблице 5** приведены аминокислотные последовательности HCDR1 и HCDR2 выбранных антител к TMEFF2.

В **таблице 6** приведены последовательности HCDR3 выбранных антител к TMEFF2.

В **таблице 7** приведены аминокислотные последовательности LCDR1 и LCDR2 выбранных антител к TMEFF2.

В **таблице 8** приведены аминокислотные последовательности LCDR3 выбранных антител к TMEFF2.

В **таблице 9** приведены аминокислотные последовательности VH и VL выбранных антител к TMEFF2.

В **таблице 10** приведены SEQ ID NO: тяжелой и легкой цепей выбранных антител к TMEFF2.

В **таблице 11** приведены аминокислотные последовательности тяжелой цепи выбранных антител к TMEFF2.

В **таблице 12** приведены аминокислотные последовательности легких цепей выбранных антител к TMEFF2.

В **таблице 13** приведены SEQ ID NO: полинуклеотидов, кодирующих различные цепи антитела к TMEFF2.

Таблица 5.

mAb	Последовательность HCDR1	HCDR1, SEQ ID	Последовательность HCDR2	HCDR2, SEQ ID NO:
TMEB675	SYSMS	10	VISGSGGFTDYADSV	12
TMEB570	SYYSIS	11	GIIPISGRANYAQKFQ	13
TMEB674	SYSMS	10	VISGGSFTSYADSV	14
TMEB565	SYYSIS	11	GIIPISGRANYAQKFQ	13
TMEB762	SYSMS	10	VISGSGGFTDYADSV	12
TMEB757	SYSMS	10	VISGSGGFTDYADSV	12

Таблица 6.

mAb	Последовательность HCDR3	HCDR3, SEQ ID NO:
TMEB675	MPLNSPHDY	15
TMEB570	DGYSSGRSTTYAFDY	16
TMEB674	MPLNSPHDC	17
TMEB565	DGYSSGRSTTYAFDY	16
TMEB762	MPLNSPHDY	15
TMEB757	MPLNSPHDY	15

Таблица 7.

mAb	Аминокислота LCDR1	LCDR1 SEQ ID NO:	Аминокислота LCDR2	LCDR2, SEQ ID NO:
TMEB675	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	20
TMEB570	RASQSVSTYYLA	19	GASYRAT	21
TMEB674	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	20
TMEB565	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	20
TMEB762	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	20
TMEB757	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	20

Таблица 8.

mAb	Аминокислота LCDR3	LCDR3, SEQ ID NO:
TMEB675	LQDYNALYLT	22
TMEB570	QQYGHSPIT	23
TMEB674	LQDYNYSLT	24
TMEB565	LQDYNALYLT	22
TMEB762	LQDYNPLT	86
TMEB757	LQDYNPLT	86

Таблица 9.

Антитело	Название VH	Аминокислотная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Название VL	Аминокислотная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
TMEB675	TMEH411	EVQLLESGG GLVQRGGSL RPSCAASGFT FSSYSMSWV RQAPGKGLE WVSVISGSG GFTDYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLHM NSLRAEDTA VYYCARMPL NSPHDYWGQ GTLVTVSS	25	TMEL127	AIQMTQSPSS LSASVGDRV TITCRASQGI RNDLGWYQ QKPGKAPKL LIYAASSLQS GVPSRFSGSG SGTDFTLTISS LQPEDFATY YCLQDYNALYLT FTFGGGTKV EIK	28
TMEB570	TMEH396	QVQLVQSGA EVKKPGSSV KVSCKASGG TFSSYYISWV RQAPGQGLE WMGGIIPISG RANYAQKFQ GRVTITADES TSTAYMELS	26	TMEL112	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS TYYLAWYQ QKPGQAPRL LIYGASYRAT GIPDRFSGSG SGTDFTLTIS RLEPEDFAV	29

		SLRSEDNAV YYCARDGYS SGRSTTYAF DYWGQGT LVTSS			YYCQQYGH S PITFGQGT KV EIK	
TMEB67 4	TMEH41 0	EVQLLESGG GLVQPPGG S LRLSCAASG F TFSSYSMSW VRQAPGKGL EWVSVISGG GSFTSYADS VKGRFTISR D NSNNTLYLQ MSSLRAEDT AFYYCARM P LNSPHDCW G QGT LVTSS	27	TMEL126	AIQMTQSP SS LSASVGDR V TITCRASQ GI RNDLGWYQ QKPGKAPKL LIYAASSLQ S GVPSRFSG SG SGTDFTLT ISS LQPEDFAT Y YCLQDYNYS LTFGGGT KV EIR	30
TMEB56 5	TMEH39 6	QVQLVQSGA EVKKPGSSV KVSCKASGG TFSSYYISW V RQAPGQGLE WMGGIIPIS G RANYAQKFQ GRVTITADE S TSTAYMELS SLRSEDNAV YYCARDGYS SGRSTTYAF DYWGQGT LVTSS	26	TMEL111	EIVLTQSP GT LSLSPGER AT LSCRASQSV ATYYLAWY QQKPGQAP R LLIYGASS RA TGIPDRFS GS GSGTDFTL TI SRLEPEDFA V YYCQQYGY N PITFGQGT KV EIK	31
TMEB76 2	TMEH45 9	EVQLLESGG GLVQPPGGS L RLSCAASGFT	87	DL3L129	DIQMTQSP SS LSASVGDR V TITCRASQ GI	88

		FSSYSMSWV RQAPGKGLE WVSVISGSG GFTDYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTA VYYCARMPL NSPHDYWGQ GTLVTVSS			RNDLGWYQ QKPGKAPKL LIYAASSLQS GVPSRFSGSG SGTDFTLTISS LQPEDFATY YCLQDYNYP LTFGGGTKV EIK	
TMEB75 7	TMEH46 0	EVQLLES GLVQPGGSL RLSCAASGFT FSSYSMSWV RQAPGKGLE WVSVISGSG GFTDYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLHM NSLRAEDTA VYYCARMPL NSPHDYWGQ GTLVTVSS	89	B76L85	AIQMTQSPSS LSASVGDRV TITCRASQGI RNDLGWYQ QKPGKAPKL LIYAASSLQS GVPSRFSGSG SGTDFTLTISS LQPEDFATY YCLQDYNYP LTFGGGTKV EIK	90

Таблица 10.

Антитело	Название VH	Название VL	Белок HC, SEQ ID NO:	Белок LC, SEQ ID NO:
TMEB675	TMEH411	TMEL127	32	35
TMEB570	TMEH396	TMEL112	33	36
TMEB674	TMEH410	TMEL126	34	37
TMEB565	TMEH396	TMEL111	33	38
TMEB762	TMEH459	DL3L129	91	92
TMEB757	TMEH460	B76L85	93	94

Таблица 11.

БЕЛОК HC, SEQ ID NO:	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ HC
32 (HC	EVQLLES GGGLVQRGGSLRPS CAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKGLEW

TMEB675)	VSVISGSGGFTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTAVY YCARMPLNSPHDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTKYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK
33 (HC TMEB570, TMEB565)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYYISWVRQAPGQGLE WMGGIIPISGRANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVY YCARDGYSSGRSTTYAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGKTKYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
34 (HC TMEB674)	EVQLLES GGGLVQPPGGSRLS CAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKGLE WVSVISGGGSFTSYADSVKGRFTISRDN SNNTLYLQMSSLRAEDTAFY YCARMPLNSPHDCWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTKYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK
91 (HC TMEB762)	EVQLLES GGGLVQPPGGSRLS CAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKGLEW VSVISGSGGFTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARMPLNSPHDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTKYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA

	KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLGK
93 (HC TMEB757)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKGLEW VSVISGSGGFTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTAVY YCARMPLNSPHDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTKYTCNV D HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLGK

Таблица 12.

SEQ ID NO: БЕЛКА LC	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ LC
35 (LC TMEB675)	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNALTFG GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
36 (LC TMEB570)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSTYYLAWYQQKPGQAPRLLIY GASYRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGHSPITFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
37 (LC TMEB674)	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNALTFG GGTKVEIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
38 (LC TMEB565)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVATYYLAWYQQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYNPITFG

	QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
92 (LC TMEB762)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYPPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
94 (LC TMEB757)	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYPPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Таблица 13.

Антитело	кДНК VH с SEQ ID NO:	кДНК VL с SEQ ID NO:	кДНК HC с SEQ ID NO:	кДНК LC с SEQ ID NO:
TMEB675	39	42	46	49
TMEB570	40	43	47	50
TMEB674	41	44	48	51
TMEB565	40	45	47	52
TMEB762	95	96	97	98
TMEB757	99	100	101	102

SEQ ID NO: 39 (кДНК VH TMEB675)

GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGAGAGGAGGAAGCCTGAGACCCAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACAGCATGAGCTGGGTCAGGCAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAGTGGGTGAGCGTGATTAGCGGCAGCGGCGGCTTCACCGATTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAATAGCAAGAACACCCTGTACCTGCACATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGATGCCCCTGAACAGCCCTCACGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTGACCGTGTCCAGC

SEQ ID NO: 40 (кДНК VH TMEB570, TMEB565)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTCAGCTCCTATTACATTAGCTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATGGGTGGCATTATCCCAATCATGTGGGCGTGCTAATTATGCGCAGAAATTTTCAGGGCCGCGTGACCATTACCGCTGATGAAAGCACCCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCG

GTGTATTATTGCGCGCGCGACGGCTACAGTAGTGGACGTAGCACAAACATACGCATTT
GACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTTCGAGT

SEQ ID NO: 41 (кДНК VH TMEB674)

GAAGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTCCTGGCGGA
AGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACAGCATGAG
CTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCGTGATCAGCGGCG
GAGGCAGCTTTACCAGCTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTCAACATCAGCAGG
GACAACAGCAACAACACCCTGTACCTGCAGATGAGCAGCCTGAGGGCCGAGGACAC
CGCCTTCTACTACTGCGCCAGGATGCCCTGAACAGCCCCCATGACTGCTGGGGACA
GGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO: 42 (кДНК VL TMEB675)

GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACA
GGGTGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGGGCATCAGAAACGACCTGGGCTGGTAC
CAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCA
GAGCGGAGTGCCTAGCAGGTTTCAGCGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGGACTACA
ACTACGCCCTGACATTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 43 (кДНК VL TMEB570)

GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCACCCCTGAGCCTGAGCCCGGGCGAAC
GCGCGACCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCGTTTCCACATACTACCTGGCGTGGT
ATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTACGGTGCCTCCTATCGCG
CGACCGGCATTCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGTTCCGGCACCGATTTTACCCTGA
CCATTAGCCGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTATTGCCAGCAGTACGGTC
ACAGCCCGATTACTTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAATCAAA

SEQ ID NO: 44 (кДНК VL TMEB674)

GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACA
GGGTGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGGGCATCAGGAACGACCTGGGCTGGTAC
CAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCA
GAGCGGAGTGCCTAGCAGGTTTCAGCGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGGACTACA
ACTACAGCCTGACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAGG

SEQ ID NO: 45 (кДНК VL TMEB565)

GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCACCCCTGAGCCTGAGCCCGGGCGAAC
GCGCGACCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCGTTGCCACCTATTATCTTGCGTGGT
ATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTACGGTGCATCCTCCCGTG
CGACCGGCATTCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGTTCCGGCACCGATTTTACCCTGA
CCATTAGCCGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTATTGCCAGCAGTACGGCT
ATAACCCAATTACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAATCAAA

SEQ ID NO: 46 (кДНК HC TMEB675)

GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGAGAGGAGGAAGC

CTGAGACCCAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACAGCATGAGCTGG
GTCAGGCAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAGTGGGTGAGCGTGATTAGCGGCAGCGG
CGGCTTCACCGATTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACA
ATAGCAAGAACACCCTGTACCTGCACATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCC
GTGTACTACTGCGCCAGGATGCCCCTGAACAGCCCTCACGACTACTGGGGCCAGGG
AACCCCTGGTGACCGTGTCCAGCGCTTCCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGC
GCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACACCTGCAACGTAGATCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCAT
GCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCC
CAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTAC
CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAG
CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACC
ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA

SEQ ID NO: 47 (кДНК HC TMEB570, TMEB565)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCAGCAGC
GTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCGGCACCTTCAGCTCCTATTACATTAGCTG
GGTGCGCCAGGCGCCGGGGCCAGGGCCTGGAATGGATGGGTGGCATTATCCCAATCA
GTGGGCGTGCTAATTATGCGCAGAAATTTACGGGCCGCGTGACCATTACCGCTGATG
AAAGCACCCAGCACCGCGTATATGGAAGTGAAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAACCGCG
GTGTATTATTGCGCGCGCGACGGCTACAGTAGTGACGTAGCACAACATACGCATT
GACTATTGGGGCCAGGGCACCTTGGTGACCGTGTCGAGTGCTTCCACCAAGGGCCC
ATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCT
GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAGTCAAG
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTAC
ACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTC
CAAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCAT
CAGTCTTCTGTTCCTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTG
AGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAC
TGGTACGTGGATGGCGTGAGGAGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC

AGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATC
GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCT
GCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC
AGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCT
GGGTAAA

SEQ ID NO: 48 (кДНК HC TMEB674)

GAAGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTCCTGGCGGA
AGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACAGCATGAG
CTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCGTGATCAGCGGCG
GAGGCAGCTTTACCAGCTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGG
GACAACAGCAACAACACCCTGTACCTGCAGATGAGCAGCCTGAGGGCCGAGGACAC
CGCCTTCTACTACTGCGCCAGGATGCCCCTGAACAGCCCCCATGACTGCTGGGGACA
GGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTTCCACCAAGGGGCCCATCCGTCTTCCCCCT
GGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACACCTGCAACGTAGA
TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCC
CATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCGCGCGGGGACCATCAGTCTTCTGTTC
CCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGG
TGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGC
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGT
ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAG
TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGA
GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGAC
CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGT
GGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
CTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA

SEQ ID NO: 49 (кДНК LC TMEB675)

GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACA
GGGTGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGGGCATCAGAAACGACCTGGGCTGGTAC
CAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCA
GAGCGGAGTGCTAGCAGGTTTCAGCGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGGACTACA

ACTACGCCCTGACATTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCT
GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTACC
TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG
CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG
AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 50 (кДНК LC TMEB570)

GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCACCTGAGCCTGAGCCCGGGCGAAC
GCGCGACCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCGTTTCCACATACTACCTGGCGTGGT
ATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTACGGTGCCTCCTATCGCG
CGACCGGCATTCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGTTCCGGCACCGATTTTACCCTGA
CCATTAGCCGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTATTGCCAGCAGTACGGTC
ACAGCCCGATTACTTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCT
GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTACC
TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG
CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG
AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 51 (кДНК LC TMEB674)

GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACA
GGGTGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGGGCATCAGGAACGACCTGGGCTGGTAC
CAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCA
GAGCGGAGTGCCTAGCAGGTTTCAGCGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGGACTACA
ACTACAGCCTGACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAGGCGTACGGTGGCT
GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTACC
TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG
CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG
AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 52 (кДНК LC TMEB565)

GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCACCTGAGCCTGAGCCCGGGCGAAC
GCGCGACCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCGTTGCCACCTATTATCTTGCCTGGT
ATCAGCAGAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTACGGTGCATCCTCCCGTG
CGACCGGCATTCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGTTCCGGCACCGATTTTACCCTGA
CCATTAGCCGCCTGGAACCGGAAGATTTTGCGGTGTATTATTGCCAGCAGTACGGCT
ATAACCCAATTACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCT

GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCC
TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG
CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG
AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 95 (кДНК VH TMEB762)

GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGAGGAAGC
CTGAGACTCAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACAGCATGAGCTGG
GTCAGGCAGGCCCCTGGCAAAGGACTGGAGTGGGTGAGCGTGATTAGCGGCAGCGG
CGGCTTCACCGATTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACA
ATAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCC
GTGTACTACTGCGCCAGGATGCCCCTGAACAGCCCTCACGACTACTGGGGCCAGGG
AACCCTGGTGACCGTGTCCAGC

SEQ ID NO: 96 (кДНК VL TMEB762)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACA
GGGTGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGGGCATCAGAAACGACCTGGGCTGGTAC
CAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCA
GAGCGGAGTGCCTAGCAGGTTTCAGCGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGGACTACA
ACTACCCCCTGACATTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 97 (кДНК HC TMEB762)

GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGAGGAAGC
CTGAGACTCAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACAGCATGAGCTGG
GTCAGGCAGGCCCCTGGCAAAGGACTGGAGTGGGTGAGCGTGATTAGCGGCAGCGG
CGGCTTCACCGATTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACA
ATAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCC
GTGTACTACTGCGCCAGGATGCCCCTGAACAGCCCTCACGACTACTGGGGCCAGGG
AACCCTGGTGACCGTGTCCAGCGCTTCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGC
GCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACACTTGCAACGTAGATCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCAT
GCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCC
CAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTAC
CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCA

AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAG
 GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAG
 CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC
 ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTG
 GACAAGAGCAGATGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
 TCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA

SEQ ID NO: 98 (кДНК LC TMEB762)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACA
 GGGTGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGGGCATCAGAAACGACCTGGGCTGGTAC
 CAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCA
 GAGCGGAGTGCCTAGCAGGTTTCAGCGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
 CCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGGACTACA
 ACTACCCCCTGACATTTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCT
 GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTACC
 TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
 GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG
 CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG
 AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
 ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 99 (кДНК VH TMEB757)

GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCCGGAGGAAGC
 CTGAGACTCAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACAGCATGAGCTGG
 GTCAGGCAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAGTGGGTGAGCGTGATTAGCGGCAGCGG
 CGGCTTCACCGATTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACA
 ATAGCAAGAACACCCTGTACCTGCACATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCC
 GTGTACTACTGCGCCAGGATGCCCCCTGAACAGCCCTCACGACTACTGGGGCCAGGG
 AACCTGGTGACCGTGTCCAGC

SEQ ID NO: 100 (кДНК VL TMEB757)

GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACA
 GGGTGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGGGCATCAGAAACGACCTGGGCTGGTAC
 CAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCA
 GAGCGGAGTGCCTAGCAGGTTTCAGCGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
 CCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGGACTACA
 ACTACCCCCTGACATTTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 101 (кДНК HC TMEB757)

GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCCGGAGGAAGC
 CTGAGACTCAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACAGCATGAGCTGG
 GTCAGGCAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAGTGGGTGAGCGTGATTAGCGGCAGCGG
 CGGCTTCACCGATTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACA
 ATAGCAAGAACACCCTGTACCTGCACATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCC

GTGTACTACTGCGCCAGGATGCCCCTGAACAGCCCTCACGACTACTGGGGCCAGGG
AACCCTGGTGACCGTGTCCAGCGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGC
GCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTTACACTTGCAACGTAGATCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCAT
GCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTCC
CAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTAC
CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAG
CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACC
ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTG
GACAAGAGCAGATGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA

SEQ ID NO: 102 (кДНК LC TMEB757)

GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACA
GGGTGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGGGCATCAGAAACGACCTGGGCTGGTAC
CAGCAGAAGCCCGGCAAGGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCA
GAGCGGAGTGCCTAGCAGGTTTCAGCGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGGACTACA
ACTACCCCTGACATTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCT
GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCC
TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG
CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG
AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTC
ACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

Каркас выбранных антител к TMEFF2 приведен в таблице 14.

Таблица 14.

Антитело	Каркас VH	SEQ ID NO: каркаса VH	Каркас VL	SEQ ID NO: каркаса VL
TMEB675	VH3_3-23	53	VKI_L11	55
TMEB570	VH1_1-69	54	VKIII_A27	56
TMEB674	VH3_3-23	53	VKI_L11	55

TMEB565	VH1_1-69	54	VKI_L11	55
TMEB762	VH3_3-23	53	VKI_L11	55
TMEB757	VH3_3-23	53	VKI_L11	55

SEQ ID NO: 53 (каркас VH3_3-23)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK WGQGT LVT VSS

SEQ ID NO: 54 (каркас VH1_1-69)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFS SYAIS WVRQAPGQGLEWMG
GIPIFGTANYA QKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR

SEQ ID NO: 55 (каркас VKI_L11)

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
SGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYC LQDYNYP

SEQ ID NO: 56 (каркас VKIII_A27)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY
GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP

Пример 5. Картирование эпитопов антител к TMEFF2

Картирование эпитопов TMEB570 и TMEB675 проводили с заменой H/D. TMEW1 (SEQ ID NO: 6) в этих анализах использовали в качестве источника TMEFF2.

10 мкг TMEW1 в 130 мкл контрольного буфера (50 mM фосфата, 100 mM хлорида натрия при pH 7,4) денатурировали путем добавления 130 мкл 4 M гидрохлорида гуанидина, 0,85 M буфера TCEP (конечный pH составлял 2,5) и инкубации смеси в течение 3 мин при 10 °C. Затем смесь подвергали расщеплению пепсином/протеазой XIII на колонке, используя колонку пепсин/протеаза XIII собственной упаковки (мас./мас., 1:1) (2,1×30 мм). Полученные пептиды анализировали с помощью системы СВЭЖХ-МС, состоящей из СВЭЖХ Waters Acquity, соединенной с масс-спектрометром Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo). Пептиды разделяли на колонке C8 размером 50×1 мм с градиентом 16,5 мин от 2-34% растворителя В (0,2% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Растворитель А представлял собой 0,2% муравьиную кислоту в воде. Клапан инжектора и колонка пепсина/протеазы XIII и их соответствующие соединительные трубки располагаются внутри охлаждаемого корпуса, где поддерживается температура 10 °C. Второй переключающий клапан, колонка C8, и их соответствующие соединительные трубки из нержавеющей стали находятся внутри другого охлаждаемого корпуса с циркуляцией, где поддерживается температура -6 °C. Идентификацию пептида осуществляют путем поиска данных МС/МС в сравнении с последовательностью TMEW1 с использованием программы Mascot. Допуск по массе для ионов предшественника и продукта составлял 7 ч./млн и 0,02 Да соответственно.

10 мкл TMEW1 (5 мкг) или 10 мкл TMEW1 и TMEB570, или смеси TMEB675 (5 мкг: 15 мкг) инкубировали с 120 мкл буферного раствора для мечения оксидом дейтерия (50 mM фосфата натрия, 100 mM хлорида натрия при pH 7,4) в течение 0 с, 30 с, 360 с, 3600 с или

14400 с при 100 °С. Обмен водород/дейтерий (H/D) в каждый момент времени проводили в двух повторностях. Обмен водород-дейтерий останавливали добавлением 130 мкл 4 М гуанидингидрохлорида, 0,85 М буфера TCEP (конечный pH составлял 2,5). Затем образцы после остановки обмена наносили на колонку расщепления с пепсином/протеазой XIII и анализировали с помощью ЖХ-МС, как описано выше. Масс-спектры регистрировали только в режиме МС.

Исходные данные МС обрабатывают с помощью программного обеспечения HDX WorkBench, предназначенного для анализа данных МС обмена H/D (Pascal et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2012, 23 (9), 1512-1521). Уровни дейтерия вычисляют с помощью средней разности масс между дейтерированным пептидом и его нативной формой (t_0). Около 97-99% белка можно было картировать относительно конкретных пептидов. Кривые накопления дейтерия показали значительную разницу в наклоне за время обмена для пептидов.

Эпитоп TMEB570: TMEW1 продемонстрировал умеренное снижение поглощения дейтерия по остаткам 235-249 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 2), например, остатки HGKCEHSINMQEPSC (SEQ ID NO: 57) проксимальная область внутри мембраны была защищена от H/D обмена при связывании с TMEB570.

Эпитоп TMEB675: TMEW1 продемонстрировал умеренное снижение поглощения дейтерия по остаткам 252-268 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 2), например, остатки DAGYTGQHCEKKDYSVL (SEQ ID NO: 58) проксимальная область внутри мембраны была защищена от H/D обмена при связывании с TMEB675.

Таким образом, эпитопные остатки TMEB570 TMEFF2 охвачены HGKCEHSINMQEPSC (SEQ ID NO: 57), а эпитопные остатки TMEB675, охвачены DAGYTGQHCEKKDYSVL (SEQ ID NO: 58). Оба антитела связывались с TMEFF2 внутри мембранной проксимальной области.

Пример 6. Создание антител к CD3

Антитело к CD3 CD3B219 было описано в US9850310.

Дополнительные антитела к CD3 создавали путем иммунизации OmniRat (OMT™). Полученные супернатанты гибридомы подвергали скринингу на связывание с Т-лимфоцитами CD3⁺ человека и яванского макака, эти клоны выделяли и секвенировали, а в некоторых случаях дополнительно конструировали. Антитела к CD3 клонировали в различных изотипах, включая IgG4 с подавленной эффекторной функцией с мутациями S228P, F234A и L235A или в виде IgG1 с мутациями L234A, L235A, G237A, P238S, H268A, A330S и P331S. Созданные два антитела к CD3 были названы CD3B376 и CD3B450.

Аффинность связывания CD3B376 и CD3B450 *in vitro* с человеческими Т-клетками определяли методом проточной цитометрии после скрещивания с антиген-специфическим целевым плечом. Проводили предварительное исследование человеческих Т-клеток для определения константы связывания с насыщением молекулы-маркера к CD3 (KdT). Затем в анализе конкурентного связывания с титрованными концентрациями исследуемых mAb использовали фиксированную концентрацию маркера ([T]). Значение IC₅₀ (концентрация,

при которой достигается 50% ингибирования) для исследуемой молекулы использовали для определения аффинности связывания (K_d) по следующей формуле: $K_d = IC_{50} / (1 + ([T]/K_dT))$. Для определения константы насыщения связывания маркера (K_dT) использовали пять человеческих доноров, имеющих в продаже антитело к CD3 AlexaFluor488 SP34-2 (BioScience No 557705) (данные не приведены).

Определение константы насыщения связывания маркера (K_dT)

Способы. Человеческие пан Т-клетки хранили в криогенных условиях в резервуарах с азотом до использования. Т-клетки размораживали, промывали PBS, ресуспендировали в красящем буфере для FACS, подсчитывали (с указанием жизнеспособности) и ресуспендировали в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Краситель freed Live/Dead (Life Technologies, также известный как Invitrogen, № L34974) (50 мкл DMSO во флакон) добавляли по 1 мкл на 1×10^6 клеток; и к клеткам добавляли блокатор FcR (Miltenyi Biotec № 130-059-901) (1 мл разведения 1:20 на $0,5 \times 10^6$ клеток) на каждый период 10 минут. Клетки высевали в количестве 50,000 клеток/лунку и промывали. К Т-клеткам добавляли возрастающие концентрации антител К CD3 AlexaFluor488 SP-34 в течение 2 часов при 4 °С. Клетки промывали для удаления несвязанного антитела, фиксировали в течение 15 минут, промывали и ресуспендировали в красящем буфере для FACS, содержащем 1 мМ ЭДТА.

Для измерения связывания использовали проточный цитометр iQue Intellicyte. Клетки гейтировали по популяции Т-клеток, затем по синглетам клеток, затем по живым клеткам (FL4). Для каждой лунки определяли среднее геометрическое окрашивания (FL1).

Полученные средние значения интенсивности флуоресценции наносили на график в зависимости от концентрации молекулы антитела и анализировали с помощью программного обеспечения Prism в анализе связывания с одним сайтом (общее связывание). Программное обеспечение вычисляет соответствующее значение K_d , которое описывает связывание молекулы антитела с рецептором (CD3 на человеческих пан Т-клетках), который соответствует закону действия массы. Применяли следующую формулу: $Y = (B_{max} \times X) / (K_d + X)$; где: B_{max} представляет собой максимальное связывание; K_d представляет собой концентрацию лиганда, необходимую для достижения полумаксимального связывания.

Результаты. Для каждого донора получали значения K_d и получали среднее значение. Константа связывания (K_dT) с Т-клетками человека была получена как $5,6 \pm 1,0$ нМ ($n=4$) и использовалась в ранее упомянутой формуле для определения аффинности связывания K_d .

Определение аффинности связывания mAb к CD3 с помощью анализа конкуренции

Исследования конкурентного связывания проводили с использованием CD3B376 и CD3B450. Для определения аффинности связывания mAb использовали человеческие пан Т-клетки. Использованный маркер представлял собой коммерчески доступное антитело к CD3 AlexaFluor488 SP-34 (BioScience No 557705), и для этого маркера описана выше

константа насыщения связывания.

Т-клетки хранили в криогенных условиях в резервуарах с азотом до использования. Т-клетки размораживали, промывали PBS, ресуспендировали в красящем буфере для FACS, подсчитывали с указанием жизнеспособности и ресуспендировали в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Краситель freered Live/Dead (Life Technologies, также известный как Invitrogen, № L34974) (50 мкл DMSO во флакон) добавляли по 1 мкл на 1×10^6 клеток; и к клеткам добавляли блокатор FcR (Miltenyi Biotec № 130-059-901) (1 мл разведения 1:20 на $0,5 \times 10^6$ клеток) на каждый период 10 минут. Клетки высевали в количестве 50,000 клеток/лунку и промывали.

MAb (и изотипический контроль) серийно разводили 1:2 от начальной концентрации 1000 или 200 мкг/мл (2X) и фиксированной концентрации индикатора (5 мкг/мл; 2X) смешивали с получением концентраций 1X. Следовательно, конечная (1X) концентрация индикатора составляла 2,5 мкг/мл=16,6 нМ. Смесь добавляли к Т-клеткам на 2 часа при 4 °С. Клетки затем промывали для удаления несвязанного антитела, фиксировали в течение 15 минут, промывали и ресуспендировали в красящем буфере для FACS, содержащем 1 mM ЭДТА.

Для измерения связывания использовали проточный цитометр iQue Intellicyte. Клетки гейтировали по популяции Т-клеток, затем по синглетам клеток, затем по живым клеткам (FL4). Для каждой лунки определяли среднее геометрическое окрашивания (FL1). Полученные средние значения интенсивности флуоресценции были нанесены на график как функция логарифмической концентрации молекулы антитела (преобразованной в нМ) и проанализированы с использованием программного обеспечения Prism в сигмоидальном доза-ответе (переменный наклон), из которого получены значения EC50/IC50 (в нМ). Аффинность связывания (K_d) получали с использованием следующей формулы: $K_d = IC50 / (1 + ([T]/K_dT))$, где: K_d представляет собой аффинность конкурента (немеченая молекула); IC50 в нМ исследуемого соединения; [Т] представляет собой концентрацию маркера (16,6 нМ); K_dT представляет собой K_d маркера, определяемого по связыванию с насыщением (5,6 нМ для человека).

Сайт связывания CD3B376 был плотнее, чем CD3B450 как в двухвалентной, так и в одновалентной форме.

Таблица 15.

Конструкт	антитело к CD3	IC50 (нМ)	K_d (нМ)
двухвалентное	CD3B376	29	7,3
	CD3B450	60	15
Одновалентная конструкция	CD3B376	409	103
	CD3B450	1011	254

Аминокислотные последовательности CDR, VH и VL CD3B219, CD3B376 и CD3B450 приведены в таблице 16.

Таблица 16.

Антитело	Регион	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
CD3B219	HCDR1	TYAMN	60
	HCDR2	RIRSKYNNYATYYAASVKG	61
	HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY	62
	LICDR1	RSSTGAVTTSNYAN	63
	LCDR2	GTNKRAP	64
	LCDR3	ALWYSNLWV	65
	VH (CD3B219VH)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSK YNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSL YLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNS YVSWFAYWGQGTLVTVSS	66
	VL (CD3B219VL)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	67
CD3B376	HCDR1	NNNAAWS	68
	HCDR2	RTYYRSKWLYDYAVSVKS	69
	HCDR3	GYSSSFDY	70
	LICDR1	TGTSSNIGTYKFVS	71
	LCDR2	EVSKRPS	72
	LCDR3	VSYAGSGTLL	73
	VH (CD3H219)	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDS VFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYY RSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQF TLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFDY WGQGTLVTVSS	74
	VL (CD3L150)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIG TYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVS KR P SGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQ ADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL	75
CD3B450	HCDR1	NNNAAWS	68
	HCDR2	RTYYRSKWLYDYAVSVKS	69
	HCDR3	GYSSSFDY	70
	LICDR1	TGTSSNIGTYKFVS	71
	LCDR2	EVSKRPS	72
	LCDR3	VSYAGSGTLL	73
	VH (CD3H231)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDS	59

		VFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRYY RSKWLYDYAVSVKSRITINPDTSKNQFS LQLNSVTPEDTAVYYCARGYSSSFYDW GQGTLVTVSS	
	VL (CD3L197)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIG TYKFVSWYQQHPGKAPKVMIEVSKRP SGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDE ADYYCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL	111

SEQ ID NO: 76 HC CD3B219; (IgG4 S228P, F234A, L235A, F405L и R409K)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS
KYNMYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFNGNSYVS
WFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG
PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 77 LC CD3B219

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTN
KRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQP
KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 78 HC CD3B376 (IgG4 S228P, F234A, L235A, F405L и R409K)

QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRYY
YRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFYDWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYS
KLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 79 LC CD3B376

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVSKR
PSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVLGQPKA
APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNN
KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

В таблице 17 приведены SEQ ID NO: полинуклеотидов, кодирующих цепи антитела к CD3

Таблица 17

Антитело	кДНК VH с SEQ ID NO:	кДНК VL с SEQ ID NO:	кДНК HC с SEQ ID NO:	кДНК LC с SEQ ID NO:
CD3B219	105	106	80	81
CD3B376	107	108	82	83

SEQ ID NO: 105 кДНК VH CD3B219

GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTC
TGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCCATGAACTGGG
TGCGCCAGGCCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGCCCCGGATCAGAAGCAAGTAC
AACAATTACGCCACCTACTACGCCGCCTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCG
GGACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAAAACCGAGGACA
CCGCCGTGTACTACTGCGCCAGACACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGT
TTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTGTCTATCT

SEQ ID NO: 106 кДНК VL CD3B219

CAGACCGTCTGTGACCCAGGAACCTAGCCTGACCGTGTCTCCTGGCGGCACCG
TGACCCTGACCTGCAGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAACT
GGGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCCAGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAA
GAGAGCCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCTCTGCTGGGAGGAAAGGCCG
CCCTGACACTGTCTGGCGTGCAGCCTGAAGATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGT
GGTACAGCAACCTGTGGGTGTTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTGCTG

SEQ ID NO: 80 кДНК HC CD3B219

GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTC
TGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCCATGAACTGGG
TGCGCCAGGCCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGCCCCGGATCAGAAGCAAGTAC
AACAATTACGCCACCTACTACGCCGCCTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCG
GGACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAAAACCGAGGACA
CCGCCGTGTACTACTGCGCCAGACACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGT
TTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTGTCTATCTGCTTCCACCAAGGGCC
CATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCC
TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAG
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTAC
ACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTC
CAAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCGGGGGGACCAT
CAGTCTTCCTGTTCCCCCCTGTTCCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTG
AGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAC
TGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
AGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATC
GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCT

GCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCCTCCTCTAC
AGCAAGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCT
GGGTAAA

SEQ ID NO: 81 κДHK LC CD3B219

CAGACCGTCGTGACCCAGGAACCTAGCCTGACCGTGTCTCCTGGCGGCACCG
TGACCCTGACCTGCAGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAACT
GGGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCCAGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAA
GAGAGCCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTACGCGGATCTCTGCTGGGAGGAAAGGCCG
CCCTGACACTGTCTGGCGTGCAGCCTGAAGATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGT
GGTACAGCAACCTGTGGGTGTTCCGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTGCTGGGTGAG
CCCAAGGCTGCACCCAGTGTCCTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCC
AACAAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGT
GGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCT
CCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAG
CAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGT
GGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

SEQ ID NO: 107 κДHK VH CD3B376

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCCCTAGACTCGTGCGGCCTTCCCAGACCC
TGTCTCTGACCTGTGCCATCTCCGGCGACTCCGTGTTCAACAACAACGCCGCCTGGT
CCTGGATCCGGCAGAGCCCTTCTAGAGGCCTGGAATGGCTGGGCCGGACCTACTAC
CGGTCCAAGTGGCTGTACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGTCCCGGATCACCGTGAAC
CCTGACACCTCCCGGAACCAGTTCACCCTGCAGCTGAACTCCGTGACCCCTGAGGAC
ACCGCCCTGTACTACTGCGCCAGAGGCTACTCCTCCTCCTTCGACTATTGGGGCCAG
GGCACCCCTCGTGACCGTGTCTCT

SEQ ID NO: 108 κДHK VL CD3B376

AGTCTGCTCTGACCCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGCTCTCCCGGCCAGTCCATC
ACCATCAGCTGTACCGGCACCTCCTCCAACATCGGCACCTACAAGTTCGTGTCTGG
TATCAGCAGCACCCCGACAAGGCCCCCAAAGTGCTGCTGTACGAGGTGTCCAAGCG
GCCCTCTGGCGTGTCTCCAGATTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCAACACCGCCTCCCT
GACCATCAGCGGACTGCAGGCTGAGGACCAGGCCGACTACCACTGTGTGTCTACG
CTGGCTCTGGCACCCCTGCTGTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTG

SEQ ID NO: 82 κДHK HC CD3B376

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCCCTAGACTCGTGCGGCCTTCCCAGACCC
TGTCTCTGACCTGTGCCATCTCCGGCGACTCCGTGTTCAACAACAACGCCGCCTGGT
CCTGGATCCGGCAGAGCCCTTCTAGAGGCCTGGAATGGCTGGGCCGGACCTACTAC
CGGTCCAAGTGGCTGTACGACTACGCCGTGTCCGTGAAGTCCCGGATCACCGTGAAC
CCTGACACCTCCCGGAACCAGTTCACCCTGCAGCTGAACTCCGTGACCCCTGAGGAC

ACCGCCCTGTACTACTGCGCCAGAGGCTACTCCTCCTCCTTCGACTATTGGGGCCAG
 GGCACCCTCGTGACCGTGTCCTCTGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTG
 GCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA
 GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG
 GCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG
 TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACACCTGCAACGTAGAT
 CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCC
 ATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCC
 CCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGT
 GGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCG
 TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTAC
 CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTA
 CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCA
 AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAG
 GAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAG
 CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACC
 ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCCTCCTCTACAGCAAGCTAACCGTG
 GACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
 TCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA

SEQ ID NO: 83 κДНК LC CD3B376

CAGTCTGCTCTGACCCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGCTCTCCCGGCCAGTCCAT
 CACCATCAGCTGTACCGGCACCTCCTCCAACATCGGCACCTACAAGTTCGTGTCCTG
 GTATCAGCAGCACCCCGACAAGGCCCCCAAAGTGCTGCTGTACGAGGTGTCCAAGC
 GGCCCTCTGGCGTGTCTCCAGATTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCAACACCGCCTCCC
 TGACCATCAGCGGACTGCAGGCTGAGGACCAGGCCGACTACCACTGTGTGTCTCTAC
 GCTGGCTCTGGCACCCCTGCTGTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGACCGTGCTGGGTGAG
 CCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCC
 AACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGT
 GGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCT
 CCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAG
 CAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGT
 GGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

Пример 7. Создание биспецифических антител к TMEFF2xCD3

Выбранные моноспецифические антитела к TMEFF2 и CD3 экспрессировали как IgG4/κ. Замены F405L и R409K (нумерация ЕС) были внесены в антитела к CD3, в то время как антитела к TMEFF2 имели IgG4 дикого типа. В дополнение к заменам в положениях 405 и 409 были сконструированы mAb IgG4 с заменой S228P, F234A и L235A.

Моноспецифические антитела экспрессировали и очищали с помощью стандартных способов, применяя колонку Protein A (колонку HiTrap MabSelect SuRe). После элюирования пулы диализировали в D-PBS, pH 7,2.

Биспецифические антитела TMEFF2хCD3 создавали, комбинируя моноспецифическое mAb к TMEFF2 и моноспецифическое mAb к CD3 при обмене плечами Fab *in vitro*, как описано в международной патентной публикации № WO2011/131746. Вкратце, около 1-20 мг/мл каждого антитела в молярном соотношении 1 : 1 в PBS, pH 7-7,4, и 75 mM 2-меркаптоэтанолamina (2-МЕА) смешивали вместе и инкубировали при 25-37 °C в течение 2-6 ч, после чего удаляли 2-МЕА посредством диализа, диафильтрации, тангенциальной поточной фильтрации и/или фильтрации в вихревой ячейке с применением стандартных способов.

Биспецифические антитела после обмена плечами Fab *in vitro* дополнительно очищали стандартными способами, применяя гидрофобную хроматографию, чтобы свести к минимуму остаточное содержание исходных антител к TMEFF2 и CD3.

В таблице 18 и таблице 19 приведены полученные биспецифические антитела.

Таблица 18.

Биспецифическое антитело	Исходное (плечо TMEFF2/плечо CD3)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
TMCB93	TMEB675	10	12	15	18	20	22
	CD3B219	60	61	62	63	64	65
TMCB132	TMEB675	10	12	15	18	20	22
	CD3B376	68	69	70	71	72	73
TMCB101	TMEB570	11	13	16	19	21	23
	CDB219	60	61	62	63	64	65
TMCB131	TMEB570	11	13	16	19	21	23
	CD3B376	68	69	70	71	72	73
TMCB92	TMEB674	10	14	17	18	20	24
	CD3B219	60	61	62	63	64	65
TMCB102	TMEB565	11	13	16	18	20	22
	CD3B219	60	61	62	63	64	65

Таблица 19.

Биспецифическое антитело	Исходное (плечо TMEFF2/плечо CD3)	VH	VL	HC	LC
TMCB93	TMEB675	25	28	32	35
	CD3B219	66	67	76	77
TMCB132	TMEB675	25	28	32	35

	CD3B376	74	75	78	79
TMCB101	TMEB570	26	29	33	36
	CDB219	66	67	76	77
TMCB131	TMEB570	26	29	33	36
	CD3B376	74	75	78	79
TMCB92	TMEB674	27	30	34	37
	CD3B219	66	67	76	77
TMCB102	TMEB565	26	31	33	38
	CD3B219	66	67	76	77

Пример 8. Характеризация биспецифических антител к TMEFF2 x CD3

Анализ чистоты методом аналитического ультрацентрифугирования (AUC)

Аналитическое ультрацентрифугирование (AUC) позволяет определить размер, форму, состояние агрегации и обратимое взаимодействие макромолекул в растворе. Скорость осаждения (SV) представляет собой методику AUC, позволяющую перевести градиент концентрации макромолекулы к внешнему радиусу держателя образца (клетки) при вращении центрифуги. Это позволяет определять коэффициент осаждения, который является фактором размера и формы молекулы, а также является уникальным для каждой молекулы. Для этой цели использовали прибор Beckman Optima AUC. Образцы загружали в ячейки центрифуги, оснащенные сердцевинами Beckman 1,2 см (с номинальным интервалом 50 тыс. об/мин) и кварцевыми окошками. Клетки собирают и вращают до 130 фунтов. Клетки центрифуги помещали в ротор An-50 (отверстие 8) или An-60 (отверстие 4) и помещали в камеру AUC. Перед началом пробега температуру AUC уравнивали до 20,5°C в течение по меньшей мере одного часа с помощью ротора в камере. Анализ проводили при 40 тыс. об/мин для образца mAb со счетчиком сканирований (250 сканирований), частотой сбора данных (90 секунд), разрешением данных (10 мкМ), длиной волны 280 нм. Данные анализировали с помощью программного обеспечения для прямого подбора границ SEDANAL. Измеряли чистоту биспецифического антитела TMCB150 и его исходных mAb. TMCB150 показал наличие 97,1% мономера, 2,8% димерного мономера и отсутствие агрегации, что установлено по AUC, удовлетворяющей приемлемым критериям для временно экспрессируемого исследуемого материала для дополнительной биофизической характеристики. TMEB762 демонстрировал содержание мономера 95,5%, димера 4,5% и отсутствие агрегации, тогда как CD3B376 демонстрировал содержание мономера 97,7% и димера 2,2% без агрегации. Уровни агрегатов, составляющие >5% минимальной двухстадийной очищенной молекулы, могут оказывать значительное влияние на биологическую активность, растворимость, стабильность и срок хранения.

Конформационная стабильность биспецифических антител к TMEFF2/CD3 по результатам ДСК

Термическое разворачивание TMCB150 определяли с помощью ДСК

(дифференциальной сканирующей калориметрии), показывающей начало разворачивания $T_m = 52,6^\circ\text{C}$, первый термический переход (T_{m1}) при $61,8^\circ\text{C}$, второй термический переход (T_{m2}) при $67,6^\circ\text{C}$ и третий термический переход (T_{m3}) при $75,5^\circ\text{C}$. На основании профиля термического перехода в исходное антитело (антитело к TMEFF2, TMEB762 и антитело к CD3, CD3B376), который оценивается с помощью ДСК до, T_{m1} в TMCB150 соответствует разворачиванию CD3B376 FAB, а T_{m3} в TMCB150 соответствует переходам разворачивания Fab TMEB762.

Стабильность в сыворотке

Разрабатывают анализ стабильности в сыворотке для оценки свойств лидерных кандидатов на неспецифическое или нецелевое связывание с компонентами сыворотки человека. Это может указывать на плохие фармакокинетические и биораспределительные свойства. Связывание и стабильность TMCB150 оценивают как в буфере, так и в человеческой сыворотке с использованием способа флуоресцентной хроматографии. Биспецифическое антитело метили конъюгатом Alexa Fluor 488 (Invitrogen kit в соответствии с инструкциями производителя), инкубировали в буфере Hepes и человеческой сыворотке (Sigma, кат. № H4522) при 4°C и 37°C в течение 2 дней, а затем анализировали посредством эксклюзионной ВЭЖХ с использованием системы для ВЭЖХ Agilent, оснащенной флуоресцентным детектором. Процент агрегатов рассчитывают по суммарной площади под кривой каждого пика. TMCB150 показал агрегацию 2,4% в буфере Hepes в нулевой момент времени и агрегацию 2,0% и 1,3% через двое суток при 4° и 37° Цельсия соответственно. В человеческой сыворотке среда TMCB150 продемонстрировала агрегацию 1,7% в нулевой момент времени и агрегацию 1,1% через двое суток при 4° и 37° Цельсия.

Неспецифическое связывание

Неспецифическое связывание лидерной молекулы с неродственными поверхностями определяется с помощью технологии биосенсора (Biacore 8 K). Антитело пропускают через поверхности ППР, покрытые неродственными белками. Если антитело проявляет существенное связывание с данными нерелевантными поверхностями, предполагается, что оно будет иметь слабые свойства *in vivo* и вызывать проблемы при производстве. Лидерная молекула тестируется в конечной концентрации 1 мкМ. К нерелевантным поверхностям относятся отрицательно заряженный белок (ингибитор соевого трипсина), положительно заряженный белок (лизозим и β -дефензин), гидрофобный (Rh-Integrarin a4b7), человеческий IgG, липкий белок (Rh-CD19). В данном эксперименте использовали надлежащие контроли. Лидерная молекула течет по двум поверхностям: одна является пустой, а другая имеет непосредственно иммобилизованную молекулу. Уровень единицы ответа (ЕО) определяют путем вычитания пустого ЕО из испытываемой поверхности ЕО. ЕО TMCB150 и исходных mAb приведены ниже в таблице. Единица ответа ≥ 100 прогнозирует высокий риск неспецифического связывания с заряженными/гидрофобными поверхностями/поверхностями IgG, которые могут создавать проблемы при производстве и преобразовывать в плохие ФК свойства. Ни одно из антител не демонстрирует

неспецифического связывания с нерелевантными поверхностями, прогнозирующими низкий риск производства и *in vivo*.

Таблица 20.

	STI	В- дефензин-3	IgG человека	Лизоцим	rh-интегрин a4b7	rh-CD19
TMCB15 0	1,6	6,4	7,5	4,2	0	3,4
TMEB76 2	0	4,1	8,4	4,6	0	3,3
CD3B37 6	19,5	3,1	0,4	0,2	0	0

Стабильность при высокой концентрации

Многие моноклональные антитела готовят в высокой концентрации (≥ 100 мг/мл) для уменьшения объема инъекции для облегчения подкожного введения. Кроме того, во время процесса очистки все моноклональные антитела подвергают воздействию временно высоких концентраций (≥ 50 мг/мл). Следовательно, стабильность при высокой концентрации является критическим атрибутом качества этих молекул. Концентрирование проводят с использованием центрифужных устройств ультрафильтрации с мембранами MWCO 30 кДа. От 5,1 до 5,3 мг каждого белка сначала разводили до той же исходной концентрации и центрифугировали при 4000xg с 15-минутными интервалами. В конце каждой стадии центрифугирования в течение 15 минут концентраторы извлекают из центрифуги и регистрируют визуальную оценку оставшегося объема образца. Концентрацию измеряют с помощью прибора SoloVPE. Концентрированные образцы инкубировали при 4 °C и 40 °C в течение 2 недель, отбирали аликвоты с временными интервалами для проверки целостности с помощью аналитической SEC. TMCB150 и исходные mAb (CD3B376 и TMEB762) концентрировались нормально. Конечная концентрация TMCB150 составляла 99,4 мг/мл, а конечная концентрация исходных mAb составляла 52,2 мг/мл (TMEB762) и 52,6 мг/мл (CD3B376). Концентрация оставалась одинаковой в течение 2 недель при 4 °C и 40 °C, что указывает на то, что молекулы обладают хорошими внутренними свойствами без возможности агрегации или адсорбции в пробирках Eppendorf. % видов (A: Агрегат; M: Мономер; F: Фрагмент), измеренный по сумме пиков SEC, представлен ниже в таблице. При высокой концентрации молекулы интактны и содержат 4-5% агрегатов и $\leq 0,3\%$ фрагментов после хранения в течение 2 недель при 40 °C, что прогнозирует хороший срок хранения.

Таблица 21.

	Начальный момент			2 недели, 4 °C			2 недели, 40 °C		
	A	M	Ж	A	M	Ж	A	M	Ж
TMCB150	0,8	99,2	0	1,4	98,6	0	3,6	96,1	0,3

TMEB762	2,5	97,5	0	2,7	97,3	0	3,1	96,9	0
CD3B376	1,1	98,9	0	2,5	97,5	0	5,1	94,7	0,2

Определение аффинности биспецифического антитела к TMEFF2/CD3 с помощью кинетического эксклюзионного анализа (KinExA)

Для измерения равновесной аффинности (K_D) биспецифического mAb TMCB150 и его двухвалентного исходного mAb TMEFF2 TMEB762 к внеклеточному домену (ECD) использовали прибор KinExA 3200 (Sapidyne Instruments, Inc.). Готовили последовательные разведения человеческого внеклеточного домена (ECD) TMEFF2 с постоянной концентрацией mAb к TMEFF2 в 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% поверхностно-активного вещества P20, pH 7,4, 0,1% BSA и 0,02% NaN₃. Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре до достижения равновесия на основе связывающих взаимодействий. Продолжительность инкубации определяли с помощью моделирования программного обеспечения KinExA. Гранулы получали путем прямой ковалентной иммобилизации TMEFF2-ECD путем аминного связывания на предварительно активированных гранулах, состоящих из сополимера бис-акриламид/азолактон (Pierce Biotechnology, Inc.). После инкубации образцы анализировали на приборе KinExA для оценки свободного антитела в смеси путем пропускания смеси через модифицированные TMEFF2 гранулы и обнаружения захваченного антитела с использованием вторичного антитела с флуоресцентной меткой. Данные аппроксимировали с моделью связывания 1:1 с использованием программного обеспечения KinExA Pro.

Таблица 22.

образец mAb	K_D , пМ	95% ДИ, K_D , пМ
TMCB150	63,6	55,8-71,9
TMEB762	46,1	38,0-55,1

Измерение аффинности связывания биспецифического антитела к TMEFF2/CD3 с N-концевым пептидом CD3ε

Константы кинетической скорости измеряли методом ППР, выполненные на биосенсорных поверхностях Biacore 8 K (GE Healthcare) и антител к человеческому Fc. Антитела к человеческому иммуноглобулину ковалентно связывали с поверхностью сенсорного чипа CM4 (GE Healthcare). Интересующие антитела захватывали сенсорным чипом иммуноглобулина человека с последующей инъекцией N-концевого пептида CD3ε в различных концентрациях в буферный раствор HEPES, содержащий 0,05% поверхностно-активного вещества P20 (Tween™ 20) и 100 мкг/мл BSA. Поверхность регенерировали, вводя 2 инъекции 30 мкл 0,8% фосфорной кислоты со скоростью 100 мкл/мин. Приведенные данные представляют собой разность сигнала SPR между проточной ячейкой, содержащей захваченное антитело и эталонной ячейкой, не содержащей захваченного антитела. Дополнительно погрешность, вносимую прибором в сигнал, устраняли, вычитая данные пустой инъекции из сигнала с вычтенным эталонным сигналом. Данные анализировали, аппроксимируя фазы ассоциации и диссоциации при всех концентрациях

(глобальная аппроксимация) моделью связывания 1 : 1, используя программное обеспечение Biaevaluation (Biacore, Inc.). Данные представлены в виде среднего значения+95% ДИ (доверительный интервал), которое вычисляют по значению t для 95% ДИ* ст. откл./квадрат числа повторов.

Таблица 23.

образец mAb	Средн. значение k_{on} (1/мс)	Средн. значение k_{off} (1/с)	Средн. значение K_D (нМ)	95% ДИ, K_D , нМ
TMCB150	3,57E+04	1,03E-03	28,7	24,4-34,3
CD3B376	4,33E+04	1,17E-03	26,9	21,1-34,4

Пример 9. Биспецифические антитела к TMEFF2xCD3 эффективны для опосредованного Т-клетками уничтожения раковых клеток предстательной железы.

Опосредованное Т-клетками уничтожение клеток рака предстательной железы *in vitro*.

Выбранные биспецифические антитела к TMEFF2xCD3 оценивали на их способность опосредовать опосредованное Т-клетками уничтожение раковых клеток предстательной железы.

Опосредованное Т-клетками уничтожение биспецифических антител к TMEFF2xCD3 измеряли с помощью анализа цитотоксичности каспазы, который косвенно измеряет уничтожение клеток посредством расщепления флуоресцентного субстрата активной каспазой 3/7. Расщепление субстрата приводит к образованию флуоресцентного красителя ДНК с флуоресценцией, ограниченной ядром клетки. В каждой лунке на протяжении всего анализа проводят повторные измерения флуоресценции с использованием моторизованного объектива с 10-кратным увеличением, способным точно визуализировать клетку(и) в одних и тех же координатах. Популяции клеток-мишеней идентифицируют на основании определенных ограничений по размеру и/или с применением вторичной метки.

Замороженные пан-CD3⁺ Т-клетки (Biological Specialty Corporation, Кольмар, штат Пенсильвания) выделяли путем отрицательной селекции относительно нормальных здоровых доноров. Клетки рака предстательной железы, экспрессирующие TMEFF2 (LNCaP-AR), культивировали в RPMI 1640 с добавлением 10% HI FBS+добавки (Life Technologies). Т-клетки и клетки-мишени объединяли в соотношении эффектор-мишень (Е:Т) 3:1 в RPMI без фенолового красного+10% FBS и добавки (Life Technologies) без реагентов для отбора и к каждому мл клеток добавляли 0,6 мкл реагента каспаза NucView (Essen Bioscience) в соответствии с рекомендациями производителя. Общий объем клеток составил 0,1 мл в соответствующие лунки прозрачного 96-луночного плоскодонного планшета (BD Falcon). Биспецифические антитела TMEFF2xCD3 получали в двойной конечной концентрации в RPMI без фенолового красного, полученной, как указано выше, и в каждую лунку добавляли по 0,1 мл соединений. После 30 минут инкубации при

комнатной температуре для сведения к минимуму агрегации клеток на краю лунок планшеты переносили в прибор Zoom Incucyte (Essen Bioscience), в котором поддерживали температуру 37 °C, 5% CO₂.

Для каждой тестируемой клеточной линии были разработаны определения обработки клеток в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили каждые шесть часов, пока не наблюдалось плато сигнала каспазы, с последующим тремя или более последовательными уменьшениями относительно максимального сигнала в лунке(-ах), содержащей (-их) самую высокую концентрацию тестируемого(-ых) соединения(-ий).

После завершения анализа каждый планшет анализировали с использованием определения соответствующей обработки. Необработанные данные флуоресценции экспортировали с программного обеспечения Incucyte Zoom и вставляли в GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., г. Ла-Холья, штат Калифорния, США). Активность каспазы 3/7 определяли путем вычисления площади под кривой (AUC) для каждой лунки в GraphPad. Значения AUC отображали на графике в зависимости от Log10 нМ соединения. ЭК50 для каждой кривой дозы, в наномолях (нМ), регистрировали после нелинейного регрессионного анализа (аппроксимация параметров 4, наименьшие обычные квадраты). Каждый анализ содержал минимум три биологических повтора, и каждую клеточную линию тестировали с использованием Т-клеток от пяти здоровых доноров. Данные дополнительно анализировали с помощью доклинической статистики с использованием нелинейной регрессионной модели.

На ФИГ. 3 показано уничтожение клеток LNCaP с течением времени, измеренное по повышенной активности каспазы 3/7 выбранных биспецифических антител к TMEFF2xCD3.

Биспецифические антитела к TMEFF2xCD3 эффективны в моделях опухолей предстательной железы *in vivo*

Выбранные биспецифические антитела исследовали в модели рака предстательной железы Lncap *ex vivo* у самцов мышей линии NSG. Для исследования клетки 10⁶ Lncap в 50% Cultrex в количестве 0,2 мл/животное вводили путем подкожной инъекции в правый бок на 0 сутки. Животных рандомизировали, когда опухоли достигали объема приблизительно~ 100-150 мм³, и на 15 сутки вводили внутривентриально 20⁶ Т-клеток/мышь. В каждой группе было по десять животных. Обработка антителами начиналась через 1-3 суток после инъекции Т-клеток. Антитела вводили внутривентриально дважды в неделю. Перед введением дозы все животные получали блок IVIG+Fc. Объем опухоли и массу тела оценивали дважды в неделю до достижения опухолью~ 1200 мм³. Группы лечения приведены в **таблице 24**. В этих анализах в качестве отрицательного контроля использовали антитело CD3xNull, имеющее CD3B219-связывающее плечо и нулевое плечо, которое связывается с gp120 ВИЧ.

Таблица 24.

Группа	Обработка	Доза
--------	-----------	------

1	CD3xNull	5 мг/кг
2	TMCB93 (TMEB675 x CD3B219)	5 мг/кг
3	TMCB93 (TMEB675 x CD3B219)	0,5 мг/кг
4	TMCB101 (TMEB570 x CD3B219)	5 мг/кг
5	TMCB101 (TMEB570 x CD3B219)	0,5 мг/кг
6	TMCB131 (TMEB570 x CD3B376)	5 мг/кг
7	TMCB131 (TMEB570 x CD3B376)	0,5 мг/кг
8	TMCB132 (TMEB675 x CD3B376)	5 мг/кг
9	TMCB132 (TMEB675 x CD3B376)	0,5 мг/кг

В таблице 25 приведен процент ингибирования роста опухоли на 38 сутки в каждой группе после имплантации опухоли.

На ФИГ. 4 показано уменьшение среднего объема опухоли с течением времени после имплантации опухоли. На ФИГ. 5 А показано уменьшение среднего объема опухоли у каждой мыши, получавшей 0,5 мг/кг TMCB93. На ФИГ. 5 В показано уменьшение среднего объема опухоли у каждой мыши, получавшей 0,5 мг/кг TMCB132.

Таблица 25.

Обработка	% TGI на 38 сутки
CNTO7008 (Null x CD3)	
TMCB93 (TMEB675 x CD3B219) 5 мг/кг	83,9
TMCB93 (TMEB675 x CD3B219) 0,5 мг/кг	75,6
TMCB132 (TMEB675 x CD3B376) 5 мг/кг	48
TMCB132 (TMEB675 x CD3B376) 0,5 мг/кг	47,7
TMCB101 (TMEB570 x CD3B219) 5 мг/кг	25
TMCB101 (TMEB570 x CD3B219) 0,5 мг/кг	38,3
TMCB131 (TMEB570 x CD3B376) 5 мг/кг	23,3
TMCB131 (TMEB570 x CD3B376) 0,5 мг/кг	35

Эффективность TMEB762xCD3B376 (TMCB150) также оценивали в установленных ксенотрансплантатах LNCaP у самцов мышей NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl/SzJ} (NSG), гуманизированных Т-клетками 20е6. Животных рандомизировали в группы по 10 животных, каждая по среднему объему опухоли на 13 сутки после имплантации опухоли. TMEB762xCD3B376 в дозах 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг или контрольное антитело nullxCD3B376 в дозе 0,5 мг/кг вводили в/б два раза в неделю в течение 5 недель. На 35 сутки после имплантации опухоли, когда по меньшей мере восемь животных оставались в каждой группе, рассчитывали ингибирование роста опухоли (% TGI) по объему опухоли. Статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали для TMEB762xCD3B376 в дозах 0,5 и 0,1 мг/кг, но не в дозах 0,05 мг/кг по сравнению с контролем nullxCD3 (ФИГ. 6). TMEB762xCDB376 при 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг вызывал ингибирование роста опухоли на 110%, 88% и 25% соответственно по сравнению с контрольными образцами, получавшими лечение NullxCD3. Обработка TMEB762xCDB376

приводила к семи и трем полным ответам в дозах 0,5 и 0,1 мг/кг соответственно. Подкожные опухоли LNCaP измеряли штангенциркулем два раза в неделю, а результаты представляли в виде среднего объема опухоли (мм^3) $\pm$ SEM (оставались ≥ 8 мышей на группу).

Т-клеточная активация в ответ на введение ТМСВ132

Т-клеточную активацию в клетках рака предстательной железы LNCaP измеряли посредством проточной цитометрии, в частности, путем оценки положительности CD25 Т-клеток CD3⁺/CD8⁺ у 6 отдельных нормальных здоровых доноров (9642, 9672, 9762, 9772, 9832, 9852) через 72 часа после лечения ТМСВ132 (ФИГ. 7). Активацию CD3⁺ пан-Т-клеток, добавленных в соотношении эффектор: мишень 3:1, наблюдали в ответ на введение ТМСВ132 на клетки рака предстательной железы LNCaP.

Опосредованная Т-клетками цитотоксичность ТМСВ132 *in vitro*.

Анализ опосредованной Т-клетками цитотоксичности использовали для оценки цитотоксического потенциала ТМСВ132 *in vitro* с использованием долговременной визуализации на платформе Incucyte. ТМСВ132 исследовали в ТМЕФФ2-положительной клеточной линии LNCaP в присутствии выделенных пан-человеческих Т-клеток CD3⁺ от здоровых доноров при соотношении эффектор: мишень (соотношение эффектор: мишень) 3:1. Уничтожение клеток путем апоптоза контролировали путем измерения сигнала флуоресценции для активной каспазы 3/7 в течение 96 часов. ТМСВ132 способствовал дозозависимому снижению жизнеспособных клеток LNCaP с увеличением времени. Дозозависимое увеличение активности каспазы 3/7 или сигнала флуоресценции указывает на гибель клеток LNCaP в присутствии Т-клеток (ФИГ. 8). Данные показывают, что ТМСВ132 эффективен для индукции опосредованной Т-клетками гибели опухолевых клеток LNCaP.

Эффективность ТМСВ132 в развитом п/к ксенотрансплантате предстательной железы человека у гуманизированных Т-клетками мышей.

Противоопухолевую эффективность ТМСВ132 оценивали в развитых подкожных (п/к) ксенотрансплантатах человеческих клеток LNCaP у самцов мышей NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG, The Jackson Laboratory, Бар Харбор, штат Мериленд), гуманизированных Т-клетками 20e⁶. Самцы NSG. Животных рандомизировали в группы по 10 животных, каждая по среднему объему опухоли на 13 сутки после имплантации опухоли. ТМСВ132 в дозах 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг или контрольное антитело nullxCD3B219 в дозе 0,5 мг/кг вводили в/б два раза в неделю в течение 4 недель. На 45 сутки после имплантации опухоли, когда по меньшей мере семь животных оставались в каждой группе, рассчитывали ингибирование роста опухоли (% TGI) по объему опухоли. Статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали для ТМСВ132 в дозах 0,5 и 0,1 мг/кг и в дозах 0,05 мг/кг по сравнению с контролем nullxCD3 (ФИГ. 9, $p \leq 0,0001$). ТМСВ132 при 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг вызывал ингибирование роста опухоли на 102%, 109% и 47% соответственно по сравнению с контрольными образцами, получавшими лечение NullxCD3. Лечение ТМСВ132 привело к получению трех, двух и одного полного ответа при дозах 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг соответственно.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с мембранной проксимальной областью SEQ ID NO: 110 в TMEFF2.

2. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с эталонным антителом, содержащим

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 25 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 28; или

б) VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29;

с) VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30;

д) VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31;

е) VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88; или

ф) VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90.

3. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается в пределах остатков HGKCEHSINMQEPSC (SEQ ID NO: 57) или DAGYTGQHCCKDYSVL (SEQ ID NO: 58) с мембранной проксимальной областью TMEFF2.

4. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, содержащее область, определяющую комплементарность тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, область, определяющую комплементарность легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 из

а) SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно;

б) SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно;

с) SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно;

д) SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно; или

е) SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно.

5. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с равновесной константой диссоциации (K_D), равной около $0,4 \times 10^{-9}$ М или менее, причем K_D измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса в ацетатном буфере при pH 4,5-5,0 при комнатной температуре.

6. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с K_D от около $0,1 \times 10^{-10}$ М до около $0,4 \times 10^{-9}$ М.

7. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, содержащее каркас вариабельной области тяжелой цепи (VH), полученный из VH3_3-23 (SEQ ID NO: 53) или VH1_1-69 (SEQ ID NO: 54).

8. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, содержащее каркас вариабельной области легкой цепи (VL), полученный из VKI_L11 (SEQ ID NO: 55) или VKIII_A27 (SEQ ID NO: 56).

9. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, содержащие каркас VH и каркас VL, полученные из

- a) VH3_3-23 с SEQ ID NO: 53 и VKI_L11 с SEQ ID NO: 55 соответственно;
- b) VH1_1-69 с SEQ ID NO: 54 и VKIII_A27 с SEQ ID NO: 56 соответственно; или
- c) VH1_1-69 с SEQ ID NO: 54 и VKI_L11 с SEQ ID NO: 55 соответственно.

10. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, содержащее

- a) VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28;
- b) VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29;
- c) VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30;
- d) VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31;
- e) VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88; или
- f) VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90.

11. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-10, в котором указанное антитело представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

12. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, содержащее

- a) тяжелую цепь (HC) с SEQ ID NO: 32 и легкую цепь (LC) с SEQ ID NO: 35;
- b) HC с SEQ ID NO: 33 и LC с SEQ ID NO: 36;
- c) HC с SEQ ID NO: 34 и LC с SEQ ID NO: 37;
- d) HC с SEQ ID NO: 33 и LC с SEQ ID NO: 38;
- e) HC с SEQ ID NO: 91 и LC с SEQ ID NO: 92; или
- f) HC с SEQ ID NO: 93 и LC с SEQ ID NO: 94.

13. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

- a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно;
- b) VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28; и/или
- c) HC с SEQ ID NO: 32 и VL с SEQ ID NO: 35.

14. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

- a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно;
- b) VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29; и/или
- c) HC с SEQ ID NO: 33 и VL с SEQ ID NO: 36.

15. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

- a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно;

b) VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30; и/или

c) HC с SEQ ID NO: 34 и VL с SEQ ID NO: 37.

16. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно;

b) VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31; и/или

c) HC с SEQ ID NO: 33 и VL с SEQ ID NO: 38.

17. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно;

b) VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88; и/или

c) HC с SEQ ID NO: 91 и VL с SEQ ID NO: 92.

18. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

a) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно;

b) VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90; и/или

c) HC с SEQ ID NO: 93 и VL с SEQ ID NO: 94.

19. Выделенное антитело к TMEFF2 по любому из пп. 1-18, в котором указанное антитело представляет собой мультиспецифическое антитело.

20. Выделенное антитело к TMEFF2 по любому из пп. 1-19, в котором указанное антитело представляет собой биспецифическое антитело.

21. Выделенное антитело к TMEFF2 по пп. 19 или 20, в котором указанное антитело связывает CD3, необязательно CD3-эпсилон.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-21 и фармацевтически приемлемый носитель.

23. Выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-20, конъюгированное с одной или более гетерологичными молекулами.

24. Выделенный полинуклеотид

a) кодирующий антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 13-18;

b) кодирующий VH антитела к TMEFF2 с SEQ ID NO: 25, 26, 27, 87 или 89 и/или VL с SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 88 или 90.

c) содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101 или 102.

25. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 24.

26. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 25.

27. Способ получения антитела к TMEFF2 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 13-18, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 26 в условиях, в которых антитело экспрессируется, и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.

28. Способ лечения TMEFF2-положительного рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного антитела к TMEFF2 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-21 или фармацевтической композиции по п. 22 субъекту для лечения TMEFF2-положительного рака.

29. Способ по п. 28, в котором TMEFF2-положительный рак представляет собой рак предстательной железы.

30. Способ по п. 29, в котором рак предстательной железы представляет собой рецидивирующий, рефрактерный, злокачественный или устойчивый к кастрации рак предстательной железы или любую их комбинацию.

31. Способ по любому из пп. 28-30, в котором антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

32. Способ по п. 31, в котором второй терапевтический агент представляет собой хирургическое вмешательство, химиотерапию, терапию по депривации андрогенов или облучение, или любую их комбинацию.

33. Антиидиотипическое антитело, связывающееся с антителом по любому из пп. 13-18.

34. Набор, содержащий антитело по любому из пп. 13-18.

35. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3.

36. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 35, в котором указанное антитело связывается с мембранной проксимальной областью SEQ ID NO: 110 в TMEFF2.

37. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по пп. 35 или 36, в котором указанное антитело конкурирует за связывание с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с эталонным антителом, содержащим

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 25 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 28; или

б) VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29;

с) VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30;

д) VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31;

е) VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88; или

ф) VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90.

38. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его

антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 35-37, в котором указанное антитело связывается в пределах остатков HGKCEHSINMQEPSC (SEQ ID NO: 57) или DAGYTGQHCCKDYSVL (SEQ ID NO: 58) с мембранной проксимальной областью TMEFF2.

39. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 35-38, в котором указанное антитело связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с константой диссоциации (K_D) около $0,4 \times 10^{-9}$ М или менее, при этом K_D измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса в ацетатном буфере при pH 4,5-5,0 при комнатной температуре.

40. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 39, в котором указанное антитело связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2 человека с K_D от около $0,1 \times 10^{-10}$ М до около $0,4 \times 10^{-9}$ М.

41. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 35-40, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с

- a) SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно;
- b) SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно;
- c) SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно;
- d) SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно; или
- e) SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно.

42. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 41, в котором второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с

- a) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно; или
- b) SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно.

43. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 35-42, в котором первый домен содержит

- a) VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28;
- b) VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29;
- c) VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30;
- d) VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31
- e) VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88; или
- f) VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90.

44. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 35-43, в котором второй домен содержит

- a) VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; или
- b) VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75.

45. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и

второй домен, который связывает CD3, в котором

а) первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

б) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

с) биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первую тяжелую цепь (HC1) с SEQ ID NO: 32, первую легкую цепь (LC1) с SEQ ID NO: 35, вторую тяжелую цепь (HC2) с SEQ ID NO: 76 и вторую легкую цепь (LC2) с SEQ ID NO: 77.

46. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором

а) первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

б) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

с) биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 32, LC1 с SEQ ID NO: 35, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

47. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором

а) первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

б) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

с) биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 36, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

48. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором

а) первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 19, 21 и 23 соответственно, а второй домен содержит HCDR1,

HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

б) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 29, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

с) биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 36, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

49. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором

а) первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

б) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

с) биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 34, LC1 с SEQ ID NO: 37, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

50. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором

а) первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 14, 17, 18, 20 и 24 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

б) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

с) биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 34, LC1 с SEQ ID NO: 37, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

51. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором

а) первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

б) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

с) биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 38, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

52. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором

а) первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 11, 13, 16, 18, 20 и 22 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

б) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 26 и VL с SEQ ID NO: 31, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

с) биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 38, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

53. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором

а) первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

б) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

с) биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 91, LC1 с SEQ ID NO: 92, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

54. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором

а) первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

б) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 87 и VL с SEQ ID NO: 88, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

с) биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 91, LC1 с SEQ ID NO: 92, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

55. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его

антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором

а) первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 и 65 соответственно;

б) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 66 и VL с SEQ ID NO: 67; и/или

с) биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 93, LC1 с SEQ ID NO: 94, HC2 с SEQ ID NO: 76 и LC2 с SEQ ID NO: 77.

56. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, в котором

а) первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 10, 12, 15, 18, 20 и 86 соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 и 73 соответственно;

б) первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 89 и VL с SEQ ID NO: 90, а второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 74 и VL с SEQ ID NO: 75; и/или

с) биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 93, LC1 с SEQ ID NO: 94, HC2 с SEQ ID NO: 78 и LC2 с SEQ ID NO: 79.

57. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 35-56, в котором указанное антитело представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

58. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 35-57, в котором указанное антитело содержит аланин в положении 234, аланин в положении 235 или аланин в положении 234 и аланин в положении 235 в HC1, в HC2 или в HC1 и HC2, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

59. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 35-58, в котором указанное антитело содержит пролин в положении 228 в HC1 и в HC2, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

60. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2 x CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 35-59, в котором указанное антитело содержит фенилаланин в положении 405 и аргинин в положении 409 в HC1 и лейцин в положении 405 и лизин в положении 409 в HC2.

61. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело к

TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 35-60 и фармацевтически приемлемый носитель.

62. Полинуклеотид,

а) кодирующий биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 45-56 или

б) содержащий полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 80, 81, 82, 83, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101 и 102.

63. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 62.

64. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 63.

65. Способ получения биспецифического антитела к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 64 в условиях, при которых экспрессируется антитело, и выделение и очистку биспецифического антитела к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента, продуцируемого клеткой-хозяином.

66. Способ получения биспецифического антитела к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 45-56, включающий:

а) объединение моноспецифического двухвалентного антитела TMEFF2, имеющего две идентичные HC1 и две идентичные LC1, и моноспецифического двухвалентного антитела CD3, имеющего две идентичные HC2 и две идентичные LC2, в смеси с молярным соотношением около 1:1;

б) введение в смесь восстанавливающего агента;

с) инкубирование смеси в течение от около девяноста минут до около шести часов;

д) удаление восстанавливающего агента; и

е) очистку биспецифического антитела к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента, которое содержит HC1, LC1, HC2 и LC2.

67. Способ по п. 66, в котором восстанавливающий агент представляет собой 2-меркаптоэтанолламин (2-MEA).

68. Способ по п. 67, в котором 2-MEA присутствует в концентрации от около 25 mM до около 75 mM.

69. Способ по любому из пп. 66-68, в котором стадию инкубации проводят при температуре от около 25°C до около 37 °C.

70. Способ лечения TMEFF2-положительного рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 45-60 или фармацевтической композиции по п. 61 субъекту для лечения TMEFF2-положительного рака.

71. Способ по п. 70, в котором TMEFF2-положительный рак представляет собой рак предстательной железы.

72. Способ по п. 71, в котором рак предстательной железы представляет собой рецидивирующий, рефрактерный, злокачественный или устойчивый к кастрации рак

предстательной железы или любую их комбинацию.

73. Способ по любому из пп. 70-72, в котором биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

74. Способ по п. 73, в котором второй терапевтический агент представляет собой хирургическое вмешательство, химиотерапию, терапию по депривации андрогенов или облучение, или любую их комбинацию.

75. Антиидиотипическое антитело, связывающееся с биспецифическим антителом к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пунктов 45-56.

76. Набор, содержащий антитело по любому из пп. 45-56.

77. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 45-56 для применения в терапии.

78. Выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 45-56 для применения при лечении TMEFF2-положительного рака.

79. Применение выделенного биспецифического антитела к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 45-60 для производства лекарственного средства для лечения TMEFF2-положительного рака.

По доверенности

ФИГ. 1

25 EVQLLESGGGLVQR-GGSLRPSCAASGFTFS
27 EVQLLESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGFTFS
87 EVQLLESGGGLVQP-GGSLRLSCAASGFTFS
89 EVQLLESGGGLVQP-GGSLRLSCAASGFTFS

25 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGFTDY
27 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGGGSFTSY
87 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGFTDY
89 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGFTDY
*****.*.*.*

25 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAED
27 ADSVKGRFTISRDN SNNTLYLQMSSLRAED
87 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED
89 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAED
*****:*****:*.*****

25 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLVTVSS
27 TAFYYCARMPLNSPHDCWGQGLVTVSS
87 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLVTVSS
89 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLVTVSS
.****

ФИГ. 2

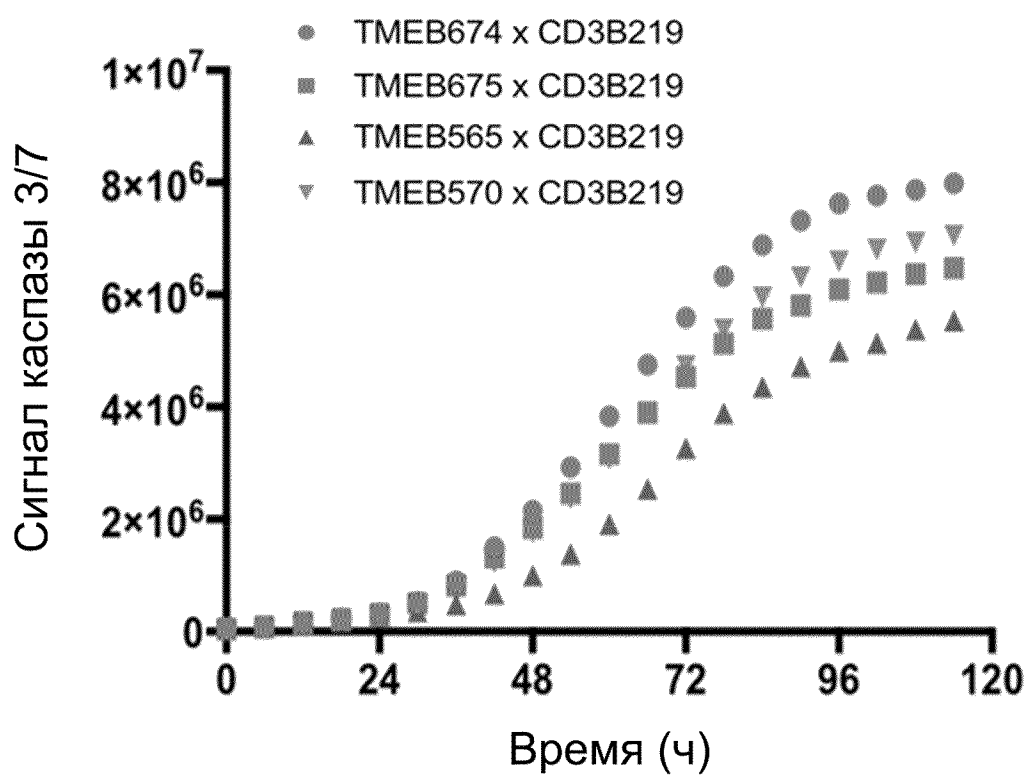
```
28      AIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIR
30      AIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIR
88      DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIR
90      AIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIR
      *****

28      NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
30      NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
88      NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
90      NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
      *****

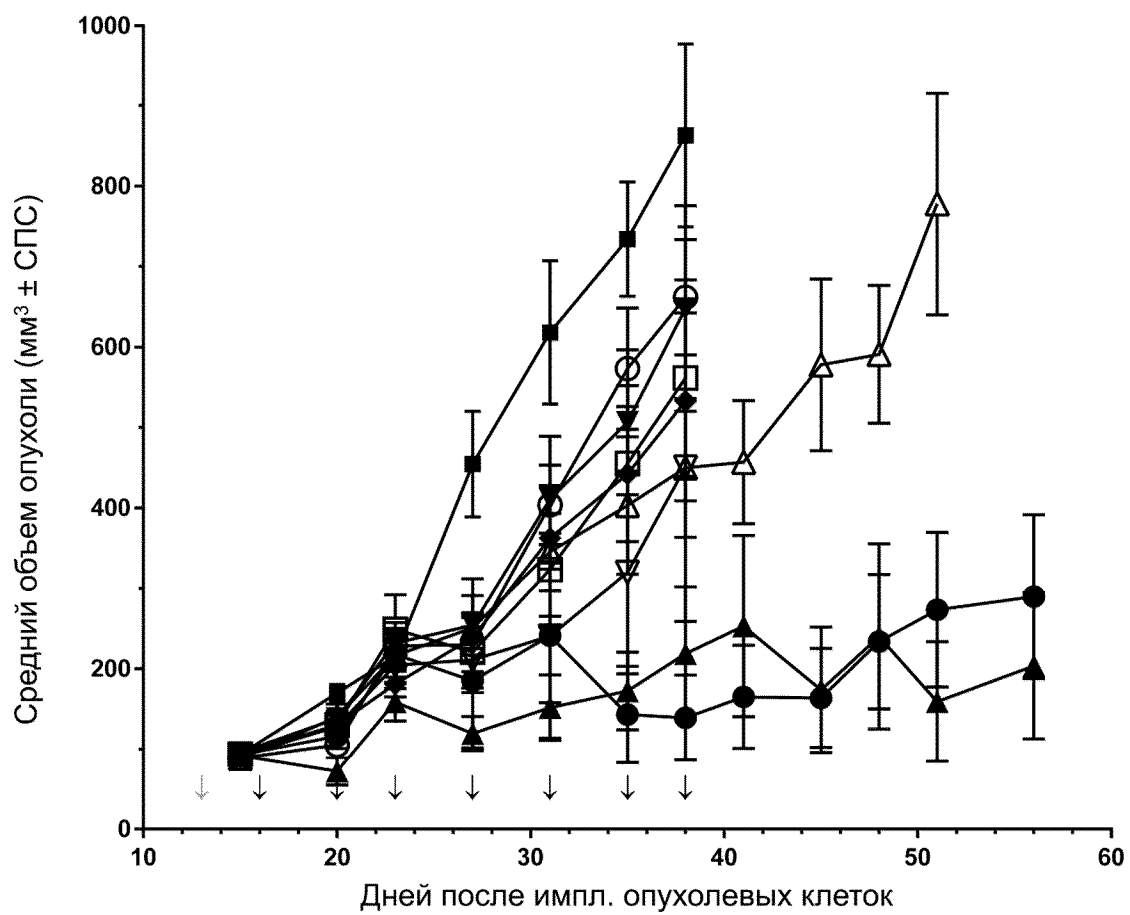
28      RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQ
30      RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQ
88      RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQ
90      RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQ
      *****

28      DYNYALTFGGGTKVEIK
30      DYNYSLTFGGGTKVEIR
88      DYNYPLTFGGGTKVEIK
90      DYNYPLTFGGGTKVEIK
      ****.*****;
```

ФИГ. 3

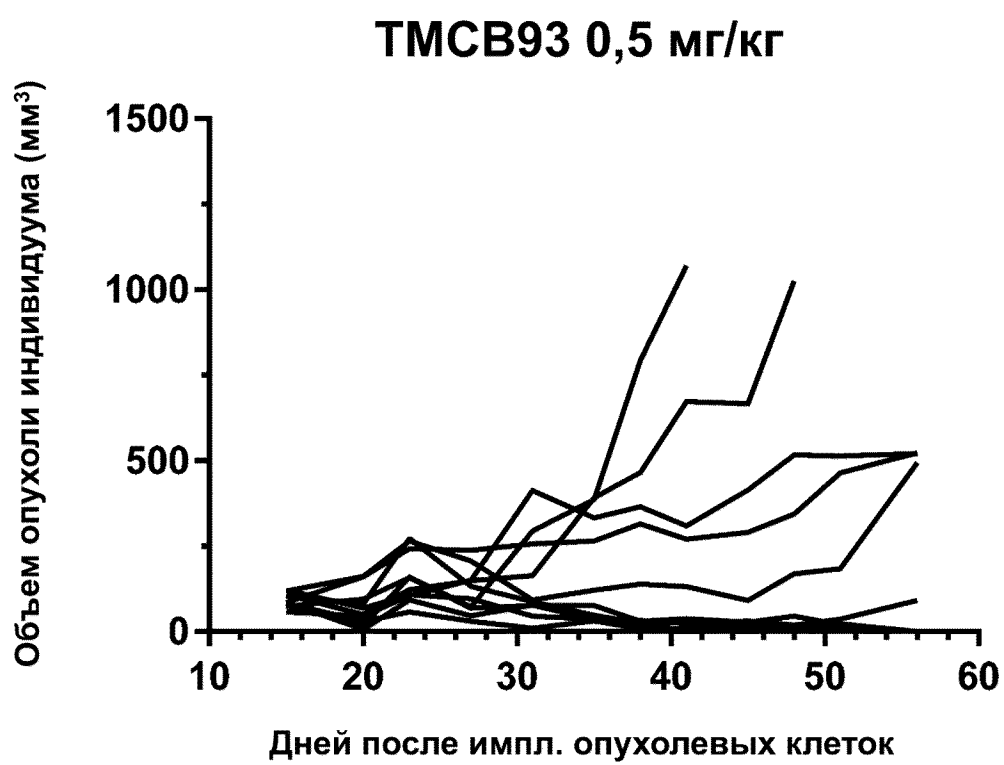


ФИГ. 4

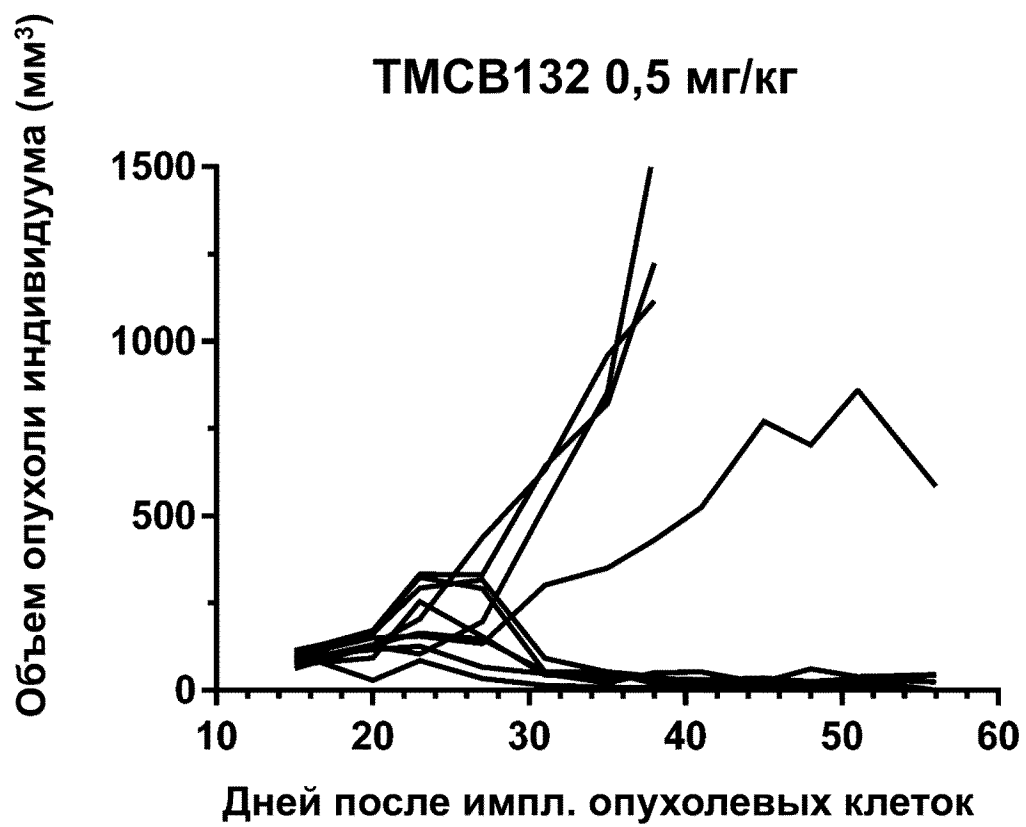


- NullxCD3 5 мг/кг
- TMCB93 5 мг/кг
- ▲ TMCB93 0,5 мг/кг
- ▼ TMCB101 5 мг/кг
- ◆ TMCB101 0,5 мг/кг
- ⊖ TMCB131 5 мг/кг
- TMCB131 0,5 мг/кг
- △ TMCB132 5 мг/кг
- ▽ TMCB132 0,5 мг/кг
- ↓ И/п 2 раза в неделю
- ⇓ Т-клетки

ФИГ. 5А

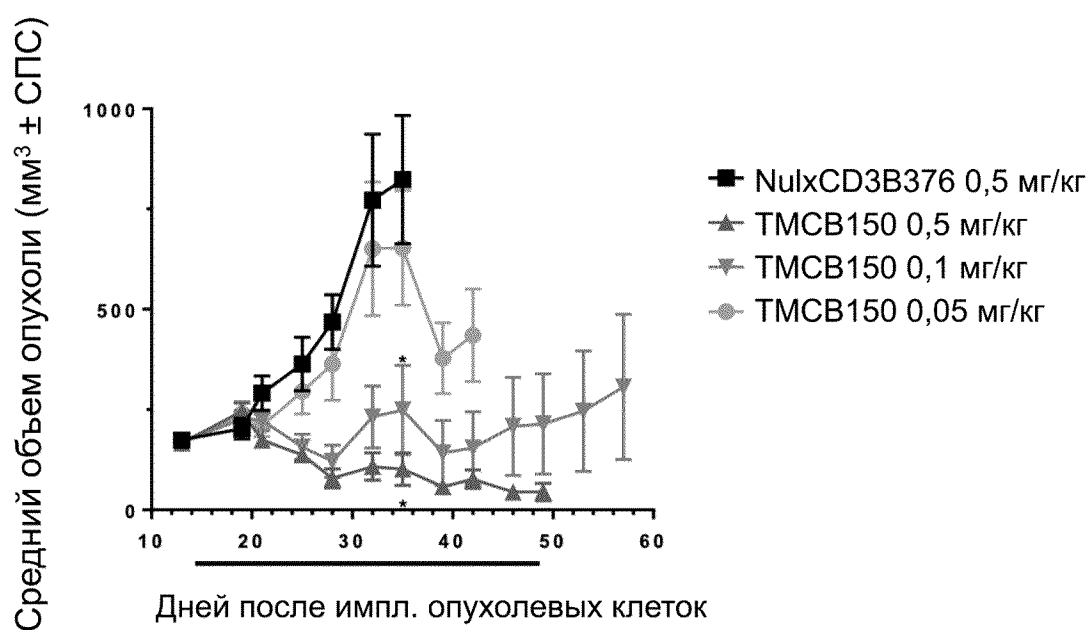


ФИГ. 5В



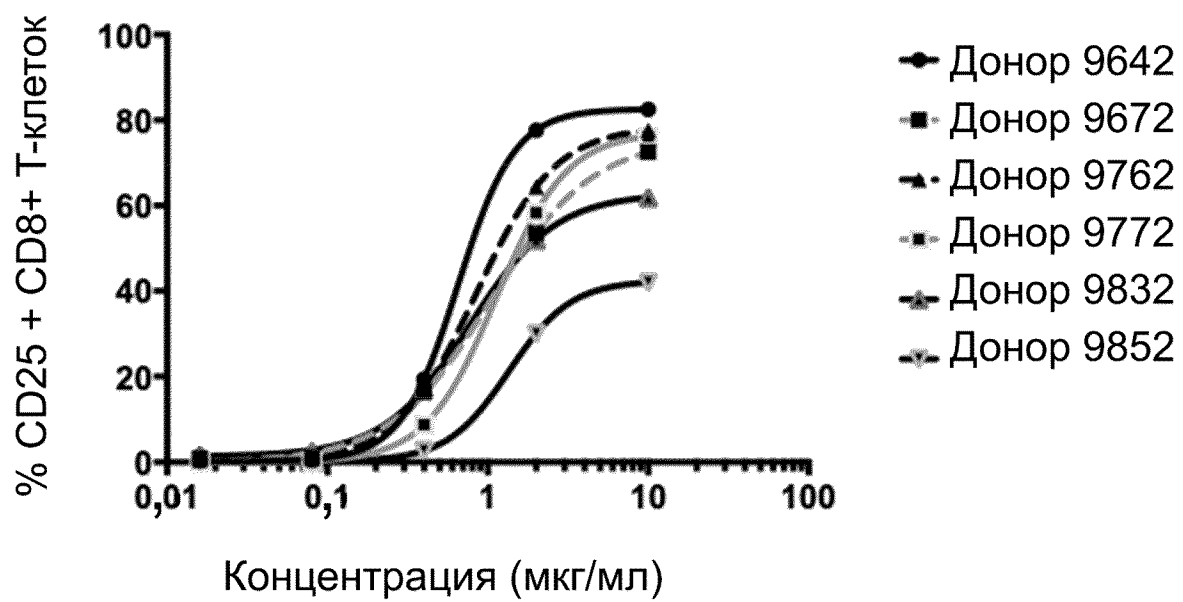
ФИГ. 6

Fi

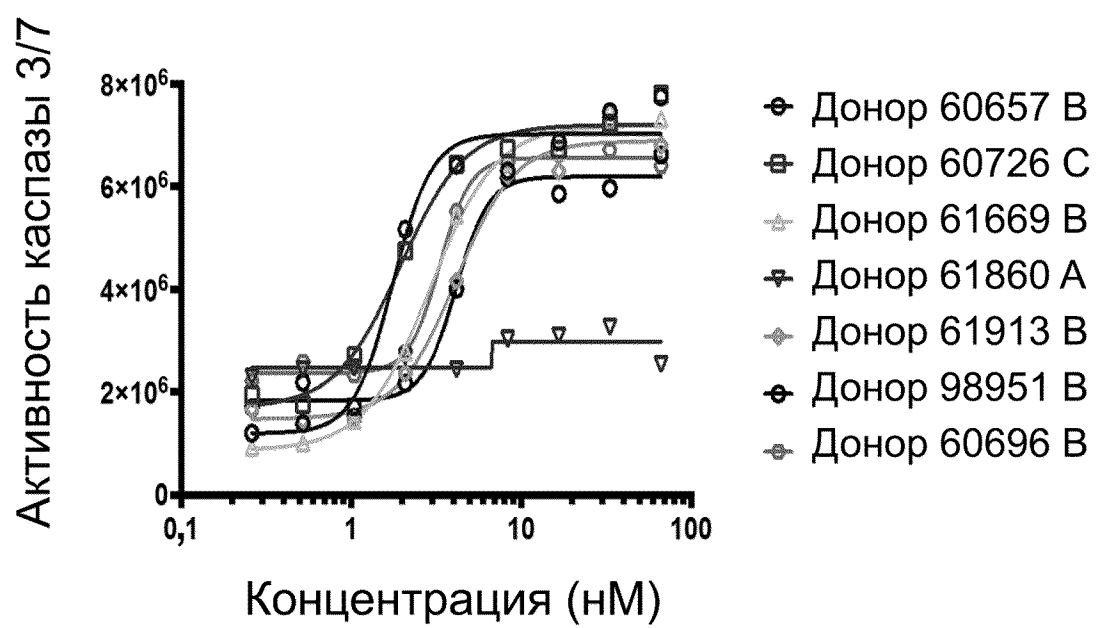


* $P \leq 0,0001$ для контроля относительно лечения, рассчитанного с помощью линейного анализа смешанных эффектов с последующими парными сравнениями. Столбец под осью X представляет период дозирования.

ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9

