

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041830**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.07

(21) Номер заявки
201790674

(22) Дата подачи заявки
2015.09.25

(51) Int. Cl. **C12N 15/09** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО, СВЯЗЫВАЮЩЕЕ ГЛИПИКАН 3 И CD3ε (ВАРИАНТЫ), ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ЕГО, И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭТОГО АНТИТЕЛА

(31) 2014-197315

(32) 2014.09.26

(33) JP

(43) 2017.08.31

(86) PCT/JP2015/077024

(87) WO 2016/047722 2016.03.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ
КАЙСЯ (JP)**

(72) Изобретатель:
**Недзу Дзюнити, Нарита Ацуси,
Исигуро Такаhiro, Сакураи Мика,
Сираива Хиротаке, Хиронива Наока,
Игава Томоюки, Каваи Юмико (JP)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) CN-A-103833852
WO-A1-2012073985
WO-A1-2014051433
JP-A-2012082201
MERCHANT, A.M. et al., "An efficient route to human bispecific IgG", NATURE BIOTECHNOLOGY, 1998.07, Vol. 16, No. 7, pp. 677-681, ISSN 1087-0156, particularly, page 677, lower left column, lines 25 to 29
NAKANO, K. et al., "Anti-glypican 3 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 2009.01.09, Vol. 378, No. 2, pp. 279-284, ISSN 1090-2104
WO-A1-2013181543
WO-A2-2008118970

(57) В изобретении описаны новые биспецифические антитела, которые содержат вариабельную область антитела, имеющую домен, связывающий глипикан 3, и вариабельную область антитела, имеющую CD3ε-связывающий домен, и сохраняют очень высокую цитотоксическую активность и безопасность. Кроме того, в ней описан способ получения таких антител, а также фармацевтическая композиция для лечения рака, включающего глипикан 3 экспрессирующие раковые клетки. Для получения антител были сконструированы соответствующие нуклеиновые кислоты, векторы экспрессии и клетки-хозяина.

B1

041830

041830

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим антигенсвязывающим молекулам, их применениям и т.п.

Предпосылки создания изобретения

Антитела привлекают внимание в качестве терапевтических средств благодаря их высокой стабильности в плазме и небольшому количеству нежелательных реакций (непатентные документы 1 и 2). Известно, что антитела индуцируют не только антигенсвязывающую активность, агонистическое действие и антагонистическое действие, но также и опосредуемые эффектором виды цитотоксической активности (которые называют также эффекторными функциями), такие как антитело-обусловленная клеточная независимая цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC), и обладают противоопухолевыми действиями в отношении раковых клеток (непатентный документ 3). ADCC представляет собой обусловленную эффекторными клетками цитотоксичность в отношении "нагруженных" антителом раковых клеток-мишеней посредством связывания Fc-области антитела с Fc-рецептором, присутствующим на эффекторных клетках, таких как NK-клетки и макрофаги. Комплекс системы связывается с комплементсвязывающим сайтом, присутствующим в структуре антитела. CDC является вредной для клеток в результате клеточной деструкции, при которой приток воды и ионов в клетки усиливается благодаря образованию пор на клеточной мембране "нагруженных" антителом клеток с помощью компонентов комплемента, присутствующих в комплексе. Создан ряд терапевтических антител с установленными очень высокими противоопухолевыми действиями в качестве фармацевтических средств для лечения рака (непатентный документ 4).

Для того чтобы антитело обуславливало ADCC, ADCP и CDC, необходимо наличие Fc-области в антителе и присутствие рецептора для антитела (FcγR) на эффекторных клетках, таких как NK-клетки и макрофаги, и различных компонентов комплемента, пригодных для связывания. У человека описаны изоформы FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa и FcγRIIIb в качестве семейства белка FcγR, кроме того, описаны соответствующие аллотипы (непатентный документ 5). Среди указанных изоформ FcγRIa, FcγRIIa и FcγRIIIa несут активирующий мотив на основе тирозина иммунорецептора (ITAM) во внутриклеточном домене и передают сигналы активации. С другой стороны, только FcγRIIb несет домен, известный как ингибирующий мотив на основе рецептора тирозина (ITIM), во внутриклеточном домене и передает сигналы ингибирования. Известно, что каждый из FcγR передает сигналы посредством перекрестного сшивания иммунными комплексами и т.п. (непатентный документ 6). Когда антитела фактически проявляют эффекторную функцию на раковых клетках, FcγR на мембране эффекторной клетки образуют кластеры на Fc-областях нескольких антител, связанных на мембране раковой клетки, и сигналы активации передаются эффекторными клетками. В результате проявляется цитоцидное действие, но поскольку FcγR перекрестно сшиваются только на эффекторных клетках, которые в это время присутствуют вблизи раковых клеток, установлено, что активация иммунитета происходит локально в раковых клетках (непатентный документ 7).

Встречающиеся в естественных условиях иммуноглобулины связываются с антигенами в их вариабельных областях и связываются с рецепторами, такими как FcγR, FcRn, FcαR и FcεR, и комплементами в их константных областях. FcRn является одной из связывающихся молекул, которые взаимодействуют с Fc-областью IgG, и установлено, что, поскольку каждая из тяжелых цепей антитела связывается с одной молекулой FcRn, две молекулы FcRn связываются с одной молекулой антитела IgG-типа. Однако в отличие от FcRn и др., FcγR взаимодействует с шарнирной областью антитела и CH2-доменом, и только одна молекула FcγR связывается с одной молекулой антитела IgG-типа (непатентный документ 8). Кроме того, каноническое встречающееся в естественных условиях антитело IgG-типа распознает и связывает единственный эпитоп через его вариабельную область (Fab); поэтому оно может связываться только с одним антигеном. С другой стороны, известно, что с раком и воспалением связано много типов белков и поэтому может иметь место перекрестная помеха между белками. Например, известно, что несколько воспалительных цитокинов (TNF, IL1 и IL6) могут участвовать в иммунологических заболеваниях (непатентный документ 9). Кроме того, известно, что одним из механизмов приобретения устойчивости рака к лекарственным средствам является активация других рецепторов (непатентный документ 10). В таких случаях канонические антитела, которые распознают единственный эпитоп, не могут ингибировать несколько белков.

Антитела (биспецифические антитела), одна молекула которых связывается с двумя или большим количеством типов антигенов, изучены в качестве молекул, которые ингибируют несколько мишеней. Можно получать связывающие активности с двумя различными антигенами (первый антиген и второй антиген) путем модификации встречающихся в естественных условиях антител IgG-типа (непатентный документ 11). Таким образом, можно не только нейтрализовать два или большее количество типов антигенов с помощью одной молекулы, но также усиливать противоопухолевую активность с помощью перекрестных связей между клетками, которые обладают цитотоксической активностью, и раковыми клетками. К настоящему времени в качестве молекулярных форматов биспецифического антитела описаны молекула, содержащая антигенсвязывающий сайт, добавленный к N- или C-концу антитела (DVD-Ig и scFv-

IgG), молекула, имеющая различные последовательности двух Fab-областей антитела (содержащее общую L-цепь биспецифическое антитело и гибридная гибридома), молекула, в которой одна область Fab распознает два антигена (IgG два-в-одном), и молекула, имеющая петлю СН3-области в качестве нового антигенсвязывающего сайта (Fcab) (непатентный документы 12 и 13). Поскольку все биспецифические антитела взаимодействуют на их Fc-областях с Fc γ R, эффекторные функции антитела сохраняются. Таким образом, биспецифическое антитело связывается с любым антигеном, который оно распознает, и одновременно связывается с Fc γ R, и обуславливает ADCC-активность в отношении клеток, экспрессирующих антиген.

Если все антигены, распознаваемые биспецифическим антителом, специфически экспрессируются при раке, то биспецифическое антитело обладает цитотоксическим действием в отношении раковых клеток, когда оно связывается с любым из антигенов. Таким образом, по сравнению с каноническим фармацевтическим антителом, которое распознает один антиген, можно ожидать, что указанное антитело будет обладать более эффективным противоопухолевым действием. Однако в случае, когда любой один из антигенов, распознаваемых биспецифическим антителом, экспрессируется в здоровых тканях или клетках, экспрессируемых на иммунocyтах, то имеет место повреждение здоровых тканей или высвобождение цитокинов в результате перекрестного связывания с Fc γ R (непатентный документ 14). В результате индуцируются сильные нежелательные реакции.

Перенаправляющее T-клетку антитело, которое использует цитотоксичность, активируя T-клетки в качестве эффекторных клеток, что является механизмом его противоопухолевого действия, известно с 1980-х годов (непатентные документы 15, 16 и 17). В отличие от антител, которые используют ADCC, активируя NK-клетки или макрофаги в качестве эффекторных клеток, что является механизмом их противоопухолевого действия, перенаправляющее T-клетки антитело представляет собой антитело против любой одной из субъединиц, из которых состоит комплекс T-клеточного рецептора (TCR) на T-клетках, и представляет собой специфическое биспецифическое антитело, которое содержит антитело, связывающееся с эpsilon-цепью CD3, и антитело, связывающееся с антигеном на раковой клетке-мишени. T-клетки приходят в контакт с раковыми клетками посредством одновременного связывания эpsilon-цепи CD3 и ракового антигена с помощью перенаправляющего T-клетки антитела. Это в результате приводит к противоопухолевому действию в отношении раковых клеток благодаря цитотоксической активности, обусловленной T-клетками.

Катумаксомаб, известный в качестве перенаправляющего T-клетки антитела, связывается на посредством двух Fab с раковым антигеном (ErCAM) и с CD3 ϵ - (CD3-epsilon) цепью, экспрессируемой на T-клетках. Катумаксомаб индуцирует опосредуемую T-клетками цитотоксическую активность путем одновременного связывания с раковым антигеном и CD3 ϵ и индуцирует цитотоксическую активность, опосредуемую антигенпрезентирующими клетками, такими как NK-клетки и макрофаги, путем одновременного связывания с раковым антигеном и Fc γ R. Благодаря указанным двум видам цитотоксической активности катумаксомаб обладает высоким терапевтическим действием в отношении злокачественных асцитов при внутривенном введении и поэтому его применение разрешено в Европе (непатентный документ 18). Кроме того, известны случаи, когда по имеющимся сведениям введение катумаксомаба приводит к образованию реактивных в отношении раковых клеток антител, что четко демонстрирует индукцию приобретенного иммунитета (непатентный документ 19). С учетом указанного результата привлекли внимание антитела, которые обладают как опосредуемой T-клетками цитотоксической активностью, так и опосредуемыми Fc γ R действиями таких клеток как NK-клетки или макрофаги (указанные антитела обозначают как трифункциональные антитела), поскольку для них можно ожидать сильное противоопухолевое действие и индукцию приобретенного иммунитета.

Однако трифункциональные антитела связываются одновременно с CD3 ϵ и Fc γ R даже в отсутствии ракового антигена и поэтому обеспечивают перекрестное сшивание экспрессирующих CD3 ϵ T-клеток с экспрессирующими Fc γ R клетками даже при отсутствии в окружении раковых клеток, что приводит к производству в больших количествах различных цитокинов. Указанная независимая от ракового антигена индукция производства различных цитокинов в настоящее время ограничивает применение трифункциональных антител внутривенным путем (непатентный документ 20). Трифункциональные антитела очень трудно вводить системно из-за серьезных напоминаящих "цитокиновый шторм" нежелательных реакций. Фактически, на фазе I клинического испытания было установлено, что максимальной переносимой дозой при системном введении катумаксомаба пациентам с немелкоклеточным раком легкого является очень низкая доза, составляющая 5 мкг/организм, и что введение более высокой дозы вызывает серьезные нежелательные реакции (непатентный документ 21).

Так, созданные с помощью общепринятых методик биспецифические антитела могут связываться с обоими антигенами, при этом первый антиген представляет собой раковый антиген (ErCAM), а второй антиген представляет собой CD3 ϵ , одновременно с этим они связываются с Fc γ R; и поэтому с учетом их молекулярной структуры невозможно избежать нежелательных реакций, вызываемых одновременным связыванием с Fc γ R и вторым антигеном CD3 ϵ .

При этом, в отличие от катумаксомаба, ViTE (биспецифический активатор (проводник) T-клеток) не

содержит сайт связывания Fcγ-рецептора и поэтому у него отсутствует перекрестное сшивание с рецепторами, которые экспрессируются на Т-клетках и таких клетках, как НК-клетки и макрофаги, зависимым от ракового антигена образом. Так, было продемонстрировано, что ViTE не вызывает независимую от ракового антигена индукцию цитокинов, которая обнаружена при введении катумаксомаба. Однако, поскольку ViTE представляет собой модифицированную низкомолекулярную молекулу антитела без Fc-области, проблема заключается в том, что время его полужизни в крови после введения пациенту, существенно короче, чем в случае антител IgG-типа, которые обычно применяют в качестве терапевтических антител. Фактически, согласно опубликованным данным время полужизни в крови ViTE при его применении *in vivo* составляет примерно несколько часов (непатентные документы 22 и 23). При проведении клинических испытаний блинатумомаба его вводили путем непрерывной внутривенной инфузии с помощью мининасоса. Такой метод введения не только чрезвычайно неудобен для пациентов, но также имеет потенциальный риск медицинских осложнений, связанных с неисправностью устройства или т.п. Таким образом, нельзя считать, что указанный метод введения является желательным.

В последние годы применение Fc-области с пониженной способностью связываться с FcγR позволило сохранять сильную противоопухолевую активность, свойственную ViTE, и очень хорошие характеристики безопасности без индукции "цитокинового шторма" зависимым от ракового антигена образом, и обеспечило создание новых полипептидных структур с продолжительным временем полужизни в крови (патентный документ 1).

С другой стороны, когда происходит экспрессия созданного с помощью общепринятых методик биспецифического антитела, то экспрессируются два типа H-цепей и два типа L-цепей, что может приводить к получению десяти комбинаций. Из них только одна из полученных комбинаций обладает представляющей интерес специфичностью связывания. Таким образом, для получения представляющего интерес биспецифического антитела одно представляющее интерес антитело должны быть выделено из десяти типов антител, такой путь является очень неэффективным и сложным.

В качестве решения указанной проблемы был описан метод, заключающийся в предпочтительном секретировании IgG с гетеродимерной комбинацией H-цепей, например с комбинацией H-цепи против антигена А и H-цепи против антигена Б, посредством интродукции аминокислотных замен в СН3-область H-цепи IgG (патентные документы 2, 3, 4, 5, 6, 7 и непатентные документы 24 и 25). В качестве таких методов описаны методы на основе физического нарушения, т.е. "выступа" и "впадины", и метод на основе отталкивания электрических зарядов.

Для получения представляющей интерес молекулы с повышенной эффективностью, описаны методы, основанные на применении L-цепей, которые могут связываться с двумя различными антигенами, даже хотя L-цепи имеют одинаковую аминокислотную последовательность (патентные документы 8 и 9). Однако аффинность к антигену может значительно уменьшаться при применении общих L-цепей и трудно найти общие L-цепи, при использовании которых сохраняется аффинность к антигену.

Перечень перечисленных документов

Патентные документы.

Патентный документ 1. WO2012/073985.

Патентный документ 2. WO96/27011.

Патентный документ 3. WO2006/106905.

Патентный документ 4. WO2007/147901

Патентный документ 5. WO2009/089004.

Патентный документ 6. WO2010/129304.

Патентный документ 7. WO2013/065708.

Патентный документ 8. WO98/050431.

Патентный документ 9. WO2006/109592.

Непатентные документы.

Непатентный документ 1. Nat. Biotechnol. 23, 2005, с. 1073-1078.

Непатентный документ 2. Eur J Pharm Biopharm. 59 (3), 2005, с. 389-396.

Непатентный документ 3. Drug Des Devel Ther 3, 2009, с. 7-16.

Непатентный документ 4. Clin Cancer Res. 16 (1), 2010, с. 11-20.

Непатентный документ 5. Immunol. Lett. 82, 2002, с. 57-65.

Непатентный документ 6. Nat. Rev. Immunol. 8, 2008, с. 34-47.

Непатентный документ 7. Ann. Rev. Immunol. 6, 1988, с. 251-281.

Непатентный документ 8. J. Bio. Chem., 276, 2001, с. 16469-16477.

Непатентный документ 9. Nat. Biotech., 28, 2011, с. 502-510.

Непатентный документ 10. Endocr Relat Cancer 13, 2006, с. 45-51.

Непатентный документ 11. MAbs. 1 марта 2012 г., 4(2).

Непатентный документ 12. Nat. Rev. 10, 2010, с. 301-316.

Непатентный документ 13. Peds 23(4), 2010, с. 289-297.

Непатентный документ 14. J. Immunol. 163(3), 1 августа 1999 г., с. 1246-1252.

- Непатентный документ 15. Nature 314 (6012), 1985, с. 628-631.
 Непатентный документ 16. Int J Cancer 41 (4), 1988, с. 609-615.
 Непатентный документ 17. Proc Natl Acad Sci USA 83 (5), 1986, с. 1453-1457.
 Непатентный документ 18. Cancer Treat Rev. 36(6), октябрь 2010 г., с. 458-467.
 Непатентный документ 19. Future Oncol. 8(1), январь 2012 г., с. 73-85.
 Непатентный документ 20. Cancer Immunol Immunother. 56(9), 2007, с. 1397-1406.
 Непатентный документ 21. Cancer Immunol Immunother. 56 (10), 2007, с. 1637-1644.
 Непатентный документ 22. Cancer Immunol Immunother. 55(5), 2006, с. 503-514.
 Непатентный документ 23. Cancer Immunol Immunother. 58(1), 2009, с. 95-109.
 Непатентный документ 24. Protein Engineering, т.9, 1996, с. 617-621.
 Непатентный документ 25. Nature Biotechnology, т.16, 1998, с. 677-681.

Краткое изложение сущности изобретения
Задачи, положенные в основу изобретения

Настоящее изобретение было создано с учетом вышеуказанных обстоятельств. В основу настоящего изобретения была положена задача создать мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые обладают способностью приводить в контакт Т-клетки с раковыми клетками-мишенями и которые можно применять для лечения рака, используя цитотоксическую активность Т-клеток против раковых тканей-мишеней, которые содержат экспрессирующие глипикан 3 клетки, и представляют собой молекулярные форматы, которые можно получать с высокой эффективностью; разработать способы получения антигенсвязывающих молекул; и фармацевтические композиции, которые содержат антигенсвязывающие молекулы в качестве действующего вещества.

Средства решения указанных задач

При создании настоящего изобретения описана L-цепь, общая с доменом, который содержит переменную область связывающегося с глипиканом 3 антитела, и доменом, который содержит переменная область антитела, связывающегося с комплексом Т-клеточного рецептора, при этом общая L-цепь обладает способностью повышать аффинность к обоим антигенам. Это обеспечивает получение молекулярных форм с высокой эффективностью, и дополнительно описаны новые мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые сохраняют сильную противоопухолевую активность, характерную для перенаправляющих Т-клетки антител, таких как BiTE, и обладают очень хорошими характеристиками безопасности, не индуцируя "цитокиновый шторм" в зависимости от ракового антигена, а также обладают продолжительным временем полужизни в крови. Кроме того, при создании настоящего изобретения установлено, что мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые содержат общие L-цепи, нацелены на экспрессирующие глипикан 3 раковые клетки и вызывают повреждение клеток. На основе указанного открытия при создании настоящего изобретения установлено, что мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, вызывают повреждение раковых тканей, которые содержат экспрессирующие глипикан 3 раковые клетки.

Более конкретно, в настоящем изобретении предложено следующее.

1. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит:

- (1) домен, содержащий переменную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении глипикана 3,
- (2) домен, содержащий переменную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и
- (3) домен, содержащий Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fc γ -рецептора, в которой переменные области L-цепи, содержащиеся в переменной области, указанной в подпункте (1), и в переменной области, указанной в подпункте (2), имеют общую аминокислотную последовательность; где мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула обладает цитотоксической активностью, эквивалентной или более высокой по сравнению с активностью биспецифического антитела GPC3_ERY22_rCE115, которое содержит домен, связывающий глипикан 3, содержащий SEQ ID NO: 47 и 48, и домен, связывающий комплекс Т-клеточного рецептора, содержащий SEQ ID NO: 49 и 50.

2. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1, цитотоксическая активность которой представляет собой зависимость от Т-клетки цитотоксическую активность.

3. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1 или 2, в которой связывающая активность в отношении комплекса Т-клеточного рецептора представляет собой связывающую активность в отношении Т-клеточного рецептора.

4. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-3, в которой связывающая активность в отношении комплекса Т-клеточного рецептора представляет собой связывающую активность в отношении CD3 ϵ -цепи.

5. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-4, в которой переменная область антитела, указанная в подпункте (1) в п.1, представляет собой переменную область антитела, которая содержит любую одну из комбинаций CDR1, CDR2 и CDR3 H-цепи, выбранную из указанных ниже в подпунктах (a1)-(a5), или функционально эквивалентную переменную область антитела:

тельностям CDR1-, CDR2- и CDR3-участков, которые содержатся в SEQ ID NO: 103;

(в16) CDR1, CDR2 и CDR3, которые содержатся в вариательной области антитела, указанной в подпункте (1) в п.1, и идентичные аминокислотным последовательностям CDR1-, CDR2- и CDR3-участков, которые содержатся в SEQ ID NO: 215; и CDR1, CDR2 и CDR3, которые содержатся в вариательной области антитела, указанной в подпункте (2) в п.1, и идентичные аминокислотным последовательностям CDR1-, CDR2- и CDR3-участков, которые содержатся в SEQ ID NO: 122;

(в17) CDR1, CDR2 и CDR3, которые содержатся в вариательной области антитела, указанной в подпункте (1) в п.1, и идентичные аминокислотным последовательностям CDR1-, CDR2- и CDR3-участков, которые содержатся в SEQ ID NO: 215; и CDR1, CDR2 и CDR3, которые содержатся в вариательной области антитела, указанной в подпункте (2) в п.1, и идентичные аминокислотным последовательностям CDR1-, CDR2- и CDR3-участков, которые содержатся в SEQ ID NO: 129;

(в18) CDR1, CDR2 и CDR3, которые содержатся в вариательной области антитела, указанной в подпункте (1) в п.1, и идентичные аминокислотным последовательностям CDR1-, CDR2- и CDR3-участков, которые содержатся в SEQ ID NO: 215; и CDR1, CDR2 и CDR3, которые содержатся в вариательной области антитела, указанной в подпункте (2) в п.1, и идентичные аминокислотным последовательностям CDR1-, CDR2- и CDR3-участков, которые содержатся в SEQ ID NO: 132; и

(в19) CDR1, CDR2 и CDR3, которые содержатся в вариательной области антитела, указанной в подпункте (1) в п.1, и идентичные аминокислотным последовательностям CDR1-, CDR2- и CDR3-участков, которые содержатся в SEQ ID NO: 215; и CDR1, CDR2 и CDR3, которые содержатся в вариательной области антитела, указанной в подпункте (2) в п.1, и идентичные аминокислотным последовательностям CDR1-, CDR2- и CDR3-участков, которые содержатся в SEQ ID NO: 424.

8. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.5-7, в которой CDR1, CDR2 и CDR3 представляют собой CDR1-, CDR2- и CDR3-участки, определенные на основе нумерации по Кэботу.

9. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-4, в которой вариательная область антитела, указанная в подпункте (1) в п.1, представляет собой вариательную область антитела, которая содержит любую одну из вариательных областей Н-цепи, выбранную из указанных ниже в подпунктах (а1)-(а5), или функционально эквивалентную вариательную область антитела:

(а1) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40;

(а2) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197;

(а3) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206;

(а4) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211; и

(а5) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215.

10. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-4, в которой вариательная область антитела, указанная в подпункте (2) в п.1, представляет собой вариательную область антитела, которая содержит любую одну из вариательных областей Н-цепи, выбранную из указанных ниже в подпунктах (б1)-(б15), или функционально эквивалентную вариательную область антитела:

(б1) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52;

(б2) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103;

(б3) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122;

(б4) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128;

(б5) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129;

(б6) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132;

(б7) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142;

(б8) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144;

(б9) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164;

(б10) вариательная область Н-цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168;

цепи антитела, идентичная аминокислотной последовательности варибельной области, которая содержится в SEQ ID NO: 307;

(e21) варибельная область Н-цепи, которая содержится в варибельной области антитела, указанной в подпункте (1) в п.1, и идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 215; варибельная область Н-цепи, которая содержится в варибельной области антитела, указанной в подпункте (2) в п.1, и идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 103; и варибельная область общей L-цепи антитела, идентичная аминокислотной последовательности варибельной области, которая содержится в SEQ ID NO: 309;

(e22) варибельная область Н-цепи, которая содержится в варибельной области антитела, указанной в подпункте (1) в п.1, и идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 215; варибельная область Н-цепи, которая содержится в варибельной области антитела, указанной в подпункте (2) в п.1, и идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 122; и варибельная область общей L-цепи антитела, идентичная аминокислотной последовательности варибельной области, которая содержится в SEQ ID NO: 53;

(e23) варибельная область Н-цепи, которая содержится в варибельной области антитела, указанной в подпункте (1) в п.1, и идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 215; варибельная область Н-цепи, которая содержится в варибельной области антитела, указанной в подпункте (2) в п.1, и идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 129; и варибельная область общей L-цепи антитела, идентичная аминокислотной последовательности варибельной области, которая содержится в SEQ ID NO: 53;

(e24) варибельная область Н-цепи, которая содержится в варибельной области антитела, указанной в подпункте (1) в п.1, и идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 215; варибельная область Н-цепи, которая содержится в варибельной области антитела, указанной в подпункте (2) в п.1, и идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 132; и варибельная область общей L-цепи антитела, идентичная аминокислотной последовательности варибельной области, которая содержится в SEQ ID NO: 53;

(e25) варибельная область Н-цепи, которая содержится в варибельной области антитела, указанной в подпункте (1) в п.1, и идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 215; варибельная область Н-цепи, которая содержится в варибельной области антитела, указанной в подпункте (2) в п.1, и идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 424; и варибельная область общей L-цепи антитела, идентичная аминокислотной последовательности варибельной области, которая содержится в SEQ ID NO: 53; и

(e26) мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая связывается с эпитопом, перекрывающимся с каждым из эпитопов глипикана 3, и комплекса Т-клеточного рецептора, который связывается мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, указанной в одном из подпунктов (e1)-(e25), и которая имеет общую L-цепь.

16. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-15, в которой Fc-область, указанная в подпункте (3) в п.1, представляет собой Fc-область с аминокислотной мутацией любой из образующих Fc-область аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 23-26 (IgG1-IgG4).

17. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.16, в которой Fc-область, указанная в подпункте (3) в п.1, представляет собой Fc-область с мутацией по меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в следующих аминокислотных положениях, указанных согласно EU-нумерации: положение 220, положение 226, положение 229, положение 231, положение 232, положение 233, положение 234, положение 235, положение 236, положение 237, положение 238, положение 239, положение 240, положение 264, положение 265, положение 266, положение 267, положение 269, положение 270, положение 295, положение 296, положение 297, положение 298, положение 299, положение 300, положение 325, положение 327, положение 328, положение 329, положение 330, положение 331 и положение 332.

18. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.16, в которой Fc-область, указанная в подпункте (3) в п.1, представляет собой Fc-область, которая содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из указанных ниже аминокислот, согласно EU-нумерации: Arg в аминокислотном положении 234, Ala или Arg в аминокислотном положении 235, Lys в аминокислотном положении 239 и Ala в аминокислотном положении 297.

19. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.16-18, в которой Fc-область, указанная в подпункте (3) в п.1, дополнительно содержит аминокислотную мутацию, усиливающую образование гетеродимерной Fc-области.

20. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.19, в котором гетеродимерная Fc-область представляет собой указанную ниже комбинацию (ж1) или (ж2) аминокислотных последовательностей:

(ж1) комбинация аминокислотной последовательности, идентичной константной области Fc-области, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и аминокислотной последовательности, идентичной константной области Fc-области, которая содержит аминокислотную по-

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206, и константную область, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; Н-цепь антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, содержащую вариабельную область Н-цепи антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168, и константную область, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 или 62; и общую L-цепь антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223;

(з24) биспецифическое антитело, имеющее Н-цепь антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении глипикана 3, содержащую вариабельную область Н-цепи антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211, и константную область, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; Н-цепь антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, содержащую вариабельную область Н-цепи антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164, и константную область, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 или 62; и общую L-цепь антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223; и

(з25) биспецифическое антитело, имеющее Н-цепь антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении глипикана 3, содержащую вариабельную область Н-цепи антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211, и константную область, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; Н-цепь антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, содержащую вариабельную область Н-цепи антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168, и константную область, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 или 62; и общую L-цепь антитела, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223.

23. Нуклеиновая кислота, которая кодирует мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из пп.1-20 или биспецифическое антитело по п.21 или 22.

24. Вектор, в который интродуцирована нуклеиновая кислота по п.23.

25. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.23 или вектор по п.24.

26. Способ получения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из пп.1-20 или биспецифического антитела по п.21 или 22, заключающийся в том, что культивируют клетку по п.25.

27. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или биспецифическое антитело, полученная/полученное способом по п.26.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из пп.1-20 или биспецифическое антитело по п.21 или 22 и фармацевтически приемлемый носитель.

29. Фармацевтическая композиция по п.28, которая индуцирует цитотоксичность.

30. Фармацевтическая композиция по п.29, где цитотоксичность представляет собой зависимость от Т-клеток цитотоксичность.

31. Фармацевтическая композиция по п.28, которая предназначена для введения пациенту, нуждающемуся в этом, мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из пп.1-20 или биспецифического антитела по п.21 или 22.

Настоящее изобретение относится также к набору, предназначенному для применения в способе, предлагаемом в настоящем изобретении, который содержат мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении, или мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, полученную с помощью способа, предлагаемого в настоящем изобретении. Настоящее изобретение относится также к применению мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, или мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, полученной с помощью способа, предлагаемого в настоящем изобретении, для приготовления фармацевтической композиции для активации цитотоксической активности. Настоящее изобретение относится также к мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле, предлагаемой в настоящем изобретении, или мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле, полученной с помощью способа, предлагаемого в настоящем изобретении, для применения в способе, предлагаемом в настоящем изобретении. В контексте настоящего описания мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы включают биспецифические антитела, предлагаемые в настоящем изобретении.

Кроме того, настоящее изобретение относится к мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле, которая содержит следующие домены:

(1) домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении глипикана 3,

(2) домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора;

в которой вариабельные области Н-цепи, входящие в вариабельные области, указанные в подпунктах (1) и (2), имеют общую аминокислотную последовательность. Настоящее изобретение относится также к домену, указанному в подпункте (1), который более конкретно представляет собой домен, содержащий вариабельные области тяжелой цепи и/или легкой цепи антитела, которые обладают связывающей активностью.

вающей активностью в отношении глипикана 3, и которые входят в состав мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Настоящее изобретение относится также к домену, указанному в подпункте (2), который более конкретно представляет собой домен, содержащий вариабельную область антителя, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и который входит в состав мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Компоненты доменов, указанных в подпунктах (1) и (2), могут включать указанные выше в пп.1-22. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула может представлять собой биспецифическое антитело. Кроме того, мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула может содержать домен, включающий Fc-область и Fc-область может обладать пониженной активностью в отношении связывания Fc γ -рецептора. Компоненты домена, содержащего Fc-область, могут включать указанные выше в пп.1-22. Настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу или домены, вектору, в который интродуцирована нуклеиновая кислота, клетке, которая содержит нуклеиновую кислоту или вектор, способу получения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, заключающемся в том, что культивируют клетки, и мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле или доменам, которые содержат вариабельную область антителя, которая обладает связывающей активностью в отношении глипикана 3 или связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, полученным с помощью способа. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция может индуцировать повреждение клеток, повреждение клеток может быть обусловлено зависимой от Т-клеток клеточной цитотоксичностью, и композицию можно вводить пациенту, который нуждается в применении мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы.

Настоящее изобретение относится также к мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле, которая связывается с эпитопами, перекрывающимися и/или конкурирующими с эпитопами и глипикана 3, и комплекса Т-клеточного рецептора, связывающимися мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, указанной выше в одном из подпунктов (d1)-(d25) в п.14, мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле, которая связывается с эпитопами, перекрывающимися и/или конкурирующими с эпитопами и глипикана 3, и комплекса Т-клеточного рецептора, связывающимися мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, указанной выше в одном из подпунктов (e1)-(e25) в п.15.

Касательно двух Fc-областей, описанных выше в подпунктах (ж1) и (ж2) в п.20, первая Fc-область может быть включена в Н-цепь антителя, которая обладает связывающей активностью в отношении глипикана 3, а вторая Fc-область может быть включена в Н-цепь антителя, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора; или первая Fc-область может быть включена в Н-цепь антителя, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, а вторая Fc-область может быть включена в Н-цепь антителя, которая обладает связывающей активностью в отношении глипикана 3.

Эффекты изобретения.

В настоящем изобретении предложены новые мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, имеющие молекулярные формы, которые можно получать с высокой эффективностью, которые сохраняют сильную противоопухолевую активность, характерную для ViTE, и очень хорошие характеристики безопасности, что приводит к отсутствию индукции независимого от ракового антигена "цитотоксического шторма" и т.п., и обладают длительным временем полужизни в крови. Фармацевтические композиции, которые активируют цитотоксическую активность, содержащие в качестве действующего вещества мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении, направленно воздействуют на раковые ткани, которые содержат экспрессирующие глипикан 3 раковые клетки, вызывая повреждение клеток, и их можно применять для лечения или предупреждения различных видов рака. Изобретение обеспечивает требуемое лечение, которое не только обладает высоким уровнем безопасности, но и снижает физическую нагрузку на пациентов и является очень удобным для пациентов.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг 1 - схематическая диаграмма а: ERY22 и б: ERY27;

на фиг. 2 - график, иллюстрирующий цитотоксическую активность GPC3_ERY22_rCE115 и GPC3_ERY27_hCE115 при применении в качестве клетки-мишени NCI-H446. Закрашенными ромбами (◆) и закрашенными треугольниками (▲) обозначена цитотоксическая активность GPC3_ERY22_rCE115 и GPC3_ERY27_hCE115 соответственно;

на фиг. 3 - график, иллюстрирующий цитотоксическую активность GPC3_ERY22_rCE115 и GPC3_ERY27_hCE115 при применении в качестве клетки-мишени PC-10. Закрашенными ромбами (◆) и закрашенными треугольниками (▲) обозначена цитотоксическая активность GPC3_ERY22_rCE115 и GPC3_ERY27_hCE115 соответственно;

на фиг. 4 - график, иллюстрирующий цитотоксическую активность оптимизированных антител при

применении в качестве клетки-мишени NCI-H446;

на фиг. 5 - график, иллюстрирующий цитотоксическую активность оптимизированных антител при применении в качестве клетки-мишени NCI-H446;

на фиг. 6 - график, иллюстрирующий цитотоксическую активность оптимизированных антител при применении в качестве клетки-мишени NCI-H446;

на фиг. 7 - график, иллюстрирующий цитотоксическую активность оптимизированных антител при применении в качестве клетки-мишени NCI-H446;

на фиг. 8 - график, иллюстрирующий цитотоксическую активность оптимизированных антител при применении в качестве клетки-мишени NCI-H446;

на фиг. 9 - график, иллюстрирующий цитотоксическую активность оптимизированных антител при применении в качестве клетки-мишени NCI-H446;

на фиг. 10 - данные о противоопухолевой активности *in vivo* оптимизированных антител при применении в качестве клетки-мишени PC-10;

на фиг. 11 - данные о противоопухолевой активности *in vivo* оптимизированных антител при применении в качестве клетки-мишени NCI-H446;

на фиг. 12 - зависимость между аминокислотными остатками, образующими Fc-области IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и системой нумерации EU по Кэботу (обозначена в контексте настоящего описания как EU-индекс);

на фиг. 13-1 - последовательности варьируемых областей тяжелой цепи и их нумерация согласно Кэботу с соавт.;

на фиг. 13-2 - последовательности варьируемых областей тяжелой цепи и их нумерация согласно Кэботу с соавт.;

на фиг. 14 - последовательности варьируемых областей легкой цепи и их нумерация согласно Кэботу с соавт.

Варианты осуществления изобретения

Представленные ниже определения даны с целью облегчения понимания настоящего изобретения.

Антитело.

В контексте настоящего описания "антитело" относится к встречающемуся в естественных условиях иммуноглобулину или иммуноглобулину, полученному полностью или частично путем синтеза. Антитела можно выделять из встречающихся в естественных условиях источников, таких как встречающиеся в естественных условиях плазма и сыворотка, или из супернатантов культур продуцирующих антитела гибридом. Альтернативно этому, антитела можно частично или полностью синтезировать с использованием таких методик, как генетическая рекомбинация. Предпочтительными антителами являются, например, антитела, принадлежащие к какому-либо изотипу иммуноглобулинов или его подклассу. Известные человеческие иммуноглобулины включают антитела следующих девяти классов (изотипов): IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM. Из этих изотипов к антителам, предлагаемым в изобретении, относятся IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Методы получения антитела с требуемой связывающей активностью известны специалистам в данной области. Ниже представлен пример, в котором описан метод получения антитела (антитело к GPC3), связывающегося с глипиканом-3 (ниже в настоящем описании обозначен как GPC3), который принадлежит к семейству GPI-заякоренных рецепторов (Int J Cancer. 103(4), 2003, с. 455-465). Согласно описанному ниже примеру можно получать также антитела, которые связываются с комплексом T-клеточного рецептора.

Антитела к GPC3 можно получать в виде поликлональных или моноклональных антител с помощью известных методов. Антитела к GPC3 предпочтительно получали в виде моноклональных антител, происходящих из организма млекопитающих. Указанные происходящие из организма млекопитающих антитела включают антитела, полученные с помощью гибридом или клеток-хозяев, трансформированных экспрессионным вектором, который несет ген антитела, с помощью методов генетической инженерии.

Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, можно получать с использованием известных методов, например, описанных ниже. В частности, млекопитающих иммунизируют с помощью общепринятых методов иммунизации, используя белок GPC3 в качестве сенсibilизирующего антигена. Образовавшиеся иммунные клетки сливают с известными родительскими клетками с помощью общепринятых методов слияния. Затем гибридомы, продуцирующие антитело к GPC3, можно отбирать путем скрининга в отношении продуцирующих моноклональные антитела клеток с помощью общепринятых методов скрининга.

В частности, моноклональные антитела получают согласно описанному ниже методу. Сначала ген GPC3, нуклеотидная последовательность которого представлена в RefSeq под регистрационным номером NM_001164617.1 (SEQ ID NO: 1), можно экспрессировать с получением белка GPC3, последовательность которого представлена в RefSeq под регистрационным номером NP001158089.1 (SEQ ID NO: 2), который можно применять в качестве сенсibilизирующего антигена для получения антитела. Для этого генную последовательность, кодирующую GPC3, встраивают в известный экспрессионный вектор и соответст-

вующие клетки-хозяева трансформируют этим вектором. Требуемый человеческий белок GPC3 очищают из клеток-хозяев или супернатантов культур с помощью известных методов. Например, для получения растворимого GPC3 из супернатантов культур удаляют путем делеции аминокислоты в положениях 564-580, которые формируют гидрофобную область, соответствующую GPI-заякоривающей последовательности, применяемой для заякоривания GPC3 на клеточной мембране, из полипептидной последовательности GPC3 SEQ ID NO: 2, а затем образовавшийся белок экспрессируют вместо белка GPC3, имеющего SEQ ID NO: 2. В альтернативном варианте в качестве сенсibilизирующего антигена можно применять очищенный встречающийся в естественных условиях белок GPC3.

Очищенный белок GPC3 можно применять в качестве сенсibilизирующего антигена для иммунизации млекопитающих. В качестве сенсibilизирующих антигенов можно применять также неполные пептиды GPC3. В этом случае неполные пептиды можно получать химическим синтезом на основе аминокислотной последовательности человеческого GPC3. Кроме того, их можно получать также путем встраивания части гена GPC3 в экспрессионный вектор и осуществлять экспрессию в нем. Кроме того, их можно получать путем расщепления белка GPC3 протеазой, однако конкретный вариант осуществления изобретения не накладывает ограничения на длину и область пептида GPC3, применяемого в качестве неполного пептида. В качестве предпочтительной области можно выбирать любую последовательность из аминокислотной последовательности, которая соответствует аминокислотам в положениях 524-563, или более предпочтительно любую последовательность из аминокислотной последовательности, которая соответствует аминокислотам в положениях 537-563 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. Предпочтительно можно выбирать любую последовательность из аминокислотной последовательности области, не содержащую аминокислотную последовательность, которая соответствует аминокислотам в положениях 550-663 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. Предпочтительно можно выбирать любую последовательность, соответствующую положениям 544-553, и более предпочтительно можно выбирать любую последовательность из аминокислотной последовательности, соответствующей положениям 546-551, в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. Количество аминокислот, образующих пептид, который можно применять в качестве сенсibilизирующего антигена, предпочтительно составляет по меньшей мере пять или более, или предпочтительно, например, шесть или более, или семь или более. Более конкретно, в качестве сенсibilизирующего антигена можно применять пептид, состоящий из 8-50 остатков, более предпочтительно из 10-30 остатков.

В альтернативном варианте в качестве сенсibilизирующего антигена можно применять слитый белок, полученный путем слияния требуемого неполного полипептида или пептида белка GPC3, с другим полипептидом. Например, для получения слитых белков, предназначенных для применения в качестве сенсibilизирующих антигенов, предпочтительно применяют Fc-фрагменты антитела и пептидные метки. Векторы для экспрессии указанных слитых белков можно конструировать путем слияния в рамке считывания генов, кодирующих два или большее количество требуемых полипептидных фрагментов, и встраивания слитого гена в экспрессионный вектор, описанный выше. Методы получения слитых белков описаны в *Molecular Cloning*, 2-е изд. (Sambrook J. и др., *Molecular Cloning*, 2-ое изд. 1989, 9.47-9.58, изд-во Cold Spring Harbor Lab. Press). Методы получения GPC3, предназначенного для применения в качестве сенсibilизирующего антигена, и методы иммунизации с использованием GPC3 конкретно описаны в WO 2003/000883, WO 2004/022754 и WO 2006/006693.

Конкретное ограничение, касающееся млекопитающих, подлежащих иммунизации с помощью сенсibilизирующего антигена, отсутствует. Однако предпочтительно выбирать млекопитающих с учетом их совместимости с родительскими клетками, применяемыми для клеточного слияния. В целом, предпочтительно применяют грызунов, таких как мыши, крысы, а также хомяки, кролики, и обезьян.

Вышеуказанных животных иммунизируют сенсibilизирующим антигеном с помощью известных методов. Общепринятыми методами иммунизации млекопитающих являются, например, внутрибрюшинная или подкожная инъекция сенсibilизирующего антигена. В частности, сенсibilизирующий антиген можно соответствующим образом разводить в ЗФР (забуференный фосфатом физиологический раствор), физиологическом соляном растворе или т.п. При необходимости с антигеном смешивают общепринятый адъювант, такой как полный адъювант Фрейнда, и смесь эмульгируют. Затем сенсibilизирующий антиген вводят млекопитающему несколько раз с 4-21-дневными интервалами. При иммунизации сенсibilизирующим антигеном можно использовать соответствующие носители. В частности, когда в качестве сенсibilизирующего антигена используют низкомолекулярный неполный пептид, то иногда для иммунизации требуется сочетать пептид, представляющий собой сенсibilизирующий антиген, с белком-носителем, таким как альбумин или гемоцианин лимфы улитки.

Альтернативно этому, можно получать продуцирующие требуемое антитело гибридомы с помощью описанной ниже ДНК-иммунизации. ДНК-иммунизация представляет собой метод иммунизации, который обеспечивает иммуностимуляцию посредством экспрессии сенсibilизирующего антигена в организме иммунизированного животного в результате введения ДНК-вектора, сконструированного таким образом, чтобы он обеспечивал экспрессию гена, кодирующего антигенный белок, в организме животного. По сравнению с общепринятыми методами иммунизации, при которых животным, подлежащим иммунизации, вводят белковый антиген, ДНК-иммунизация, по-видимому, имеет следующие преимущест-

ва:

можно осуществлять иммуностимуляцию, сохраняя при этом структуру мембранного белка, такого как GPC3; и

отсутствует необходимость в очистке антигена для иммунизации.

Для получения моноклонального антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, с использованием ДНК-иммунизации сначала вводят животному, подлежащему иммунизации, ДНК, экспрессирующую белок GPC3. ДНК, кодирующую GPC3, можно синтезировать с помощью известных методов, таких как ПЦР. Полученную ДНК встраивают в соответствующий экспрессионный вектор и затем его вводят животному, подлежащему иммунизации. Предпочтительно применяемые для этой цели экспрессионные векторы включают, например, поступающие в продажу экспрессионные векторы, такие как pcDNA3.1. Векторы можно вводить в организм с помощью общепринятых методов. Например, ДНК-иммунизацию осуществляют с использованием генной пушки для интродукции золотых частиц, покрытых экспрессионным вектором, в клетки тела животного, подлежащего иммунизации. Антитела, распознающие GPC3, можно получать также методами, описанными в WO 2003/104453. После описанной выше иммунизации млекопитающего у него подтверждают в сыворотке повышенный титр GPC3-связывающего антитела. После этого получают из организма млекопитающего иммунные клетки и затем используют их для клеточного слияния. В частности, в качестве иммунных клеток предпочтительно применяют спленоциты.

Клетку миеломы млекопитающих применяют в качестве клетки, подлежащей слиянию с вышеуказанным иммуноцитом. Клетки миеломы предпочтительно содержат приемлемый маркер селекции для скрининга. Маркер селекции придает клеткам характеристики, обеспечивающие их выживание (или гибель) в специфических условиях культивирования. В качестве маркера селекции известны дефицит гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (сокращенно обозначенный далее в контексте настоящего описания как дефицит HGPRT) и дефицит тимидинкиназы (сокращенно обозначенный далее в контексте настоящего описания как дефицит ТК). Клетки с дефицитом HGPRT или ТК обладают чувствительностью к гипоксантин-аминоптерин-тимидину (сокращенно обозначена далее в контексте настоящего описания как ГАТ-чувствительность). Клетки с ГАТ-чувствительностью не могут синтезировать ДНК в селекционной ГАТ-среде и в результате погибают. Однако, когда клетки сливают со здоровыми клетками, они могут продолжать синтез ДНК с использованием "реутилизационного" пути здоровых клеток, и в результате они могут расти даже в селекционной ГАТ-среде.

Клетки с HGPRT-дефицитом и ТК-дефицитом можно отбирать в среде, содержащей 6-тиогуанин, 8-азагуанин (сокращенно обозначенный далее в контексте настоящего описания как 8AG) или 5'-бромдезоксигуанидин соответственно. Здоровые клетки уничтожаются, поскольку они включают эти пиримидиновые аналоги в их ДНК. При этом клетки с дефицитом этих ферментов могут выживать в селекционной среде, поскольку они не могут включать указанные пиримидиновые аналоги. Кроме того, к маркеру селекции относится устойчивость к G418, которая обеспечивается геном устойчивости к неомицину, придающим устойчивость к 2-дезоксистерптаминовым антибиотикам (аналоги гентамицина). Известны различные типы клеток миеломы, которые можно применять для клеточного слияния.

Например, в качестве клеток миеломы предпочтительно можно применять следующие клетки:

P3(P3x63Ag8.653) (J. Immunol. 123 (4), 1979, сс. 1548-1550);

P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology 81, 1978, сс.

1-7);

NS-1 (C. Eur. J. Immunol. 6 (7), 1976, сс. 511-519);

MPC-11 (Cell 8 (3), 1976, сс. 405-415);

SP2/0 (Nature 276 (5685), 1978, сс. 269-270);

FO (J. Immunol. Methods 35 (1-2), 1980, сс. 1-21);

S194/5.XX0.BU.1 (J. Exp. Med. 148 (1), 1978, сс. 313-323);

R210 (Nature 277 (5692), 1979, сс. 131-133) и т.д.

Клеточное слияние иммуноцитов и клеток миеломы, как правило, осуществляют с помощью известных методов, например метода, описанного у Kohler и Milstein и др. (Methods Enzymol. 73, 1981, с. 3-46).

Более конкретно, клеточное слияние можно осуществлять, например, в общепринятой культуральной среде в присутствии усиливающего клеточное слияние агента. Усиливающие клеточное слияние агенты включают, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и вирус Сендай (гемагглютинирующий японский вирус мышей) (HVJ). При необходимости для повышения эффективности слияния добавляют также вспомогательную субстанцию, такую как диметилсульфоксид.

Соотношение иммуноцитов и клеток миеломы можно определять по усмотрению исследователя, предпочтительно, например, одна клетка миеломы на каждые 1-10 иммуноцитов. Культуральные среды, применяемые для клеточных слияний, включают, например, среды, пригодные для выращивания клеточных линий миеломы, такие как среда RPMI1640 и среда MEM, а также другая общепринятая культуральная среда, применяемая для данного типа клеточной культуры. Кроме того, в культуральную среду пред-

почтительно можно добавлять добавки в виде сыворотки, такой как фетальная телячья сыворотка (FCS).

Для клеточного слияния указанные выше иммунные клетки и клетки миеломы, взятые в предварительно определенных количествах, хорошо перемешивают в указанной выше культуральной среде. Затем к ней добавляют предварительно нагретый до температуры примерно 37°C раствор ПЭГ (например, средняя молекулярная масса которого составляет примерно от 1000 до 6000) в концентрации, составляющей, как правило, от 30 до 60 мас./об.%. Смесь осторожно перемешивают до получения требуемых слитых клеток (гибридомы). Затем указанную выше культуральную среду постепенно добавляют к клеткам и повторно центрифугируют для удаления супернатанта. Таким путем можно удалять агенты для клеточного слияния, которые являются нежелательными для роста гибридом.

Полученные таким образом гибридомы можно отбирать путем культивирования, используя общепринятую селективную среду, например ГАТ-среду (культуральная среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин). Клетки, отличные от требуемых гибридом (неслитые клетки), можно уничтожать путем последующего культивирования в вышеуказанной ГАТ-среде в течение достаточного периода времени. Как правило, период составляет от нескольких дней до нескольких недель. Затем осуществляют скрининг гибридом, продуцирующих требуемое антитело, и по отдельности клонируют с помощью общепринятых методов серийных разведений.

Полученные таким образом гибридомы можно отбирать, используя селекционную среду на основе маркера селекции, который несут клетки миеломы, применяемые для клеточного слияния. Например, клетки с HGPRT-или ТК-дефицитом можно отбирать путем культивирования с использованием ГАТ-среды (культуральная среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин). А в частности, когда для клеточного слияния используют чувствительные к ГАТ клетки миеломы, то клетки, для которых характерно успешное слияние со здоровыми клетками, могут избирательно размножаться в ГАТ-среде. Клетки, отличные от требуемых гибридом (неслитые клетки), можно уничтожать путем культивирования в вышеуказанной ГАТ-среде в течение достаточного периода времени. В частности, требуемые гибридомы можно отбирать путем культивирования, как правило, в течение периода времени, составляющего от нескольких дней до нескольких недель. Затем осуществляют скрининг гибридом, продуцирующих требуемое антитело, и по отдельности клонируют с помощью общепринятых методов серийных разведений.

Требуемое антитело предпочтительно можно отбирать и по отдельности клонировать с помощью методов скрининга, основанных на известной реакции антиген/антитело. Например, GPC3-связывающее моноклональное антитело может связываться с GPC3, экспрессируемым на клеточной поверхности. Можно осуществлять скрининг указанных моноклональных антител с помощью метода разделения клеток на основе возбуждения флуоресценции (FACS). FACS представляет собой систему, которая позволяет оценивать связывание антитела с клеточной поверхностью посредством анализа клеток, контактирующих с флуоресцентным антителом, с использованием лазерного пучка, и путем оценки флуоресценции, испускаемой индивидуальными клетками.

Для скрининга с использованием FACS в отношении гибридом, которые продуцируют моноклональное антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, прежде всего получают экспрессирующие GPC3 клетки. Клетки, которые предпочтительно используют для скрининга, представляют собой клетки млекопитающих, в которых происходит принудительная экспрессия GPC3. В качестве контроля можно избирательно определять с использованием нетрансформированных клеток млекопитающих в качестве клеток-хозяев способность антитела связываться с расположенным на клеточной поверхности GPC3. В частности, гибридомы, продуцирующие моноклональное антитело к GPC3, можно выделять путем отбора гибридом, которые продуцируют антитело, связывающееся с клетками, принудительно экспрессирующими GPC3, но не с клетками-хозяевами.

Альтернативно этому, способность антитела связываться с иммобилизованными экспрессирующими GPC3 клетками можно оценивать на основе принципа ELISA. Например, экспрессирующие GPC3 клетки иммобилизуют на лунках планшета для ELISA. Супернатанты культур гибридом приводят в контакт с иммобилизованными клетками в лунках и выявляют антитела, которые связываются с иммобилизованными клетками. Когда моноклональные антитела имеют мышинное происхождение, то антитела, связанные с клетками, можно выявлять с помощью антитела к мышинному иммуноглобулину. Гибридомы, продуцирующие требуемое антитело, которое обладает антигенсвязывающей активностью, отбирают путем описанного выше скрининга, и их можно клонировать методом серийных разведений или аналогичным методом.

Полученные таким путем гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, можно пересеивать в общепринятую культуральную среду и хранить в жидком азоте в течение длительного периода времени.

Указанные выше гибридомы культивируют с помощью общепринятого метода и требуемые моноклональные антитела можно получать из супернатантов культур. Альтернативно этому, гибридомы интродуцируют и выращивают в пригодных для этой цели млекопитающих, и моноклональные антитела получают из асцитов. Первый метод пригоден для получения антител с высокой степенью чистоты.

Предпочтительно можно применять также антитела, кодируемые генами антител, которые клонированы из продуцирующих антитела клеток, таких как указанные выше гибридомы. Клонированный ген

антитела встраивают в соответствующий вектор и его интродуцируют в хозяина для экспрессии кодируемого геном антитела. Методы выделения генов антител, встраивания генов в векторы и трансформации клеток-хозяев разработаны ранее (см., например, Vandamme и др., *Eur. J. Biochem.* 192(3), 1990, с. 767-775). Методы получения рекомбинантных антител также известны и описаны ниже.

Например, кДНК, кодирующую вариабельную область (V-область) антитела к GPC3, получают из клеток гибридомы, экспрессирующей антитело к GPC3. Для этой цели сначала из гибридом экстрагируют общую РНК. Методы, которые применяют для экстракции мРНК из клеток, включают, например: метод ультрацентрифугирования в присутствии гуанидина (*Biochemistry* 18(24), 1979, с. 5294-5299) и АГРС-метод (*Anal. Biochem.* 162(1), 1987, с. 156-159). Экстрагированные мРНК можно очищать с помощью набора для очистки мРНК (фирма GE Healthcare Bioscience) или аналогичного набора. В качестве альтернативы можно применять также поступающие в продажу наборы для экстракции мРНК непосредственно из клеток, такие как набор для очистки мРНК QuickPrep (фирма GE Healthcare Bioscience). мРНК можно получать из гибридом с использованием таких наборов. Кодирующие V-область антитела кДНК можно синтезировать из полученных мРНК с помощью обратной транскриптазы. кДНК можно синтезировать с помощью набора для синтеза первой цепи кДНК, содержащего обратную транскриптазу AMV (Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit) (фирма Seikagaku Co.) или аналогичного набора. Кроме того, для синтеза и амплификации кДНК можно применять набор для амплификации кДНК SMART RACE (фирма Clontech) и основанный на ПЦР 5'δACE-(быстрая амплификация концов кДНК)-метод (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(23), 1988, с. 8998-9002; *Nucleic Acids Res.* 17(8), 1989, с. 2919-2932). При таком процессе синтеза кДНК соответствующие описанные ниже сайты, распознаваемые рестриктазами, можно интродуцировать на оба конца кДНК.

Представляющий интерес фрагмент кДНК очищают из полученного ПЦР-продукта и затем его встраивают путем лигирования в ДНК-вектор. Таким путем создают рекомбинантный вектор и интродуцируют в *E. coli* или подобного хозяина. После селекции колоний требуемый рекомбинантный вектор можно получать из колониеобразующих *E. coli*. Затем с использованием известного метода, такого как дидезокси-метод (метод терминации нуклеотидной цепи), определяют, имеет ли рекомбинантный вектор представляющую интерес нуклеотидную последовательность кДНК.

5'-RACE-метод, в котором используют праймеры для амплификации гена вариабельной области, как правило, применяют для выделения гена, кодирующего вариабельную область. Сначала конструируют библиотеку кДНК, применяемую для 5'-RACE (5'-RACE-библиотека кДНК) с использованием РНК, экстрагированных из клеток гибридомы, в качестве матрицы. Для синтеза 5'-RACE-библиотеки кДНК можно использовать поступающий в продажу набор, такой как набор для амплификации кДНК SMART RACE.

Ген антитела амплифицируют с помощью ПЦР, используя полученную 5'-RACE-библиотеку кДНК в качестве матрицы. Праймеры для амплификации гена мышинного антитела можно создавать на основе известных генных последовательностей антител. Нуклеотидные последовательности праймеров варьируются в зависимости от подкласса иммуноглобулина. Таким образом, предпочтительно предварительно определять подкласс с помощью доступного набора, такого как набор для изотипирования мышинных моноклональных антител Iso Strip (Iso Strip mouse monoclonal antibody isotyping kit) (фирма Roche Diagnostics).

В частности, например, для выделения генов, кодирующих мышинный IgG, применяют праймеры, которые обеспечивают амплификацию генов, кодирующих тяжелые цепи $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ и $\gamma 3$ и легкие цепи κ и λ . В целом, праймер, сайт гибридизации ("отжига") которого с константной областью расположен вблизи вариабельной области, применяют в качестве 3'-концевого праймера для амплификации гена вариабельной области IgG. При этом праймер, присоединенный к набору конструкций 5'-RACE-библиотеки кДНК, применяют в качестве 5'-концевого праймера.

Амплифицированные таким образом ПЦР-продукты применяют для реконструирования иммуноглобулинов, состоящих из комбинации тяжелых и легких цепей. Требуемое антитело можно отбирать, используя в качестве показателя GPC3-связывающую активность реконструированного иммуноглобулина. Например, когда задачей является выделение антитела к GPC3, то более предпочтительно, чтобы связывание антитела с GPC3 являлось специфическим. Можно осуществлять скрининг GPC3-связывающих антител, например, с использованием следующих стадий, на которых:

- (1) приводят в контакт экспрессирующую GPC3 клетку с антителом, содержащим V-область, которая кодируется кДНК, выделенной из гибридомы;
- (2) определяют связывание антитела с экспрессирующей GPC3 клеткой и
- (3) отбирают антитело, которое связывается с экспрессирующей GPC3 клеткой.

Методы определения связывания антитела с экспрессирующими GPC3 клетками, являются известными. В частности, связывание антитела с экспрессирующими GPC3 клетками можно определять с помощью описанных выше методик, таких как FACS. Имобилизованные образцы экспрессирующих GPC3 клеток можно применять для оценки связывающей активности антитела.

Предпочтительные методы скрининга антител, в которых используют связывающую активность в

качестве показателя, включают также методы пэннинга, основанные на использовании фаговых векторов. Методы скрининга с использованием фаговых векторов имеют преимущество, когда гены антитела выделяют из библиотек подкласса тяжелой цепи и легкой цепи из популяции клеток, экспрессирующих поликлональные антитела. Гены, кодирующие переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно сшивать с помощью приемлемой линкерной последовательности с образованием одноцепочечного Fv (scFv). Фаги, презентующие на своей поверхности scFv, можно получать путем встраивания гена, кодирующего scFv, в фаговый вектор. Фаги приводят в контакт с представляющим интерес антигеном. Затем ДНК, кодирующую scFv, который обладает представляющей интерес связывающей активностью, можно выделять путем сбора фагов, связанных с антигеном. Указанный процесс можно повторять при необходимости для обогащения scFv, которые обладают представляющей интерес связывающей активностью.

После выделения кДНК, кодирующей V-область представляющего интерес антитела к GPC3, кДНК расщепляют рестриктазами, которые распознают сайты рестрикции, интродуцированные в оба конца кДНК. Предпочтительные рестриктазы распознают и расщепляют нуклеотидную последовательность, которая встречается с низкой частотой в нуклеотидной последовательности гена антитела. Кроме того, для встраивания однокопийного расщепленного фрагмента в правильной ориентации предпочтительно интродуцируют в представляющий интерес вектор сайт рестрикции для фермента, который образует "липкий" конец. Кодирующую V-область антитела к GPC3 кДНК расщепляют согласно описанному выше методу и встраивают в приемлемый экспрессионный вектор для создания экспрессионного вектора антитела. В том случае, когда ген, кодирующий константную область (С-область) антитела, и ген, кодирующий указанную выше V-область, сливают в рамке считывания, то получают химерное антитело. В контексте настоящего описания "химерное антитело" означает, что константная область и переменная область отличаются по своему происхождению. Так, помимо мышинных/человеческих гетерохимерных антител к химерным антителам, предлагаемым в настоящем изобретении, относятся также человеческие/человеческие аллохимерные антитела. Экспрессионный вектор химерного антитела можно создавать путем встраивания указанного выше гена V-области в экспрессионный вектор, который уже содержит константную область. В частности, например, последовательность, распознаваемую рестриктазой, которая вырезает указанный выше ген V-области, предпочтительно следует помещать в 5'-область экспрессионного вектора, несущего ДНК, которая кодирует константную область (С-область) требуемого антитела. Экспрессионный вектор химерного антитела создают путем слияния в рамке считывания двух генов, расщепленных одной и той же комбинацией рестриктаз.

Для получения моноклонального антитела к GPC3 гены антитела встраивают в экспрессионный вектор таким образом, чтобы экспрессия генов происходила под контролем регулирующей экспрессию области. Регулирующая экспрессию область, предназначенная для экспрессии антител, включает, например, энхансеры и промоторы. Кроме того, соответствующую сигнальную последовательность можно присоединять к аминоконцу таким образом, чтобы антитело секретировалось из клеток наружу. В описанных ниже примерах в качестве сигнальной последовательности применяют пептид, который имеет аминокислотную последовательность MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 3). Наряду с ней можно присоединять другие приемлемые сигнальные последовательности. Экспрессированный полипептид расщепляется на карбоксильном конце указанной выше последовательности и образовавшийся полипептид секретируется из клеток наружу в виде зрелого полипептида. Затем приемлемые клетки-хозяева трансформируют экспрессионным вектором и получают рекомбинантные клетки, экспрессирующие ДНК, которая кодирует антитело к GPC3.

ДНК, которые кодируют тяжелую цепь антитела (H-цепь) и легкую цепь антитела (L-цепь), встраивают по отдельности в различные экспрессионные векторы для экспрессии гена антитела. Молекулу антитела, имеющую H- и L-цепи, можно экспрессировать, осуществляя для этой цели контрансфекцию одной и той же клетки-хозяина векторами, в которые встроены соответственно гены H-цепи и L-цепи. В качестве альтернативы, клетки-хозяева можно трансформировать одним экспрессионным вектором, в который встроены ДНК, кодирующие H- и L-цепи (см. WO 94/11523).

Известны различные комбинации клеток-хозяев/экспрессионных векторов для получения антитела путем интродукции выделенных генов антител в соответствующих хозяев. Все эти системы экспрессии можно применять для выделения антигенсвязывающих доменов, включая переменные области антитела, предлагаемого в настоящем изобретении. Приемлемыми эукариотическими клетками, которые применяют в качестве клеток-хозяев, являются клетки животных, клетки растений и клетки грибов. В частности, клетки животных представляют собой, например, следующие клетки:

- (1) клетки млекопитающих: CHO, COS, миеломы, почки детеныша хомяка (BHK), HeLa, Vero или т.п.;
- (2) клетки амфибий: ооциты шпорцевой лягушки (*Xenopus*) или т.п. и
- (3) клетки насекомых: sf9, sf21, Tn5 или т.п.

Кроме того, в качестве растительной клетки известна система экспрессии генов антитела, в которой используют клетки, полученные из представителей рода *Nicotiana*, например *Nicotiana tabacum*. Для трансформации растительных клеток можно применять культивируемые клетки каллуса.

Кроме того, следующие клетки можно применять в качестве грибных клеток: дрожжи рода *Saccharomyces*, например *Saccharomyces cerevisiae*, и рода *Pichia*, например *Pichia pastoris*, и нитчатые грибы: рода *Aspergillus*, например *Aspergillus niger*. Кроме того, известны системы экспрессии генов антитела, в которых используют прокариотические клетки. Например, согласно настоящему изобретению можно применять бактериальные клетки, т.е. клетки *E. coli*, клетки *Vacillus subtilis* и т.п. Экспрессионные векторы, которые несут представляющие интерес гены антитела, интродуцируют в эти клетки путем трансфекции. Трансфектированные клетки культивируют *in vitro*, и требуемое антитело можно получать из культуры трансформированных клеток.

Помимо указанных выше клеток-хозяев для получения рекомбинантного антитела можно применять также трансгенных животных. Это означает, что антитело можно получать из животного, в организм которого интродуцирован ген, кодирующий представляющее интерес антитело. Например, ген антитела можно создавать в виде слитого гена посредством встраивания в рамке считывания в ген, который кодирует белок, специфически образующийся в молоке. В качестве белка, секретируемого в молоко, можно применять, например, козий β -казеин. ДНК-фрагменты, содержащие слитый ген, в который входит ген антитела, инъецируют в эмбрион козы и затем этот эмбрион интродуцируют в самку козы. Требуемое антитело можно получать в виде белка, слитого с молочным белком из молока трансгенной козы, родившейся от козы, являющейся реципиентом эмбриона (или ее потомства). Кроме того, для увеличения объема молока, содержащего требуемое антитело, которое продуцируется трансгенной козой, трансгенной козе можно при необходимости вводить гормоны (Ebert К.М. и др., *Bio/Technology* 12 (7), 1994, с. 699-702).

Когда антигенсвязывающую молекулу, представленную в настоящем описании, вводят человеку, то в качестве домена антигенсвязывающей молекулы можно применять домен, происходящий из антитела, полученного путем генетической рекомбинации, которое искусственно модифицировано для снижения гетерологической антигенности в отношении человека и других животных. Указанные антитела, полученные путем генетической рекомбинации, включают, например, гуманизированные антитела. Эти модифицированные антитела можно получать с помощью известных методов.

Варибельная область антитела, применяемая для получения домена антигенсвязывающей молекулы, который включает переменную область антитела, представленного в настоящем описании, как правило, состоит из трех гипервариабельных участков (CDR), разделенных четырьмя каркасными участками (FR). CDR представляет собой область, которая в значительной степени определяет специфичность связывания антитела. Для аминокислотных последовательностей CDR характерна высокая степень вариабельности. С другой стороны, образующие FR аминокислотные последовательности часто обладают высокой идентичностью даже среди антител с различными специфичностями связывания. Таким образом, как правило, путем трансплантации CDR специфичность связывания конкретного антитела можно интродуцировать в другое антитело.

Гуманизированное антитело называют также реконструированным человеческим антителом. В частности, известны гуманизированные антитела, полученные путем трансплантации CDR антитела животного кроме человека, такого как мышинное антитело, в человеческое антитело и т.п. Известны также общепринятые методики генной инженерии, предназначенные для получения гуманизированных антител. В частности, например, ПЦП с перекрывающимися праймерами представляет собой известный метод трансплантации CDR мышинного антитела в человеческий FR. При осуществлении ПЦП с перекрывающимися праймерами нуклеотидную последовательность, которая кодирует CDR мышинного антитела, подлежащий трансплантации, добавляют к праймерам, предназначенным для синтеза FR человеческого антитела. Получают праймеры для каждого из четырех FR. Принято считать, что когда осуществляют трансплантацию мышинного CDR в человеческий FR, то для поддержания функции CDR целесообразно выбирать человеческий FR, обладающий высоким уровнем идентичности с мышинным FR. Таким образом, как правило, является предпочтительным применять человеческий FR, который содержит аминокислотную последовательность, обладающую высоким уровнем идентичности с аминокислотной последовательностью FR, который примыкает к подлежащему трансплантации мышинному CDR.

Нуклеотидные последовательности, подлежащие лигированию, создают таким образом, чтобы они были соединены друг с другом в рамке считывания. Человеческие FR синтезируют индивидуально с использованием соответствующих праймеров. В результате получают продукты, в которых ДНК, кодирующая мышинный CDR, присоединена к ДНК, кодирующим индивидуальные FR. Нуклеотидные последовательности, кодирующие мышинный CDR каждого продукта, создают таким образом, чтобы они перекрывались друг с другом. Затем осуществляют реакцию синтеза комплементарной цепи для "отжига" перекрывающихся CDR-участков продуктов, синтезированных с использованием гена человеческого антитела в качестве матрицы. С помощью этой реакции человеческие FR встраивают путем лигирования через мышинные CDR-последовательности.

Полноразмерный ген V-области, в которую, в конце концов, лигированы три CDR и четыре FR, амплифицируют с использованием праймеров, гибридизующихся с 5'- или 3'-концом, которые добавляют с последовательностями, распознаваемыми приемлемыми рестриктазами. Экспрессионный вектор для гуманизированного антитела можно получать путем встраивания полученной согласно описанному выше

методу ДНК и ДНК, которая кодирует С-область человеческого антитела, в экспрессионный вектор таким образом, чтобы лигировать их в рамке считывания. После трансфекции хозяина рекомбинантным вектором для создания рекомбинантных клеток рекомбинантные клетки культивируют и ДНК, кодирующую гуманизированное антитело, экспрессируют с получением гуманизированного антитела в культуре клеток (см. публикацию европейского патента EP 239400 и публикацию международной заявки на патент WO 1996/002576). Путем качественной или количественной оценки и измерения антигенсвязывающей активности гуманизированного антитела, полученного согласно описанному выше методу, можно отбирать FR человеческого антитела, которые позволяют CDR образовывать предпочтительный антигенсвязывающий центр при лигировании с использованием CDR. Аминокислотные остатки в FR при необходимости можно заменять так, чтобы CDR реконструированного человеческого антитела образовывали приемлемый антигенсвязывающий центр. Например, мутации аминокислотной последовательности можно интродуцировать в FR, используя ПЦР-метод, применяемый для трансплантации мышинового CDR в человеческий FR. Более конкретно, мутации неполной нуклеотидной последовательности можно интродуцировать в праймеры, гибридизующиеся с FR. Мутации нуклеотидной последовательности интродуцируют в FR, синтезированные с использованием указанных праймеров. Мутантные последовательности FR, имеющие требуемые характеристики, можно отбирать путем измерения и оценки активности мутантного антитела с аминокислотной заменой в отношении связывания с антигеном с помощью упомянутого выше метода (Sato K. и др., *Cancer Res.* 53, 1993, с. 851-856).

В качестве альтернативы, требуемые человеческие антитела можно получать путем иммунизации трансгенных животных, имеющих полный спектр генов человеческого антитела (см. WO 1993/012227; WO 1992/003918; WO 1994/002602; WO 1994/025585; WO 1996/034096; WO 1996/033735), с использованием ДНК-иммунизации.

Кроме того, известны методики получения человеческих антител путем пэннинга с использованием библиотек человеческих антител. Например, V-область человеческого антитела экспрессируют в виде одноцепочечного антитела (scFv) на поверхности фага с использованием метода фагового дисплея. Можно отбирать фаги, экспрессирующие scFv, который связывается с антигеном. Последовательность ДНК, кодирующую V-область человеческого антитела, которая связывается с антигеном, можно определять путем анализа генов отобранных фагов. Определяют последовательность ДНК scFv, который связывается с антигеном. Экспрессионный вектор получают путем слияния последовательности V-области в рамке считывания с последовательностью С-области требуемого человеческого антитела и последующего встраивания в приемлемый экспрессионный вектор. Экспрессионный вектор интродуцируют в клетки, пригодные для указанной выше экспрессии. Человеческое антитело можно получать путем экспрессии гена, кодирующего человеческое антитело, в клетках. Такие методы уже описаны (см. WO 1992/001047; WO 1992/020791; WO 1993/006213; WO 1993/011236; WO 1993/019172; WO 1995/001438; WO 1995/015388).

Домен, содержащий переменную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении глипикана 3 (GPC3).

В контексте настоящего описания фраза "домен, содержащий переменную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении глипикана 3 (GPC3)" относится к области антитела, которая содержит область, которая специфически связывается с описанным выше белком GPC3 или со всем или с участком неполного пептида белка GPC3, и является также комплементарной ему. Домены, содержащие переменную область антитела, можно получать из переменных доменов одного или множества антител. Предпочтительно домены, содержащие переменную область антитела, содержат переменные области легкой цепи и тяжелой цепи (VL и VH) антитела. Приемлемыми примерами таких доменов, содержащих переменные области антитела, являются "одноцепочечный Fv (scFv)", "одноцепочечное антитело", "Fv", "одноцепочечный Fv₂ (scFv₂)", "Fab", "F(ab)₂" и т.д.

Домен, содержащий переменную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора.

В контексте настоящего описания фраза "домен, содержащий переменную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора" относится к области антитела, которая содержит область, которая специфически связывается со всем или с участком комплекса Т-клеточного рецептора, и является также комплементарной ему. Комплекс Т-клеточного рецептора может представлять собой сам Т-клеточный рецептор или адапторную молекулу, которая входит в комплекс Т-клеточного рецептора наряду с Т-клеточным рецептором. Пригодной в качестве адапторной молекулы является CD3.

Домен, содержащий переменную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении Т-клеточного рецептора.

В контексте настоящего описания фраза "домен, содержащий переменную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении Т-клеточного рецептора" относится к области антитела, связывающейся с Т-клеточным рецептором, полученной путем включения области, которая специфически связывается со всем или с участком Т-клеточного рецептора и является также комплементарной ему.

Участок Т-клеточного рецептора, с которым связывается домен, предлагаемый в настоящем изобретении, может представлять собой переменную область или константную область, но предпочтительным является эпитоп, присутствующий в константной области. Примеры последовательности константной области включают α -цепь Т-клеточного рецептора, которая имеет регистрационный № RefSeq CAA26636.1 (SEQ ID NO: 4), Р-цепь Т-клеточного рецептора, которая имеет регистрационный № RefSeq C25777 (SEQ ID NO: 5), γ 1-цепь Т-клеточного рецептора, которая имеет регистрационный № RefSeq A26659 (SEQ ID NO: 6), γ 2-цепь Т-клеточного рецептора, которая имеет регистрационный № RefSeq AAB63312.1 (SEQ ID NO: 7), и 5-цепь Т-клеточного рецептора, которая имеет регистрационный № RefSeq AAA61033.1 (SEQ ID NO: 8).

Домен, содержащий переменную область антитела, которая обладает CD3-связывающей активностью.

В контексте настоящего описания фраза "домен, содержащий переменную область антитела, которая обладает CD3-связывающей активностью" относится к CD3-связывающему участку антитела, который получают путем включения области, которая специфически связывается со всем или с участком CD3, и который является также комплементарным ему.

Предпочтительно домен содержит переменные области легкой цепи и тяжелой цепи (VL и VH) антитела к CD3. Приемлемыми примерами такого домена являются "одноцепочечный Fv (scFv)", "одноцепочечное антитело", "Fv", "одноцепочечный Fv₂ (scFv₂)", "Fab", "F(ab')₂" и т.д.

Предлагаемый в изобретении домен, содержащий переменную область антитела, которая обладает CD3-связывающей активностью, может представлять собой любой эпитопсвязывающий домен, если эпитоп присутствует в последовательности γ -цепи, δ -цепи или ϵ -цепи, образующей человеческий CD3. Предпочтительно в настоящем изобретении можно использовать домен, содержащий переменную область легкой цепи (VL) антитела к CD3, и переменную область тяжелой цепи (VH) антитела к CD3, которые связываются с эпитопом, присутствующим во внеклеточной области ϵ -цепи комплекса человеческого CD3. Помимо переменной области легкой цепи (VL) антитела к CD3, и переменной области тяжелой цепи (VH) антитела к CD3, которые описаны в разделе "Примеры", известные CD3-связывающие домены, которые содержат переменную область легкой цепи (VL) антитела к CD3, и переменную область тяжелой цепи (VH) антитела к CD3 и полученные из антитела ОКТ3 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1980, с. 4914-4917), можно применять в качестве указанных доменов. Соответственно можно применять содержащий переменную область антитела домен, полученный из антитела к CD3, которое обладает требуемыми свойствами, созданное путем иммунизации требуемого животного с использованием описанного выше метода γ -цепью, δ -цепью или ϵ -цепью, образующей человеческий CD3. Человеческие антитела и соответствующим образом гуманизированные антитела можно применять соответственно в качестве антитела к CD3 для создания домена, содержащего переменную область антитела, который обладает CD3-связывающей активностью. Что касается структуры γ -цепи, δ -цепи или ϵ -цепи, образующей человеческий CD3, то их полинуклеотидные последовательности представлены в SEQ ID NO: 9 (NM_000073.2), 10 (NM_000732.4) и 11 (NM_000733.3), а их полипептидные последовательности представлены в SEQ ID NO: 12 (NP_000064.1), 13 (NP_000723.1) и 14 (NP_000724.1) (в скобках указаны регистрационные номера в базе данных RefSeq).

Домены, содержащие переменные области антитела, в антигенсвязывающих молекулах, предлагаемых в настоящем изобретении, могут связываться с одним и тем же эпитопом. В контексте настоящего описания один и тот же эпитоп может присутствовать в белке, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 14. Альтернативно этому, домены, содержащие переменные области антитела, в антигенсвязывающих молекулах, предлагаемых в настоящем изобретении, могут связываться с различными эпитопами соответственно. В контексте настоящего описания различные эпитопы могут присутствовать в белке, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 14.

Специфичность.

Понятие "специфичность" означает, что одна из молекул, участвующих в специфическом связывании, не обладает какой-либо значимой способностью связываться с молекулами, отличными от одного или нескольких партнеров по связыванию молекул. Кроме того, понятие используют также, когда домен, содержащий переменную область антитела, является специфическим в отношении конкретного эпитопа из нескольких эпитопов, входящих в антиген. Когда эпитоп, с которым связывается домен, содержащий переменную область антитела, входит в несколько различных антигенов, то антигенсвязывающие молекулы, содержащие домен, включающий переменную область, могут связываться с различными антигенами, которые содержат эпитоп.

Эпитоп.

"Эпитоп" означает антигенную детерминанту в антигене и относится к антигенному сайту, с которым связывается представленный в настоящем описании домен антигенсвязывающей молекулы, включающий переменную область антитела. Так, например, эпитоп можно характеризовать на основе его структуры. Альтернативно этому, эпитоп можно характеризовать на основе антигенсвязывающей актив-

ности антигенсвязывающей молекулы, которая распознает эпитоп. Когда антиген представляет собой пептид или полипептид, то эпитоп можно определять по аминокислотным остаткам, образующим эпитоп. Альтернативно этому, когда эпитоп представляет собой сахарную цепь, то эпитоп можно определять по специфической для него структуре сахарной цепи.

Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, который содержит эпитоп, у которого распознается первичная аминокислотная последовательность. Указанный линейный эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере три и наиболее часто по меньшей мере 5, например примерно от 8 до 10 или от 6 до 20, аминокислотных остатков в определенной последовательности.

В отличие от линейного эпитопа "конформационный эпитоп" представляет собой эпитоп, в котором первичная аминокислотная последовательность, образующая эпитоп, не является единственной детерминантой распознаваемого эпитопа (например, не является обязательным, чтобы первичная аминокислотная последовательность конформационного эпитопа распознавалась специфическим в отношении эпитопа антителом). Конформационные эпитопы могут содержать большее количество аминокислотных остатков по сравнению с линейными эпитопами. Распознающее конформационный эпитоп антитело распознает трехмерную структуру пептида или белка. Например, когда белковая молекула уложена и образует трехмерную структуру, аминокислоты и/или полипептидные основные цепи, которые образуют конформационный эпитоп, выравниваются, и эпитоп становится распознаваемым для антитела. Методы определения конформаций эпитопов включают (но не ограничиваясь только ими), например, рентгеновскую кристаллографию, двухмерный ядерный магнитный резонанс, сайтспецифическое спиновое мечение и электронный парамагнитный резонанс (см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, под ред. Morris, т. 66, 1996).

Пример метода оценки связывания эпитопа тестируемой антигенсвязывающей молекулой, содержащей домен, который содержит переменную область антитела, обладающую GPC3-связывающей активностью, описан ниже, и метод, подтверждающий связывание с эпитопом тестируемой антигенсвязывающей молекулой, содержащей домен, который содержит переменную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, можно осуществлять также согласно приведенным ниже примерам.

Например, для подтверждения того, что тестируемая антигенсвязывающая молекула, содержащая домен, который содержит переменную область антитела, обладающую GPC3-связывающей активностью, распознает линейный эпитоп в молекуле GPC3, можно применять описанный ниже метод. Для указанной выше цели синтезируют линейный пептид, содержащий аминокислотную последовательность, образующую внеклеточный домен GPC3. Пептид можно синтезировать химически. Альтернативно этому, его можно получать с помощью методов генной инженерии, используя область в кДНК GPC3, которая кодирует аминокислотную последовательность, соответствующую внеклеточному домену. Затем оценивают связывающую активность между линейным пептидом, который содержит аминокислотную последовательность, образующую внеклеточный домен, и тестируемой антигенсвязывающей молекулой, содержащей домен, который содержит переменную область антитела, обладающую GPC3-связывающей активностью. Например, иммобилизованный линейный пептид можно применять в качестве антигена при осуществлении ELISA для оценки связывающей активности антигенсвязывающей молекулы в отношении пептида. Альтернативно этому, связывающую активность в отношении линейного пептида можно оценивать по уровню ингибирования линейным пептидом связывания антигенсвязывающей молекулы с экспрессирующими GPC3 клетками. Эти анализы могут демонстрировать связывающую активность антигенсвязывающих молекул в отношении линейного пептида.

Кроме того, для подтверждения того, что тестируемая антигенсвязывающая молекула, содержащая домен, который содержит переменную область антитела, обладающую GPC3-связывающей активностью, распознает трехмерную структуру эпитопа, можно применять следующий метод. Для указанной выше цели получают экспрессирующие GPC3 клетки. Считается, что тестируемая антигенсвязывающая молекула, содержащая домен, который содержит переменную область антитела, обладающую GPC3-связывающей активностью, распознает конформационный эпитоп, если она при контакте отличается сильным связыванием с экспрессирующими GPC3 клетками, но в незначительной степени связывается с иммобилизованным линейным пептидом, который содержит аминокислотную последовательность, образующую внеклеточный домен GPC3. В контексте настоящего описания "связывается в незначительной степени" означает, что активность связывания составляет 80% или менее, как правило, 50% или менее, предпочтительно 30% или менее и наиболее предпочтительно 15% или менее по сравнению с активностью связывания с клетками, экспрессирующими человеческий GPC3.

Методы анализа связывающей активности тестируемой антигенсвязывающей молекулы, содержащей домен, который связывается с антигеном GPC3, в отношении экспрессирующих GPC3 клеток, включают, например, методы, описанные в *Antibodies: A Laboratory Manual* (под ред. Harlow, David Lane, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, с. 359-420). В частности, оценку можно осуществлять на основе принципа ELISA или метода разделения клеток на основе возбуждения флуоресценции (FACS) с использованием в качестве антигена экспрессирующих GPC3 клеток.

В формате ELISA связывающую активность тестируемой антигенсвязывающей молекулы, содер-

жащей домен, который связывается с антигеном GPC3, в отношении экспрессирующих GPC3 клеток, можно оценивать количественно путем сравнения уровней сигналов, возникающих в процессе ферментативной реакции. В частности, тестируемую антигенсвязывающую молекулу добавляют в планшет для ELISA, на котором иммобилизованы экспрессирующие GPC3 клетки. Затем тестируемую антигенсвязывающую молекулу, связанную с клетками, выявляют с помощью меченого ферментом антитела, которое распознает тестируемую антигенсвязывающую молекулу. Альтернативно этому, когда применяют FACS, готовят серийные разведения тестируемой антигенсвязывающей молекулы и титр антитела, связывающегося с экспрессирующими GPC3 клетками, можно определять путем сравнения активности связывания с экспрессирующими GPC3 клетками.

Связывание тестируемой антигенсвязывающей молекулы с антигеном, который экспрессируется на поверхности клеток, суспендированных в буфере или в сходной среде, можно выявлять с помощью проточного цитометра. Известными проточными цитометрами являются, например, следующие устройства:

FACS Canto™ II,
 FACSAria™,
 FACS Array™,
 FACSVantage™ SE,
 FACSCalibur (все товарные знаки фирмы BD Biosciences),
 EPICS ALTRA HyPerSort,
 Cytomics FC 500,
 EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC,
 Cell Lab Quanta/Cell Lab Quanta SC (все товарные знаки фирмы Beckman Coulter).

Предпочтительные методы анализа связывающей активности тестируемой антигенсвязывающей молекулы, содержащей связывающей антиген GPC3 домен, в отношении антигена включают, например, следующий метод. Сначала экспрессирующие GPC3 клетки подвергают взаимодействию с тестируемой антигенсвязывающей молекулой, а затем ее окрашивают меченым с помощью ФИТЦ вторичным антителом, которое распознает полипептидный комплекс. Тестируемую антигенсвязывающую молекулу соответствующим образом разводят приемлемым буфером с получением комплекса в требуемой концентрации. Например, комплекс можно применять в концентрации, составляющей от 10 мкг/мл до 10 нг/мл. Затем определяют интенсивность флуоресценции и количество клеток с помощью FACSCalibur (фирма BD). Интенсивность флуоресценции, определенная с помощью анализов на основе программы CELL QUEST (фирма BD), а именно, выраженная в виде средних геометрических значений, отражает уровень связывания антитела с клетками. Это означает, что активность связывания тестируемой антигенсвязывающей молекулы, которая характеризуется количеством связанной тестируемой антигенсвязывающей молекулы, можно оценивать, определяя среднее геометрическое значение.

Имеет ли тестируемая антигенсвязывающая молекула, которая содержит домен, связывающий антиген GPC3, общий эпитоп с другой антигенсвязывающей молекулой, можно оценивать по конкуренции между двумя комплексами в отношении одного и того же эпитопа. Конкуренцию между антигенсвязывающими молекулами можно определять путем анализа перекрестной блокады или с помощью сходного анализа. Например, предпочтительным анализом перекрестной блокады является конкурентный ELISA-анализ.

В частности, при осуществлении анализа перекрестной блокады белок GPC3, иммобилизованный в лунках титрационного микропланшета, предварительно инкубируют в присутствии антигенсвязывающей молекулы, рассматриваемой в качестве конкурента-кандидата, или без нее, а затем вносят тестируемую антигенсвязывающую молекулу. Количество связанной с белком GPC3 тестируемой антигенсвязывающей молекулы в лунках находится в обратной корреляции с активностью связывания антигенсвязывающей молекулы, рассматриваемой в качестве конкурента-кандидата, который конкурирует за связывание с одним и тем же эпитопом. Это означает, что чем выше аффинность антигенсвязывающей молекулы, рассматриваемой в качестве конкурента-кандидата, к одному и тому же эпитопу, тем ниже активность связывания тестируемой антигенсвязывающей молекулы с сенсibilизированными белком GPC3 лунками.

Количество тестируемой антигенсвязывающей молекулы, связанной через белок GPC3 с лунками, легко определять путем предварительного мечения антигенсвязывающей молекулы. Например, меченую биотином антигенсвязывающую молекулу оценивают с использованием конъюгата авидин/пероксидаза и соответствующего субстрата. В частности, анализ перекрестной блокады, в котором применяют в качестве меток ферменты, такие как пероксидаза, называют "ELISA-анализом в конкурентных условиях (конкурентный анализ)". Антигенсвязывающую молекулу можно метить также с помощью других предназначенных для мечения субстанций, которые можно выявлять или оценивать. В частности, известны радиоактивные метки, флуоресцентные метки и т.п.

Когда антигенсвязывающая молекула, рассматриваемая в качестве конкурента-кандидата, может блокировать связывание тестируемой антигенсвязывающей молекулы, которая содержит домен, связывающий антиген GPC3 по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 20-50% и предпочтительно по меньшей мере на 50% по сравнению со связывающей активностью, установленной в

контрольном эксперименте, который проводят в отсутствие антигенсвязывающей молекулы, рассматриваемой в качестве конкурента, то считается, что для тестируемой антигенсвязывающей молекулы характерна выраженная способность к связыванию с тем же эпитопом, с которым связывается антигенсвязывающая молекула, рассматриваемая в качестве конкурента, или она конкурирует за связывание с тем же самым эпитопом.

Если структура эпитопа, связанного с тестируемой антигенсвязывающей молекулой, которая содержит домен, связывающий антиген GPC3, уже идентифицирована, то для решения вопроса о том, имеют ли тестируемая и контрольная антигенсвязывающие молекулы один и тот же эпитоп, можно сравнивать связывающие активности двух антигенсвязывающих молекул с пептидом, полученным путем интродукции аминокислотных мутаций в пептид, образующий эпитоп.

Для оценки указанных выше связывающих активностей, например, сравнивают связывающие активности тестируемой и контрольной антигенсвязывающих молекул с линейным пептидом, в который интродуцирована мутация, с помощью указанного выше формата ELISA. Помимо метода ELISA связывающую активность в отношении мутантного пептида, связанного с колонкой, можно определять, пропуская через колонку тестируемую и контрольную антигенсвязывающую молекулу и затем оценивая количество антигенсвязывающей молекулы, элюированной в раствор для элюции. Известны методы адсорбции мутантного пептида на колонке, например, в форме слитого с GST пептида.

Альтернативно этому, когда идентифицированный эпитоп представляет собой конформационный эпитоп, то для решения вопроса о том, имеют ли тестируемая и контрольная антигенсвязывающие молекулы общий эпитоп, можно применять следующий метод. Сначала получают экспрессирующие GPC3 клетки и клетки, экспрессирующие GPC3 с мутацией, интродуцированной в эпитоп. Тестируемую и контрольную молекулы добавляют в клеточную суспензию, полученную путем суспендирования этих клеток в приемлемом буфере, таком как ЗФР. Затем клеточные суспензии соответствующим образом промывают буфером и добавляют меченное с помощью ФИТЦ антитело, которое распознает тестируемую и контрольную антигенсвязывающие молекулы. Определяют интенсивность флуоресценции и количество клеток, окрашенных меченым антителом, используя FACSCalibur (фирма BD). Тестируемый и контрольный полипептидные комплексы соответствующим образом разводят приемлемым буфером и применяют в требуемой концентрации. Например, их можно применять в концентрации от 10 мкг/мл до 10 нг/мл. Интенсивность флуоресценции определяют с помощью анализа, для оценки результатов которого применяют программу CELL QUEST (фирма BD), а именно, определяют среднее геометрическое значение, которое отражает количество меченого антитела, связанного с клетками. Это означает, что связывающие активности тестируемой и контрольной антигенсвязывающих молекул, которые характеризуются количеством связанного меченого антитела, можно определять, оценивая среднее геометрическое значение.

При осуществлении описанного выше метода для решения вопроса о том, характерно ли для антигенсвязывающей молекулы "незначительное связывание с клетками, которые экспрессируют мутантный GPC3", можно применять, например, следующий метод. Сначала тестируемую и контрольную антигенсвязывающие молекулы, связанные с клетками, которые экспрессируют мутантный GPC3, окрашивают меченым антителом. Затем определяют интенсивность флуоресценции в клетках. Когда для оценки флуоресценции используют проточный цитометр, то интенсивность флуоресценции можно анализировать с помощью программы CELL QUEST. На основе средних геометрических значений в присутствии антигенсвязывающей молекулы и без нее можно рассчитывать согласно приведенной ниже формуле используемое для сравнения значение ($\Delta\text{Geo-Mean}$), характеризующее степень увеличения интенсивности флуоресценции в результате связывания с антигенсвязывающей молекулой:

$$\Delta\text{Geo-Mean} = \frac{\text{Geo-Mean (в присутствии антигенсвязывающей молекулы)}}{\text{Geo-Mean (в отсутствие антигенсвязывающей молекулы)}}$$

Используемое для сравнения среднее геометрическое значение (значение $\Delta\text{Geo-Mean}$ для мутантной молекулы GPC3), определенное с помощью описанного выше анализа, которое отражает количество тестируемой антигенсвязывающей молекулы, связанной с клетками, которые экспрессируют мутантный GPC3, сравнивают с относительным значением $\Delta\text{Geo-Mean}$, которое отражает количество тестируемой антигенсвязывающей молекулы, связанной с экспрессирующими GPC3 клетками. В этом случае концентрации тестируемой антигенсвязывающей молекулы, применяемые для определения относительных значений $\Delta\text{Geo-Mean}$ для экспрессирующих GPC3 клеток и клеток, экспрессирующих мутантный GPC3, наиболее предпочтительно регулируют таким образом, чтобы они были одинаковыми или практически одинаковыми. Антигенсвязывающую молекулу, для которой подтверждена способность распознавать эпитоп в GPC3, применяют в качестве контрольной антигенсвязывающей молекулы.

Если используемое для сравнения значение $\Delta\text{Geo-Mean}$ тестируемой антигенсвязывающей молекулы в отношении клеток, экспрессирующих мутантный GPC3, ниже чем используемое для сравнения значение $\Delta\text{Geo-Mean}$ тестируемой антигенсвязывающей молекулы в отношении клеток, экспрессирующих GPC3, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 50%, более предпочтительно на 30% и наиболее предпочтительно на 15%, то считают, что тестируемая антигенсвязывающая молекула "незначительно связывается с клетками, которые экспрессируют мутантный GPC3". Формула определения значения Geo-

Mean (среднее геометрическое значение) описана в руководстве по применению программы CELL QUEST (фирма BD biosciences). Когда путем сравнения установлено, что относительные значения являются практически эквивалентными, то можно считать, что тестируемая и контрольная антигенсвязывающие молекулы имеют одинаковый эпитоп.

Вариабельный фрагмент (Fv).

В контексте настоящего описания понятие "вариабельный фрагмент (Fv)" относится к минимальной единице полученного из антитела антигенсвязывающего домена, который состоит из пары, включающей вариабельную область легкой цепи антитела (VL) и вариабельную область тяжелой цепи антитела (VH). В 1988 г. Sketta и Pluckthun обнаружили, что гомогенные и активные антитела можно получать из периплазматической фракции *E. coli* путем встраивания гена антитела по ходу транскрипции относительно бактериальной сигнальной последовательности и индукции экспрессии гена в *E. coli* (Science 240(4855), 1988, с. 1038-1041). В Fv, полученном из периплазматической фракции, VH ассоциируется с VL таким образом, чтобы связываться с антигеном.

Согласно настоящему описанию Fv предпочтительно включает, например, пару Fv, которые представляют собой антигенсвязывающую молекулу или т.п., содержащую:

(1) двухвалентный антигенсвязывающий домен, который представляет собой двухвалентный scFv, в котором один одновалентный scFv двухвалентного scFv сцеплен с одним полипептидом, образующим Fc-домен, посредством тяжелой цепи Fv-фрагмента, образующего CD3-связывающий домен, а другой одновалентный scFv сцеплен с другим полипептидом, образующим Fc-домен, посредством легкой цепи Fv-фрагмента, образующего CD3-связывающий домен;

(2) домен, содержащий Fc-домен, который не обладает связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора и который получен из аминокислот, образующих Fc-домен IgG1, IgG2a, IgG3 или IgG4, и

(3) по меньшей мере один одновалентный CD3-связывающий домен, где легкая цепь и тяжелая цепь Fv-фрагментов в результате ассоциации образуют такой CD3-связывающий домен, который может связываться с антигеном CD3.

scFv, одноцепочечное антитело и sc(Fv)₂.

В контексте настоящего описания понятия "scFv", "одноцепочечное антитело" и "sc(Fv)₂" все относятся к фрагменту антитела в виде одной полипептидной цепи, которая содержит вариабельные области, полученные из тяжелой и легкой цепей, но не содержит константную область. Как правило, одноцепочечное антитело содержит также полипептидный линкер между VH- и VL-доменами, позволяющий образовывать требуемую структуру, которая, вероятно, обеспечивает связывание антигена. Одноцепочечное антитело подробно описано у Pluckthun в: "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", т. 113, под ред. Rosenburg и Moore, изд-во Springer-Verlag, New York, 1994, с. 269-315" (см. также публикацию международного патента WO 1988/001649; US №№ 4946778 и 5260203). В конкретном варианте осуществления изобретения одноцепочечное антитело может быть биспецифическим и/или гуманизированным.

scFv представляет собой антигенсвязывающий домен, в котором VH и VL, образующие Fv, сцеплены друг с другом с помощью пептидного линкера (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85(16), 1988, с. 5879-5883). VH и VL могут удерживаться в непосредственной близости с помощью пептидного линкера.

sc(Fv)₂ представляет собой одноцепочечное антитело, в котором четыре вариабельные области двух VL и двух VH сцеплены линкерами такими как пептидные линкеры, с образованием одной цепи (J Immunol. Methods 231(1-2), 1999, с. 177-189). Две VH и две VL можно получать из различных моноклональных антител. Указанные sc(Fv)₂ предпочтительно включают, например, биспецифический sc(Fv)₂, распознающий два эпитопа, которые присутствуют в одном антигене, что описано в Journal of Immunology 152(11), 1994, с. 5368-5374. sc(Fv)₂ можно получать методами, известными специалистам в данной области. Например, sc(Fv)₂ можно получать путем связывания scFv с помощью линкера, такого как пептидный линкер.

Согласно настоящему описанию к форме антигенсвязывающего домена, образующего sc(Fv)₂, относится антитело, в котором две единицы VH и две единицы VL организованы в следующем порядке: VH, VL, VH и VL ([VH]-линкер-[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VL]), начиная с N-конца одноцепочечного полипептида. Порядок расположения двух единиц VH и двух единиц VL не ограничен указанной выше формой, и их можно организовывать в любом порядке. Пример порядка расположения в различных формах приведен ниже. [VL]-линкер-[VH]-линкер-[VH]-линкер-[VL], [VH]-линкер-[VL]-линкер-[VL]-линкер-[VH], [VH]-линкер-[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VL], [VL]-линкер-[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VH], [VL]-линкер-[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VH].

Молекулярная форма sc(Fv)₂ подробно описана также в WO 2006/132352. Таким образом, согласно указанным описаниям специалисты в данной области могут получать требуемый sc(Fv)₂, предназначенный для создания антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании.

Кроме того, антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно конъюгировать с полимером-носителем, таким как ПЭГ, или органическим соединением, таким как противораковое средство. Альтернативно этому, дополнительную последовательность сахарной цепи предпочтительно встраивают в полипептидные комплексы для того, чтобы сахарная цепь обеспечивала требуемое действие.

Линкеры, предназначенные для связывания переменных областей антитела, представляют собой произвольные пептидные линкеры, которые можно интродуцировать с помощью генной инженерии, синтетические линкеры и линкеры, описанные, например, в Protein Engineering, 9(3), 1996, с. 299-305. Однако для целей настоящего изобретения наиболее предпочтительными являются пептидные линкеры. Длина пептидных линкеров специально не ограничена, и специалисты в данной области могут выбирать ее в зависимости от поставленной задачи. Предпочтительная длина составляет пять или большее количество аминокислот (при этом, верхний предел составляет (но не ограничиваясь только указанным), как правило, вплоть до 30 аминокислот или менее, предпочтительно 20 аминокислот или менее), и наиболее предпочтительно 15 аминокислот. Когда $sc(Fv)_2$ содержит три пептидных линкера, то их длина может быть одинаковой или различной. Например, указанные пептидные линкеры включают:

Ser,
 Gly·Ser,
 Gly·Gly·Ser,
 Ser·Gly·Gly,
 Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 15),
 Ser·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 16),
 Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 17),
 Ser·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 18),
 Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 19),
 Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 20),
 Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 21),
 Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 22),
 (Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 17))_n,
 (Ser·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 18))_n,

где n обозначает целое число от 1 или более. Специалисты в данной области могут выбирать длину или последовательности пептидных линкеров в зависимости от поставленной задачи.

Как правило, для перекрестного сшивания используют синтетические линкеры (химические перекрестносшивающие агенты), они представляют собой, например:

N-гидрокси-сукцинимид (NHS),
 дисукцинимидилсуберат (DSS),
 бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS),
 дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP),
 дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP),
 этиленгликольбис(сукцинимидилсукцинат) (EGS),
 этиленгликольбис(сульфосукцинимидилсукцинат) (сульфо-EGS),
 дисукцинимидилтарtrat (DST), дисульфосукцинимидилтарtrat (сульфо-DST),
 бис-[2-(сукцинимидоксикарбонилокси)этил]сульфон (BSOCOES) и
 и бис-[2-(сульфосукцинимидоксикарбонилокси)этил]сульфон (сульфо-BSOCOES). Эти перекрестносшивающие агенты поступают в продажу.

Как правило, требуется три линкера для соединения вместе четырех переменных областей антитела. Применяемые линкеры могут быть одного типа или различных типов.

Fab, F(ab')₂ и Fab'.

"Fab" состоит из одной легкой цепи и CH1-домена и переменной области из одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидные мостики с тяжелой цепью другой молекулы.

"F(ab')₂" или "Fab" получают обработкой иммуноглобулина (моноклональное антитело) протеазой, такой как пепсин и папаин, и они относятся к фрагменту антитела, получаемого расщеплением иммуноглобулина (моноклональное антитело) вблизи дисульфидных мостиков, присутствующих между шарнирными областями в каждой из двух H-цепей. Например, папаин расщепляет IgG перед дисульфидными мостиками, присутствующими между шарнирными областями в каждой из двух H-цепей, с образованием двух гомологичных фрагментов антитела, в которых L-цепь, содержащая VL (переменная область L-цепи), и CL (константная область L-цепи), сцеплены с фрагментом H-цепи, содержащим VH (переменная область H-цепи) и CH₁ (γ1-область в константной области H-цепи), через дисульфидный мостик в их C-концевых областях. Каждый из указанных двух гомологичных фрагментов антител обозначают как Fab'.

"F(ab')₂" состоит из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, содержащих в константной области CH1-домен и часть CH2-доменов, в результате между двумя тяжелыми цепями образуются дисульфидные мостики. F(ab')₂, образующий антигенсвязывающую молекулу, представленную в настоящем описании, предпочтительно можно получать следующим образом. Полное моноклональное антитело или

сходное антитело, содержащее требуемый антигенсвязывающий домен, частично расщепляют протеазой, такой как пепсин; и Fc-фрагменты удаляют путем адсорбции на колонке с белком А. Не существует ограничения касательно конкретной протеазы, если она обладает способностью избирательно расщеплять полное антитело с образованием F(ab')₂ в соответствующих для данного фермента реакционных условиях, таких как значение рН. Указанные протеазы представляют собой, например, пепсин и фицин.

Fc-домен.

Fc-домен, который образует антигенсвязывающую молекулу, представленную в настоящем описании, предпочтительно можно получать следующим образом. Антитело, такое как моноклональное антитело, частично расщепляют протеазой, такой как пепсин. Затем образовавшийся фрагмент адсорбируют на колонке с белком А или белком G и элюируют соответственным буфером для элюции. Не существует ограничения касательно конкретной протеазы, если она обладает способностью избирательно расщеплять антитела, такие как моноклональные антитела, в соответствующих для данного фермента реакционных условиях, таких как значение рН. Указанные протеазы представляют собой, например, пепсин и фицин.

Антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, содержат Fc-домен с пониженной способностью связывать Fc γ -рецептор, которые включают аминокислоты, образующие Fc-домен IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Изотип антитела определяют на основе структуры константной области. Константные области изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 обозначают как C γ 1, C γ 2, C γ 3 и C γ 4 соответственно. Аминокислотные последовательности Fc-домена полипептидов, которые образуют человеческие C γ 1, C γ 2, C γ 3 и C γ 4, в качестве примера представлены в SEQ ID NO: 23, 24, 25 и 26 соответственно. Взаимосвязь между аминокислотными остатками, образующими каждую аминокислотную последовательность, и EU-нумерацией Кэбота (обозначена в контексте настоящего описания как EU-индекс), представлена на фиг. 12.

Понятие "Fc-домен" относится к области вне F(ab')₂, которая содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области, которая включает CH1-домен и область между CH1- и CH2-доменами, что позволяет образовываться дисульфидным мостикам между двумя тяжелыми цепями. Fc-домен, образующий антигенсвязывающую молекулу, представленную в настоящем описании, предпочтительно можно получать следующим образом. Моноклональное антитело в виде IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или сходное антитело частично расщепляют протеазой, такой как пепсин, с последующей элюцией фракции, адсорбированной на колонке с белком А. Не существует ограничения касательно конкретной протеазы, если она обладает способностью избирательно расщеплять полное антитело с образованием F(ab')₂ в соответствующих для данного фермента реакционных условиях, таких как значение рН. Указанные протеазы представляют собой, например, пепсин и фицин.

Fc γ -рецептор.

Понятие "Fc γ -рецептор" относится к рецептору, обладающему способностью связываться с Fc-доменом моноклональных антител в виде IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, и оно включает всех представителей, принадлежащих к семейству белков, которые кодируются главным образом геном Fc γ -рецептора. У человека семейство включает Fc γ RI (CD64), включая изоформы Fc γ RIa, Fc γ RIb и Fc γ RIc; Fc γ RII (CD32), включая изоформы Fc γ RIIa (в том числе аллотип H131 и R131), Fc γ RIIb (включая Fc γ RIIb-1 и Fc γ RIIb-2) и Fc γ RIIc; и Fc γ RIII (CD16), включая изоформу Fc γ RIIIa (в том числе аллотипы V158 и F158), и Fc γ RIIIb (в той числе аллотипы Fc γ RIIIb-NA1 и Fc γ RIIIb-NA2); а также все неидентифицированные человеческие Fc γ R, изоформы Fc γ R и их аллотипы. Однако Fc γ -рецептор не ограничен указанными примерами. Fc γ R включает (но не ограничиваясь только ими) Fc γ R, полученные из антител человека, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Fc γ R можно получать из любого организма. Мышиный Fc γ R включает (но не ограничиваясь только ими) Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16) и Fc γ RIII-2 (CD16-2), а также все неидентифицированные мышинные Fc γ R, изоформы Fc γ R и их аллотипы. Указанные предпочтительные Fc γ -рецепторы включают, например, человеческие Fc γ I (CD64), Fc γ IIA (CD32), Fc γ IIB (CD32), Fc γ IIIA (CD16) и/или Fc γ IIIB (CD16). Полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc γ I представлены в SEQ ID NO: 27 (NM_000566.3) и 28 (NP_000557.1) соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc γ IIA представлены в SEQ ID NO: 29 (BC020823.1) и 30 (AAH20823.1) соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc γ IIB представлены в SEQ ID NO: 31 (BC 146678.1) и 32 (AAI46679.1) соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc γ IIIA представлены в SEQ ID NO: 33 (BC033678.1) и 34 (AAH33678.1) соответственно и полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc γ IIIB представлены в SEQ ID NO: 35 (BC 128562.1) и 36 (AAI28563.1) соответственно (в скобках указан регистрационный номер каждой последовательности в базе данных RefSeq). Обладает ли Fc γ -рецептор способностью связываться с Fc-доменом моноклонального антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, можно оценивать с помощью ALPHA Screen®-анализа (гомогенный анализ усиленной за счет эффекта близости люминесценции (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)), BIACORE-метода на основе поверхностного плазмонного резонанса

(SPR) и др. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, с. 4005-4010), помимо описанных выше форматов FACS и ELISA.

При этом понятие "Fc-лиганд" или "эффекторный лиганд" относится к молекуле и предпочтительно полипептиду, который связывается с Fc-доменом антитела, образуя комплекс Fc/Fc-лиганд. Молекулу можно получать из любого организма. Связывание Fc-лиганда с Fc предпочтительно индуцирует одну или несколько эффекторных функций. Указанные лиганды включают (но не ограничиваясь только ими) Fc-рецепторы, Fc γ R, Fc α R, Fc ϵ R, FcRn, C1q и C3, маннансвязывающий лектин, маннозный рецептор, белок A Staphylococcus, белок G Staphylococcus и вирусные Fc γ R. Fc-лиганды включают также гомологи Fc-рецептора (FcRH) (Davis и др., Immunological Reviews 190, 2002, с. 123-136), которые представляют собой семейство Fc-рецепторов, гомологичных Fc γ R. К Fc-лигандам относятся также неидентифицированные молекулы, которые связываются с Fc.

Активность связывания с Fc γ -рецептором.

Нарушение активности связывания Fc-домена с любым из Fc γ -рецепторов Fc γ I, Fc γ IIA, Fc γ IIB, Fc γ IIIA и/или Fc γ IIIB можно оценивать, используя описанные выше форматы FACS и ELISA, а также ALPHA Screen-анализ (гомогенный анализ усиленной за счет эффекта близости люминисценции, BIACORE-метод на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, с. 4005-4010).

ALPHA Screen-анализ осуществляют на основе технологии ALPHA, которая основана на описанном ниже принципе, с использованием двух типов гранул. Люминисцентный сигнал становится обнаруживаемым только тогда, когда происходит биологическое взаимодействие молекул, связанных с гранулами-донорами, с молекулами, связанными с гранулами-акцепторами, и когда обе гранулы находятся в непосредственной близости друг от друга. Возбужденный лазерным пучком фотосенсибилизатор в гранулах-донорах превращает кислород в возбужденный синглетный кислород. Когда синглетный кислород диффундирует из гранул-доноров и достигает гранул-акцепторов, локализованных в непосредственной близости, то индуцируется хемилюминисцентная реакция в гранулах-акцепторах. В итоге эта реакция приводит к испусканию света. Если молекулы, связанные с гранулами-донорами, не взаимодействуют с гранулами-акцепторами, то синглетный кислород, который продуцируется гранулами-донорами, не достигает гранул-акцепторов и хемилюминисцентная реакция не происходит.

Например, меченную биотином антигенсвязывающую молекулу иммобилизуют на гранулах-донорах, а меченный глутатион-S-трансферазой (GST) Fc γ -рецептор иммобилизуют на гранулах-акцепторах. В отсутствие антигенсвязывающей молекулы, содержащей конкурирующий мутантный Fc-домен, Fc γ -рецептор взаимодействует с антигенсвязывающей молекулой, содержащей Fc-домен дикого типа, индуцируя в результате сигнал с длиной волны от 520 до 620 нм. Антигенсвязывающая молекула, содержащая немеченый мутантный Fc-домен, конкурирует с антигенсвязывающей молекулой, содержащей Fc-домен дикого типа, за взаимодействие с Fc γ -рецептором. Относительную аффинность связывания можно оценивать, определяя количественно снижение флуоресценции в результате конкуренции. Методы биотинилирования антигенсвязывающих молекул, таких как антитела, с помощью сульфо-NHS-биотина или подобных агентов являются известными. Приемлемые методы введения GST-метки в Fc γ -рецептор включают методы, которые предусматривают слияние полипептидов, кодирующих Fc γ и GST, в рамке считывания, экспрессию слитого гена с использованием клеток, в которые интродуцирован вектор, несущий ген, и последующую очистку с помощью содержащей глутатион колонки. Индуцированный сигнал предпочтительно можно анализировать, например, посредством подгонки к односайтовой модели конкуренции на основе нелинейного регрессионного анализа с использованием такой программы, как GRAPHPAD PRISM (фирма GraphPad; Сан-Диего).

Одну из субстанций, предназначенных для исследования их взаимодействия, иммобилизуют в качестве лиганда на тонком слое золота сенсорного чипа. Когда свет проникает на заднюю поверхность сенсорного чипа так, что имеет место полное отражение на границе раздела между тонким слоем золота и стеклом, то интенсивность отраженного света в определенном сайте частично снижается (SPR-сигнал). Другую субстанцию, предназначенную для исследования ее взаимодействия, инъецируют в качестве аналита на поверхность сенсорного чипа. Когда аналит связывается с лигандом, то масса иммобилизованной молекулы-лиганда возрастает. Это изменяет показатель преломления растворителя на поверхности сенсорного чипа. Изменение показателя преломления вызывает положительный сдвиг SPR-сигнала (и наоборот, диссоциация сдвигает сигнал назад в исходное положение). В Biacore-системе уровень описанного выше сдвига (т.е. изменение массы на поверхности сенсорного чипа) откладывают по вертикальной оси, и таким образом в качестве количественных данных получают график изменения массы в зависимости от времени (сенсограмма). Кинетические параметры (константа скорости ассоциации (k_a) и константа скорости диссоциации (k_d)) определяют из представленных в виде кривых сенсограмм, и определяют аффинность (K_D) как соотношение указанных двух констант. BIACORE-методы предпочтительно применяют для анализа ингибирования. Примеры такого анализа ингибирования описаны в Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, с. 4005-4010.

В контексте настоящего описания "пониженная активность связывания с Fc γ -рецептором" означает,

например, что при использовании описанного выше метода анализа конкурентная активность тестируемой антигенсвязывающей молекулы составляет 50% или менее, предпочтительно 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 20% или менее или 15% или менее и наиболее предпочтительно 10% или менее, 9% или менее, 8% или менее, 7% или менее, 6% или менее, 5% или менее, 4% или менее, 3% или менее, 2% или менее или 1% менее, по сравнению с конкурентной активностью контрольной антигенсвязывающей молекулы.

Антигенсвязывающие молекулы, содержащие Fc-домен моноклонального антитела в виде IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, можно использовать соответственно в качестве контрольных антигенсвязывающих молекул. Структуры Fc-домена представлены в SEQ ID NO: 37 (A добавлен к N-концу последовательности, представленной в RefSeq под регистрационным номером AAC82527.1), SEQ ID NO: 38 (A добавлен к N-концу последовательности, представленной в RefSeq под регистрационным номером AAB59393.1), SEQ ID NO: 25 (A добавлен к N-концу последовательности, представленной в RefSeq под регистрационным номером CAA27268.1) и SEQ ID NO: 39 (A добавлен к N-концу последовательности, представленной в RefSeq под регистрационным номером AAB59394.1). Кроме того, когда антигенсвязывающую молекулу, содержащую мутантный Fc-домен антитела конкретного изотипа, используют в качестве тестируемой субстанции, то воздействие мутации мутанта на активность связывания с Fcγ-рецептором оценивают с использованием в качестве контроля антигенсвязывающей молекулы, содержащей Fc-домен такого же изотипа. Как описано выше, соответственно получают антигенсвязывающие молекулы, содержащие мутантный Fc-домен с действительно пониженной активностью связывания с Fcγ-рецептором.

Такие известные мутанты включают, например, мутанты с делецией аминокислот 231A-238S (EU-нумерация) (WO 2009/011941), а также мутанты C226S, C229S, P238S, (C220S) (J. Rheumatol 34, 2007, с. 11); C226S и C229S (Hum. Antibod. Hybridomas 1(1), 1990, с. 47-54); C226S, C229S, E233P, L234V, и L235A (Blood 109, 2007, с. 1185-1192).

В частности, предпочтительными антигенсвязывающими молекулами являются молекулы, которые содержат Fc-домен с заменой аминокислоты в положении 220, 226, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 325, 327, 328, 329, 330, 331 или 332 (EU-нумерация) в аминокислотах, образующих Fc-домен антитела конкретного изотипа. Изобретение не ограничено изотипом антитела, из которого получают Fc-домен, и можно использовать соответствующий Fc-домен, полученный из моноклонального антитела в виде IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Предпочтительно следует применять Fc-домен, полученный из антител в виде IgG1.

Предпочтительными антигенсвязывающими молекулами являются, например, молекулы, которые содержат Fc-домен, содержащий одну из указанных ниже замен, положение которой определяется согласно EU-нумерации (каждый номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и однобуквенный символ аминокислоты, который находится перед номером, обозначает аминокислотный остаток до его замены, а однобуквенный символ аминокислоты, расположенный за номером, обозначает аминокислотный остаток после замены), среди аминокислот, образующих Fc-домен антитела в виде IgG1:

- (a) L234F, L235E, P331S;
- (б) C226S, C229S, P238S;
- (в) C226S, C229S;
- (г) C226S, C229S, E233P, L234V, L235A;
- (д) L234A, L235A или L235R, N297A;
- (е) L235A или L235R, S239K, N297A,

а также молекулы, которые содержат Fc-домен с делецией аминокислот в положениях 231-238.

Кроме того, предпочтительными антигенсвязывающими молекулами являются также молекулы, которые содержат Fc-домен, содержащий одну из указанных ниже замен, положение которой определяют согласно EU-нумерации, среди аминокислот, образующих Fc-домен антитела в виде IgG2:

- (ж) H268Q, V309L, A330S и P331S;
- (з) V234A;
- (и) G237A;
- (к) V234A и G237A;
- (л) A235E и G237A;
- (м) V234A, A235E и G237A.

Каждый номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и однобуквенный символ аминокислоты, который находится перед номером, обозначает аминокислотный остаток до его замены, а однобуквенный символ аминокислоты, расположенный за номером, обозначает аминокислотный остаток после замены.

Кроме того, предпочтительными антигенсвязывающими молекулами являются молекулы, которые содержат Fc-домен, содержащий одну из указанных ниже замен, положение которой определяют согласно EU-нумерации, среди аминокислот, образующих Fc-домен антитела в виде IgG3:

- (н) F241A;

- (o) D265A;
- (п) V264A.

Каждый номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и однобуквенный символ аминокислоты, который находится перед номером, обозначает аминокислотный остаток до его замены, а однобуквенный символ аминокислоты, расположенный за номером, обозначает аминокислотный остаток после замены.

Кроме того, предпочтительными антигенсвязывающими молекулами являются молекулы, которые содержат Fc-домен, содержащий одну из указанных ниже замен, положение которой определяют согласно EU-нумерации, среди аминокислот, образующих Fc-домен антитела в виде IgG4:

- (p) L235A, G237A и E318A;
- (c) L235E;
- (т) F234A и L235A.

Каждый номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и однобуквенный символ аминокислоты, который находится перед номером, обозначает аминокислотный остаток до его замены, а однобуквенный символ аминокислоты, расположенный за номером, обозначает аминокислотный остаток после замены.

Другие предпочтительные антигенсвязывающие молекулы представляют собой молекулы, содержащие Fc-домен, в котором любая аминокислота в положениях 233, 234, 235, 236, 237, 327, 330 или 331 (EU-нумерация) среди аминокислот, образующих Fc-домен антитела в виде IgG1, заменена на аминокислоту, которая находится в соответствующем положении согласно EU-нумерации в соответствующем IgG2 или IgG4.

Предпочтительные антигенсвязывающие молекулы представляют собой также молекулы, содержащие Fc-домен, в котором одна или несколько аминокислот в положениях 234, 235 и 297 (EU-нумерация) среди аминокислот, образующих Fc-домен антитела в виде IgG1, заменена(ы) на другие аминокислоты. Изобретение не ограничено типом аминокислоты после замены; однако наиболее предпочтительными являются антигенсвязывающие молекулы, содержащие Fc-домен, в котором одна или несколько аминокислот в положениях 234, 235 и 297 заменена(ы) на аланин.

Предпочтительные антигенсвязывающие молекулы представляют собой также молекулы, содержащие Fc-домен, в котором аминокислота в положении 265 (EU-нумерация) среди аминокислот, образующих Fc-домен антитела в виде IgG1, заменена другой аминокислотой. Изобретение не ограничено типом аминокислоты после замены; однако наиболее предпочтительными являются антигенсвязывающие молекулы, содержащие Fc-домен, в котором аминокислота в положении 265 заменена на аланин.

Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула.

Примеры предпочтительных вариантов "мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы", предлагаемой в настоящем изобретении, включают мультиспецифические антитела. Когда Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fc γ -рецептора применяют в качестве Fc-области мультиспецифического антитела, то соответственно можно применять Fc-область, полученную из мультиспецифического антитела. Биспецифические антитела являются наиболее предпочтительными в качестве мультиспецифических антител, предлагаемых в настоящем изобретении. В этом случае биспецифическое антитело представляет собой антитело, имеющее две различные специфичности. Биспецифические антитела IgG-типа можно секретировать из гибридной гибридомы (квадромы), полученной путем слияния двух типов гибридом, продуцирующих антитело в виде IgG (Milstein C. и др., Nature 305, 1983, с. 537-540).

Кроме того, биспецифические антитела IgG-типа секретируют посредством интродукции в клетки в целом четырех генов, т.е. генов L-цепей и H-цепей, образующих представляющие интерес IgG двух типов, и их коэкспрессии. Однако теоретически существует десять комбинаций H-цепей и L-цепей IgG, которые можно получать такими методами. При этом трудно очищать IgG, состоящий из требуемой комбинации H-цепей и L-цепей из десяти типов IgG. Кроме того, теоретическое количество секретируемого IgG с требуемой комбинацией, также в значительной степени снижено, поэтому требуется осуществлять крупномасштабное культивирование. Это дополнительно увеличивает стоимость производства.

Таким образом, для мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых к настоящем изобретении, можно применять методики, усиливающие ассоциацию между H-цепями и между L- и H-цепями, имеющими требуемые комбинации.

Например, методики подавления нежелательной ассоциации H-цепей путем интродукции электростатического отталкивания на поверхности раздела второго константного участка или третьего константного участка H-цепи антитела (CH2 или CH3) можно применять для ассоциации мультиспецифического антитела (WO 2006/106905).

При осуществлении метода подавления нежелательной ассоциации H-цепей путем интродукции электростатического отталкивания на поверхности раздела CH2 или CH3, примеры аминокислотных остатков, контактирующих на поверхности раздела с другим константным участком H-цепи, включают области, соответствующие остаткам, находящимся согласно EU-нумерации в положениях 356, 439, 357, 370, 399 и 409 в CH3-участке.

Более конкретно, примеры включают антитело, содержащее два типа СНЗ-участков Н-цепи, в которых 1-3 пары аминокислотных остатков в СНЗ-участке первой Н-цепи, выбранные из пар аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (1)-(3), несут одинаковый тип заряда:

(1) аминокислотные остатки в СНЗ-участке Н-цепи, которые находятся согласно ЕУ-нумерации в положениях 356 и 439;

(2) аминокислотные остатки в СНЗ-участке Н-цепи, которые находятся согласно ЕУ-нумерации в положениях 357 и 370; и

(3) аминокислотные остатки в СНЗ-участке Н-цепи, которые находятся согласно ЕУ-нумерации в положениях 399 и 409.

Кроме того, антитело может представлять собой антитело, в котором пары аминокислотных остатков в СНЗ-участке второй Н-цепи, который отличается от указанного выше СНЗ-участка первой Н-цепи, выбирают из вышеуказанных в подпунктах (1)-(3) пар аминокислотных остатков, в котором 1-3 пары аминокислотных остатков, которые соответствуют вышеуказанным в подпунктах (1)-(3) парам аминокислотных остатков, несущим такой же тип заряда, что и указанный выше для СНЗ-участка первой Н-цепи, несут противоположные заряды относительно соответствующих аминокислотных остатков в указанном выше СНЗ-участке первой Н-цепи.

Соответствующие аминокислотные остатки, указанные выше в подпунктах (1)-(3), при ассоциации располагаются близко друг к другу. Специалисты в данной области могут установить для требуемого СНЗ-участка Н-цепи или константной области Н-цепи сайты, которые соответствуют вышеуказанным остаткам, указанным в подпунктах (1)-(3), посредством моделирования гомологии и т.п., используя поступающую в продажу программу, и аминокислотные остатки этих сайтов можно подвергать при необходимости модификациям.

В указанных выше антителах "имеющие заряд аминокислотные остатки" предпочтительно выбирают, например, из аминокислотных остатков, которые входят в любую одну из указанных ниже групп (а) и (б):

(а) глутаминовая кислота (Е) и аспарагиновая кислота (D) и

(б) лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H).

Касательно указанных выше антител то, что они "имеют одинаковый тип заряда" означает, например, что два или большее количество аминокислотных остатков все представляют собой аминокислотные остатки, включенные в любую одну из вышеуказанных групп (а) и (б). Понятие "имеют противоположный заряд" означает, например, что, когда по меньшей мере один из двух или большего количества аминокислотных остатков представляет собой аминокислотный остаток, включенный в любую одну из вышеуказанных групп (а) и (б), остальные остатки должны представлять собой аминокислотные остатки, включенные в другую группу.

В предпочтительном варианте вышеуказанного антитела СНЗ-участок первой Н-цепи и СНЗ-участок второй Н-цепи могут быть перекрестно сшиты дисульфидными мостиками.

Согласно настоящему изобретению аминокислотные остатки, подлежащие изменению, не ограничены аминокислотными остатками константной области или варибельной области описанного выше антитела. Касательно полипептидных мутантов или гетеромультимеров специалисты в данной области могут установить аминокислотные остатки, которые образуют поверхность раздела, посредством моделирования гомологии и т.п., используя поступающую в продажу программу, и аминокислотные остатки этих сайтов можно подвергать при необходимости изменениям для того, чтобы регулировать ассоциацию.

Другие известные методики можно применять также для ассоциации мультиспецифических антител, предлагаемых в настоящем изобретении. Полипептиды с различными аминокислотами в Fc-области можно эффективно ассоциировать друг с другом путем замены боковой цепи аминокислоты, присутствующей в одной из варибельных областей Н-цепи антитела, на более крупную боковую цепь ("выступ") и замены боковой цепи аминокислоты в соответствующей варибельной области другой Н-цепи на меньшую боковую цепь ("впадина") так, что "выступ" помещается во "впадину" (WO 1996/027011; Ridgway J.V. и др., *Protein Engineering* 9, 1996, с. 617-621; Merchant A.M. и др., *Nature Biotechnology* 16, 1998, с. 677-681 и US 20130336973).

Кроме того, другие известные методики можно применять также для ассоциации мультиспецифических антител, предлагаемых в настоящем изобретении. Ассоциацию полипептидов, имеющих различные последовательности, можно эффективно индуцировать путем комплементарной ассоциации СНЗ-областей, используя сконструированный СНЗ-домен с обменом цепей, полученный путем изменения части СНЗ в одной из Н-цепей антитела на соответствующую полученную из IgA последовательность и интродукции в комплементарную часть СНЗ в другой Н-цепи соответствующей полученной из IgA последовательности (*Protein Engineering Design & Selection*, 23, 2010, с. 195-202). Указанную известную методику можно применять также для эффективного получения представляющих интерес мультиспецифических антител.

Кроме того, для получения мультиспецифических антител можно применять следующие методики: методики получения антител на основе ассоциации СН1 и СL антитела и ассоциации V_H и V_L, которые

описаны в WO 2011/028952, WO2014/018572 и в Nat Biotechnol. 32(2), февраль 2014 г., с. 191-198; методики получения биспецифических антител с использованием в комбинации полученных по отдельности моноклональных антител (обмен плечей Fab, (Fab arm exchange, FAE), описанные в WO 2008/119353 и WO 2011/131746; методики регуляции ассоциации между CH3-доменом тяжелых цепей антител, описанные в WO 2012/058768 и WO 2013/063702; методики получения биспецифических антител, состоящих из двух типов легких цепей и одного типа тяжелой цепи, описанные в WO 2012/023053; методики получения биспецифических антител с использованием двух штаммов бактериальных клеток, которые индивидуально экспрессируют одну из цепей антитела, содержащего одну H-цепь и одну L-цепь, описанные Christoph и др., Nature Biotechnology т. 31, 2013, с. 753-758).

Альтернативно этому, даже, если представляющее интерес мультиспецифическое антитело нельзя получать эффективно, мультиспецифическое антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, можно получать путем отделения представляющего интерес мультиспецифического антитела от полученных антител и его очистки. Например, описан метод, позволяющий осуществлять очистку двух типов гомомерных форм и представляющего интерес гетеромерного антитела с помощью ионообменной хроматографии, путем установления различия в изоэлектрических точках в результате интродукции аминокислотных замен в вариабельные области двух типов H-цепей (WO 2007/114325). К настоящему времени в качестве метода для очистки гетеромерных форм описан метод, основанный на применении белка А для очистки гетеродимерного антитела, содержащего H-цепь мышинового IgG2a, которая связывается с белком А, и H-цепь крысиного IgG2b, которая не связывается с белком А (WO 98/050431 и WO 95/033844). Кроме того, гетеродимеризованное антитело само можно эффективно очищать с использованием колонки с белком А путем изменения взаимодействия между каждой из H-цепей и белком А, путем применения H-цепей, в которых аминокислотные остатки в сайте связывания IgG-белок А в положениях 435 и 436 (EU-нумерация) заменены на аминокислотные остатки, которые обеспечивают другую аффинность связывания с белком А, такие как Туг, His или т.п., или с использованием H-цепей с различной аффинностью к белку А, которые получают согласно методу, указанному в приведенном для сравнения примере 5, для изменения взаимодействия каждой из H-цепей с белком А, и последующего применения колонки с белком А.

Альтернативно этому, можно получать общую L-цепь, которая может обеспечивать способность связываться с множеством различных H-цепей, и применять в качестве общей L-цепи мультиспецифического антитела. Для достижения эффективной экспрессии мультиспецифического IgG можно интродуцировать в клетки гены указанной общей L-цепи и множества различных H-цепей и экспрессировать IgG (Nature Biotechnology, 16, 1998, с. 677-681). Метод селекции общей L-цепи, для которой характерна выраженная способность к связыванию с любыми различными H-цепями, можно применять также для селекции общей H-цепи (WO 2004/065611).

Кроме того, Fc-область, отличающаяся улучшенной С-концевой гетерогенностью, можно применять в качестве Fc-области, предлагаемой в настоящем изобретении. Более конкретно, предложены Fc-области, в которых отсутствуют глицин в положении 446 и лизин в положении 447 (EU-нумерация) в аминокислотных последовательностях двух полипептидов, образующих Fc-область, которая происходит из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Несколько, например, две или большее количество, указанных методик можно применять в сочетании друг с другом. Кроме того, эти методики можно соответствующим образом и раздельно применять к двум H-цепям, подлежащим ассоциации. Кроме того, указанные методики можно применять в комбинации с описанной выше Fc-областью, у которой снижена активность связывания с Fc γ -рецептором. Кроме того, антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, может представлять собой молекулу, полученную отдельно на основе антигенсвязывающей молекулы, подвергнутой таким описанным выше модификациям, что она имеет такую же аминокислотную последовательность.

Приемлемая мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит:

- (1) домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении глипикана 3;
- (2) домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса T-клеточного рецептора; и
- (3) домен, содержащий указанную Fc-область с пониженной способностью связываться с Fc γ -рецептором, ее структура не ограничена указанной.

Согласно настоящему изобретению каждый из вышеуказанных доменов может быть сшит непосредственно с помощью пептидных связей. Например, когда применяют F(ab')₂ в качестве домена, содержащего вариабельную область антитела, указанного в подпунктах (1) и (2), и указанные Fc-области в качестве домена, содержащего Fc-область с пониженной способностью связываться с Fc γ -рецептором, указанного в подпункте (3), то полипептиды, образованные путем сшивания содержащих вариабельные области доменов, указанных в подпунктах (1) и (2), и содержащего Fc-область домена, указанного в подпункте (3), с помощью пептидных связей, могут образовывать структуру антитела. Такие антитела мож-

но получать путем очистки из указанной выше культуральной среды гибридомы, а также путем очистки антител из культуральной среды требуемых клеток-хозяев, которые стабильно несут полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, которые образуют антитело.

Примеры предпочтительной вариабельной области Н-цепи антитела, предлагаемой в настоящем изобретении, содержащееся в вариабельной области антитела со связывающей активностью в отношении глипикана 3, включают вариабельные области Н-цепи антитела, которые представлены в табл. 1, или вариабельные области Н-цепи антитела, которые имеют последовательности CDR, аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 которых являются такими же, что аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в вариабельных областях Н-цепи, которые указаны в табл. 1, или вариабельные области Н-цепи антитела, которые функционально эквивалентны вышеуказанным вариабельным областям.

Таблица 1

Обозначение последовательности	SEQ ID NO:	Обозначение последовательности	SEQ ID NO:
H0000	40	GCH042	193
GCH003	170	GCH043	194
GCH005	171	GCH045	195
GCH006	172	GCH053	196
GCH007	173	GCH054	197
GCH008	174	GCH055	198
GCH010	175	GCH056	199
GCH012	176	GCH057	200
GCH013	177	GCH059	201
GCH014	178	GCH060	202
GCH015	179	GCH061	203
GCH016	180	GCH062	204
GCH019	181	GCH064	205
GCH022	182	GCH065	206
GCH023	183	GCH066	207
GCH025	184	GCH067	208
GCH026	185	GCH068	209
GCH027	186	GCH073	210
GCH029	187	GCH094	211
GCH032	188	GCH098	212
GCH034	189	GCH099	213
GCH035	190	GCH100	214
GCH039	191	H0610	215
GCH040	192		

Примеры предпочтительной вариабельной области антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, предлагаемой в настоящем изобретении, включают вариабельные области антитела, обладающие связывающей активностью в отношении Т-клеточного рецептора. Из Т-клеточных рецепторов предпочтительным является CD3, а наиболее предпочтительным CD3ε. Примеры вариабельной области Н-цепи антитела, содержащейся в указанных вариабельных областях антитела, включают вариабельные области Н-цепи антитела, которые представлены в табл. 2, или вариабельные области Н-цепи антитела, которые имеют последовательности CDR, аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 которых являются такими же, что аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в вариабельных областях Н-цепи, которые указаны в табл. 2, или вариабельные области Н-цепи антитела, которые функционально эквивалентны вышеуказанным вариабельным областям.

Таблица 2

Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:	Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:	Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:
hCE115HA	52	TR01H036	99	TR01H074	135
CE115HA177	64	TR01H037	100	TR01H075	136
CE115HA178	65	TR01H038	101	TR01H076	137
CE115HA179	66	TR01H039	102	TR01H077	138
CE115HA180	67	TR01H040	103	TR01H079	139
hCE115HAa	68	TR01H041	104	TR01H080	140
TR01H006	69	TR01H042	105	TR01H081	141
TR01H007	70	TR01H043	106	TR01H082	142
TR01H008	71	TR01H044	107	TR01H083	143
TR01H009	72	TR01H045	108	TR01H084	144
TR01H010	73	TR01H046	109	TR01H090	145
TR01H011	74	TR01H047	110	TR01H091	146
TR01H012	75	TR01H048	111	TR01H092	147
TR01H013	76	TR01H049	112	TR01H093	148
TR01H014	77	TR01H050	113	TR01H094	149
TR01H015	78	TR01H051	114	TR01H095	150
TR01H016	79	TR01H052	115	TR01H096	151
TR01H017	80	TR01H053	116	TR01H097	152
TR01H018	81	TR01H054	117	TR01H098	153
TR01H019	82	TR01H055	118	TR01H099	154
TR01H020	83	TR01H056	119	TR01H100	155
TR01H021	84	TR01H057	120	TR01H101	156
TR01H022	85	TR01H058	121	TR01H102	157
TR01H023	86	TR01H061	122	TR01H103	158
TR01H024	87	TR01H062	123	TR01H104	159
TR01H025	88	TR01H063	124	TR01H105	160
TR01H026	89	TR01H064	125	TR01H106	161
TR01H027	90	TR01H065	126	TR01H107	162
TR01H028	91	TR01H066	127	TR01H108	163
TR01H029	92	TR01H067	128	TR01H109	164
TR01H030	93	TR01H068	129	TR01H110	165
TR01H031	94	TR01H069	130	TR01H111	166
TR01H032	95	TR01H070	131	TR01H112	167
TR01H033	96	TR01H071	132	TR01H113	168
TR01H034	97	TR01H072	133	TR01H114	169
TR01H035	98	TR01H073	134	TR01H001	420
				TR01H002	421
				TR01H003	422
				TR01H004	423
				hCE115H	424
				CE115HA121	425
				CE115HA122	426
				CE115HA124	427
				CE115HA192	428
				CE115HA236	429
				CE115HA251	430
				CE115HA252	431

Взаимосвязь между аминокислотными остатками CDR-участков, образующих аминокислотную последовательность Н-цепи антитела, и EU-нумерацией Кэбота, представлена на фиг. 13.

Касательно варибельных областей L-цепи антитела, содержащихся в варибельной области антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении глипикана 3, и варибельной области антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, предлагаемых в настоящем изобретении, предпочтительно следует получать общую L-цепь, которая может придавать связывающую активность Н-цепи, которая обладает связывающей активностью в отношении глипикана 3, и связывающую активность Н-цепи, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и применять ее в качестве варибельной области общей L-цепи мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы.

Примеры варибельной области общей L-цепи, которую можно применять согласно настоящему изобретению, включают варибельные области L-цепи, указанные в табл. 3, варибельные области L-цепи антитела, которые имеют последовательности CDR, аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 которых являются такими же, что и аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащиеся в варибельных областях L-цепи антитела, указанных в табл. 3, и варибельные области L-цепи антитела, которые функционально эквивалентны вышеуказанным варибельным областям.

Таблица 3

Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:	Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:	Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:
L0000	53	L0125	264	L0214	312
L0002	217	L0126	265	L0215	313
L0003	218	L0127	266	L0216	314
L0006	219	L0129	267	L0217	315
L0007	220	L0132	268	L0218	316
L0008	221	L0134	269	L0219	317
L0009	222	L0136	270	L0220	318
L0011	223	L0137	271	L0222	319
L0012	224	L0138	272	L0223	320
L0013	225	L0139	273	L0224	321
L0014	226	L0140	274	L0226	322
L0015	227	L0141	275	L0227	323
L0016	228	L0143	276	L0228	324
L0032	229	L0144	277	L0229	325
L0038	230	L0145	278	L0230	326
L0039	231	L0147	279	L0231	327
L0041	232	L0148	280	L0232	328
L0042	233	L0149	281	L0233	329
L0043	234	L0151	282	L0234	330
L0044	235	L0152	283	L0235	331
L0045	236	L0154	284	L0236	332
L0046	237	L0155	285	L0237	333
L0047	238	L0157	286	L0238	334
L0062	239	L0160	287	L0239	335
L0063	240	L0161	288	L0240	336
L0064	241	L0163	289	L0241	337
L0065	242	L0167	290	L0242	338
L0066	243	L0168	291	L0243	339
L0069	244	L0173	292	L0246	340
L0075	245	L0175	293	L0247	341
L0079	246	L0180	294	L0248	342
L0082	247	L0181	295	L0249	343
L0085	248	L0186	296	L0250	344
L0089	249	L0187	297	L0258	345
L0090	250	L0200	298	L0259	346
L0091	251	L0201	299	L0260	347
L0093	252	L0202	300	L0261	348
L0104	253	L0203	301	L0262	349
L0106	254	L0204	302	L0263	350
L0107	255	L0205	303	L0264	351
L0109	256	L0206	304	L0265	352
L0113	257	L0207	305	L0266	353
L0115	258	L0208	306	L0267	354
L0117	259	L0209	307	L0268	355
L0120	260	L0210	308	L0269	356
L0122	261	L0211	309	L0270	357
L0123	262	L0212	310	L0271	358
L0124	263	L0213	311	L0272	359

Взаимосвязь между аминокислотными остатками CDR-участков, образующих аминокислотную последовательность L-цепи антитела, и EU-нумерацией Кэбота, представлена на фиг. 14.

В настоящем изобретении фраза "функционально эквивалентный" означает, что аффинности связывания с антигеном эквиваленты или в альтернативном варианте означает, что цитотоксическая активность в отношении экспрессирующих глипикан 3 клеток или тканей, содержащих указанные клетки, эквивалентна при применении в качестве мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Аффинность связывания и цитотоксическую активность можно измерять с помощью метода, указанного в настоящем описании. Клетки, применяемые для измерения цитотоксической активности, могут представлять собой требуемые экспрессирующие GPC3 клетки или требуемую ткань, содержащую указанные клетки, и, например, можно применять человеческие раковые линии клеток и PC-10 или NCI-H446, которые экспрессируют GPC3. Касательно константных областей антитела фраза может означать, что связывающая активность в отношении Fc γ -рецептора является эквивалентной.

Например, фраза "вариабельная область N-цепи антитела, функционально эквивалентная вариабельной области N-цепи антитела, указанной в настоящем описании (т.е. исходной вариабельной области N-цепи)", означает, что эта область имеет такую же аффинность связывания, когда ее объединяют с вариабельной областью L-цепи антитела, указанной в настоящем описании, которая образует пару с исходной N-цепью, или в альтернативном варианте означает, что область обладает такой же цитотоксической активностью в отношении экспрессирующих глипикан 3 клеток или тканей, содержащих указанные клетки, когда ее применяют для получения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Кроме того, фраза "вариабельная область L-цепи антитела, функционально эквивалентная вариабельной области L-цепи антитела, указанной в настоящем описании (т.е. исходной вариабельной области L-цепи)", означает, что эта область имеет такую же аффинность связывания, когда ее объединяют с вариабельной

областью Н-цепи антитела, указанной в настоящем описании, которая образует пару с исходной L-цепью, или в альтернативном варианте означает, что область обладает такой же цитотоксической активностью в отношении экспрессирующих глипикан 3 клеток или тканей, содержащих указанные клетки, когда ее применяют для получения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы.

Понятие "эквивалентный" не обязательно подразумевает наличие такого же уровня активности, и активность может быть повышенной. В частности, антигенсвязывающая аффинность, включает, например, случай, в котором коэффициент (величина K_D /величина K_D родительского антитела), полученный путем сравнения с аффинностью связывания варибельной области антитела, которая служит в качестве контроля (величина K_D родительского антитела) составляет 1,5 или менее. Коэффициент величина K_D /величина K_D родительского антитела предпочтительно составляет 1,3 или менее, более предпочтительно 1,2 или менее, 1,1 или менее, 1,0 или менее, 0,9 или менее, 0,8 или менее, 0,7 или менее, 0,6 или менее, или 0,5 или менее. При этом не существует нижнего предела, примеры включают коэффициенты, составляющие 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} или 10^{-6} . Более конкретно, согласно настоящему изобретению коэффициент величина K_D /величина K_D родительского антитела предпочтительно составляет от 10^{-6} до $1,5 \times 10^0$, более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-1} , еще более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-2} и еще более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-3} . Касательно цитотоксической активности, примеры включают случай, в котором коэффициент (скорость ингибирования клеточного роста/скорость ингибирования клеточного роста родительским антителом), полученный путем сравнения со скоростью ингибирования роста клетки мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, которая служит в качестве контроля (скорость ингибирования клеточного роста родительским антителом), составляет 0,7 или более. Концентрацию добавленной мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы можно определять соответствующим образом, но предпочтительно она составляет, например, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 или 1 нМ; и предпочтительно измерения осуществляют при концентрации 0,05 или 0,1 нМ. Коэффициент скорость ингибирования клеточного роста/скорость ингибирования клеточного роста родительским антителом предпочтительно составляет 0,8 или более, более предпочтительно 0,9 или более, 1,0 или более, 1,2 или более, 1,5 или более, 2 или более, 3 или более, 5 или более, 10 или более или 20 или более. При этом не существует верхнего предела, коэффициент может составлять 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 или 10^6 .

Кроме того, касательно цитотоксической активности примеры включают случай, в котором коэффициент (концентрация, вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%/концентрация родительского антитела, вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%), полученный путем сравнения с концентрацией исходной мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, вызывающей ингибирование клеточного роста на 50% (концентрация родительского антитела, вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%), составляет 1,5 или менее. Концентрация, вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%, означает концентрацию мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, необходимую для снижения скорости клеточной пролиферации наполовину по сравнению с вариантом, в котором не добавляют мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу. Коэффициент "концентрация, вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%/концентрация родительского антитела, вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%" предпочтительно составляет 1,3 или менее, более предпочтительно 1,2 или менее, 1,1 или менее, 1,0 или менее, 0,9 или менее, 0,8 или менее, 0,7 или менее, 0,6 или менее или 0,5 или менее. При этом не существует нижнего предела, примеры включают коэффициенты, составляющие 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} или 10^{-6} . В частности, коэффициент предпочтительно составляет от 10^{-6} до $1,5 \times 10^0$, более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-1} , еще более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-2} и еще более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-3} .

Касательно домена, содержащего варибельную область антитела, которая обладает GPC3-связывающей активностью, величина K_D , характеризующая связывание с GPC3 (например, человеческим GPC3) может составлять, например, 5×10^{-9} М или менее, предпочтительно 4×10^{-9} М или менее, например 3×10^{-9} М или менее, 2×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 8×10^{-10} М или менее, 5×10^{-10} М или менее, 4×10^{-10} М или менее, 3×10^{-10} М или менее, 2×10^{-10} М или менее, 1×10^{-10} М или менее, 8×10^{-11} М или менее, 5×10^{-11} М или менее, 4×10^{-11} М или менее, 3×10^{-11} М или менее, 2×10^{-11} М или менее, 1×10^{-11} М или менее, 8×10^{-12} М или менее, 5×10^{-12} М или менее, 4×10^{-12} М или менее, 3×10^{-12} М или менее, 2×10^{-12} М или менее, 1×10^{-12} М или менее, 8×10^{-13} М или менее, 5×10^{-13} М или менее, 4×10^{-13} М или менее, 3×10^{-13} М или менее, 2×10^{-13} М или менее или 1×10^{-13} М или менее.

Касательно домена, содержащего варибельную область, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, величина K_D , характеризующая связывание с человеческим комплексом Т-клеточного рецептора, такого как человеческий Т-клеточный рецептор или более конкретно, например, человеческий CD3ε может составлять, например, 2×10^{-7} М или менее, предпочтительно $1,5 \times 10^{-7}$ М или менее, например $1,4 \times 10^{-7}$ М или менее, $1,3 \times 10^{-7}$ М или менее, $1,2 \times 10^{-7}$ М или менее, 1×10^{-7} М или менее, 3×10^{-8} М или менее, 2×10^{-8} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, 8×10^{-9} М или менее, 5×10^{-9} М или менее, 4×10^{-9} М или менее, 3×10^{-9} М или менее, 2×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 8×10^{-10} М или менее, 5×10^{-10} М или менее, 4×10^{-10} М или менее, 3×10^{-10} М или менее, 2×10^{-10} М или менее, 1×10^{-10} М или менее, 8×10^{-11} М или менее, 5×10^{-11} М или менее, 4×10^{-11} М или менее, 3×10^{-11} М

или менее, 2×10^{-11} М или менее, 1×10^{-11} М или менее, 8×10^{-12} М или менее, 5×10^{-12} М или менее, 4×10^{-12} М или менее, 3×10^{-12} М или менее, 2×10^{-12} М или менее или 1×10^{-12} М или менее.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, предпочтительно имеют величины KD, характеризующая связывание с человеческим GPC3 и человеческим комплексом Т-клеточного рецептора (например, с человеческой CD3ε-цепью), которые составляют 5×10^{-9} М или менее и 2×10^{-7} М или менее соответственно и более предпочтительно 1×10^{-9} М или менее и 5×10^{-8} М или менее соответственно.

В настоящем изобретении варьируемые области антитела, которые являются "функционально эквивалентными" не ограничены конкретными областями, если они представляют собой варьируемые области Н-цепи и/или L-цепи антитела, которые удовлетворяют вышеуказанным требованиям. Примеры таких варьируемых областей антитела включают области, полученные путем интродукции замены, делеции, добавления и/или инсерции одной или нескольких аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 10 аминокислот) в аминокислотные последовательности варьируемых областей, которые представлены выше в табл. 1-3. Хорошо известный специалистам в данной области метод интродукции одной или нескольких аминокислотных замен, делеций, добавлений и/или инсерций в аминокислотную последовательность представляет собой метод интродукции мутаций в белки. Например, специалисты в данной области могут получать варьируемые области, которые являются функциональными эквивалентами варьируемых областей антитела, обладающих указанными выше функциями, путем интродукции соответствующих мутаций в аминокислотные последовательности с использованием таких методов как сайт-направленный мутагенез (Hashimoto-Gotoh T., Mizuno T., Ogasahara Y. и Nakagawa M., An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* 152, 1995, с. 271-275; Zoller M.J. и Smith M., Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* 100, 1983, с. 468-500; Kramer W., Drutsa V., Jansen H.W., Kramer B., Pflugfelder M. и Fritz H.J., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456; Kramer W. и Fritz H.J., Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA *Methods Enzymol.* 154, 1987, с. 350-367 и Kunkel T.A., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad. Sci. USA.* 82, 1985, с. 488-492).

Когда аминокислотный остаток изменяют, аминокислоту предпочтительно заменяют в результате мутации на другую(ие) аминокислоту(ы), сохраняющую(ие) характеристики боковых цепей аминокислот. Примерами аминокислот с такими характеристиками боковых цепей являются гидрофобные аминокислоты (A, I, L, M, F, P, W, Y и V), гидрофильные аминокислоты (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S и T), аминокислоты, содержащие алифатические боковые цепи (G, A, V, L, I и P), аминокислоты с содержащими гидроксильную группу боковыми цепями (S, T и Y), аминокислоты с содержащими атом серы боковыми цепями (C и M), аминокислоты с содержащими карбоновую кислоту и амид боковыми цепями (D, N, E и Q), аминокислоты с основными боковыми цепями (R, K и H) и аминокислоты с ароматическими боковыми цепями (H, F, Y и W) (в скобках представлены обозначения аминокислот в соответствии с однобуквенным кодом). Аминокислотные замены внутри каждой из указанных групп обозначают как консервативные замены. Хорошо известно, что полипептид, содержащий модифицированную аминокислотную последовательность, в которой один или несколько аминокислотных остатков в указанной аминокислотной последовательности подвергнут делеции, добавлен и/или заменен на другие аминокислоты, может сохранять исходную биологическую активность (Mark D.F. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1984, с. 5662-5666; Zoller M.J. и Smith M., *Nucleic Acids Res.* 10, 1982, с. 6487-6500; Wang A. и др., *Science* 224, 1984, с. 1431-1433; Dalbadie-McFarland G. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) 79, 1982, с. 6409-6413). Варируемые области, предлагаемые в настоящем изобретении, содержащие указанные аминокислотные модификации, имеют аминокислотные последовательности, которые идентичны по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% аминокислотным последовательностям CDR-последовательностей, FR-последовательностям варьируемой области или полным варьируемым областям до модификации. В контексте настоящего описания идентичность последовательностей определяют в виде процента остатков, идентичных остаткам в исходной аминокислотной последовательности варьируемой области Н-цепи или варьируемой области L-цепи, определенного после выравнивания последовательностей и интродукции соответствующих брешей для увеличения до максимума при необходимости идентичности последовательностей. Идентичность аминокислотных последовательностей можно определять с помощью описанного ниже метода.

Кроме того, "функционально эквивалентную варьируемую область антитела" можно получать, например, из нуклеиновых кислот, которые гибридизуются в строгих условиях с нуклеиновыми кислотами, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность варьируемой области, указанной выше в табл. 1-3. Строгие условия гибридизации, применяемые для выделения нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в строгих условиях с нуклеиновой кислотой, которая содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность варьируемой области, включают, например, следующие условия: 6 М мочевины, 0,4% ДСН,

0,5×SSC и 37°C или условия гибридизации в значительной степени эквивалентные указанным. Выделение нуклеиновых кислот с максимально высокой гомологией можно ожидать при применении более строгих условий, например следующих условий: 6 М мочевины, 0,4% ДСН, 0,1×SSC и 42°C. Условия промывки после гибридизации представляют собой, например, промывку с использованием 0,5×SSC (1×SSC представляет собой 0,15 М NaCl и 0,015 М цитрат натрия, pH 7,0) и 0,1% ДСН при 60°C, более предпочтительно промывку с использованием 0,2×SSC и 0,1% ДСН при 60°C, еще более предпочтительно промывку с использованием 0,2×SSC и 0,1% ДСН при 62°C, еще более предпочтительно промывку с использованием 0,2×SSC и 0,1% ДСН при 65°C и еще более предпочтительно промывку с использованием 0,1×SSC и 0,1% ДСН при 65°C. Последовательности выделенных нуклеиновых кислот можно определять известными методами, которые описаны ниже. Общая гомология нуклеотидной последовательности выделенной нуклеиновой кислоты составляет по меньшей мере 50% или выше, предпочтительно 70% или выше и наиболее предпочтительно 90% или выше (например, 95, 96, 97, 98, 99% или выше) при оценке степени идентичности последовательностей.

Нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в строгих условиях с нуклеиновой кислотой, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность варибельной области, можно выделять также, применяя вместо описанных выше методов на основе гибридизации, методы амплификации генов, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР), в которой используют праймеры, синтезированные на основе информации о нуклеотидной последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность варибельной области.

Идентичность одной нуклеотидной последовательности или аминокислотной последовательности можно определять с помощью алгоритма BLAST, описанного у Karlin и Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, с. 5873-5877). На основе этого алгоритма разработаны программы BLASTN и BLASTX (Altschul и др., J. Mol. Biol. 215, 1990, с. 403-410). Для анализа нуклеотидных последовательностей согласно BLASTN на основе BLAST устанавливают параметры, такие, например, как балл=100 и длина слова=12. С другой стороны, параметры, применяемые для анализа аминокислотных последовательностей с помощью BLASTX на основе BLAST, включают, например, балл=50 и длина слова=3. Задаваемые по умолчанию параметры применяют для каждой программы, когда используют программы BLAST и Gapped BLAST. В данной области известны конкретные методики указанных анализов (см. веб-сайт National Center for Biotechnology Information (NCBI), Basic Local Alignment Search Tool (BLAST); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Комбинация варибельной области антитела, обладающей связывающей активностью в отношении глипикана 3, и варибельной области антитела, обладающей связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, входящая в мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении, не ограничена конкретной комбинацией, если она обладает указанными выше видами активности. Однако согласно настоящему изобретению цитотоксическая активность мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы предпочтительно эквивалентна или выше, чем активность биспецифического антитела GPC3_ERY22_rCE115, описанного в примере 3. В контексте настоящего описания понятие "эквивалентный" необязательно подразумевает такую же степень указанной выше активности, и активность может быть более высокой. Молекула является эквивалентной GPC3_ERY22_rCE115, например, когда коэффициент (скорость ингибирования клеточного роста/скорость ингибирования клеточного роста (GPC3_ERY22_rCE115)) относительно скорости ингибирования клеточного роста GPC3_ERY22_rCE115 (скорость ингибирования клеточного роста (GPC3_ERY22_rCE115)) составляет 0,7 или более, предпочтительно 0,8 или более, 0,9 или более, 1,0 или более, 1,2 или более, 1,5 или более, 2 или более, 3 или более, 5 или более, 10 или более или 20 или более. В то время как не существует верхнего предела, показатель может составлять, например, 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ или 10⁶. Концентрацию добавленной мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы можно определять соответствующим образом, но предпочтительно она составляет, например 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 или 1 нМ; и предпочтительно измерения осуществляют при концентрации 0,05 или 0,1 нМ.

Кроме того, примеры включают вариант, когда коэффициент "концентрация, вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%/концентрация (GPC3_ERY22_rCE115), вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%", полученный путем сравнения с концентрацией (GPC3_ERY22_rCE115), которая вызывает ингибирование клеточного роста на 50% (концентрация (GPC3_ERY22_rCE115), вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%), составляет 1,5 или менее. Коэффициент "концентрация, вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%/концентрация (GPC3_ERY22_rCE115), вызывающая ингибирование клеточного роста на 50%" предпочтительно составляет 1,3 или менее, более предпочтительно 1,2 или менее, 1,1 или менее, 1,0 или менее, 0,9 или менее, 0,8 или менее, 0,7 или менее, 0,6 или менее или 0,5 или менее. При этом не существует нижнего предела, примеры включают коэффициенты, составляющие 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ или 10⁻⁶. В частности, коэффициент предпочтительно составляет от 10⁻⁶ до 1,5×10⁻⁰, более предпочтительно от 10⁻⁶ до 10⁻¹, еще более предпочтительно от 10⁻⁶ до 10⁻² и еще более предпочтительно от 10⁻⁶ до 10⁻³.

Предпочтительные конкретные величины K_D, характеризующие связывание с человеческим GPC3 и

комплексом человеческого Т-клеточного рецептора (например, с человеческой CD3ε-цепью) также соответствуют указанным выше. Можно применять соответствующие экспрессирующие GPC3 клетки или соответствующую ткань, содержащую указанные клетки, и, например, можно применять человеческие раковые линии клеток PC-10 или NCI-H446, которые экспрессируют GPC3.

Примеры указанной комбинации вариательной области антитела, обладающей связывающей активностью в отношении глипикана 3, и вариательной области антитела, обладающей связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, включают комбинации вариательных областей Н-цепи антитела, которые представлены в табл. 4, комбинации вариательных областей Н-цепи антитела, которые имеют последовательности CDR, аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 которых являются такими же, что и аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, которые входят в вариательные области Н-цепи антитела, представленные в табл. 4, и комбинации вариательных областей Н-цепи антитела, функционально эквивалентные указанным вариательным областям. В контексте настоящего описания понятие "функционально эквивалентные" имеет значение, указанное выше.

Таблица 4

Плечо GPC3/плечо комплекса Т-клеточного рецептора	SEQ ID NO:
H0000/hCE115HA	40/52
H0000/CE115HA251	40/500
H0000/CE115HA236	40/429
H0000/TR01H002	40/421
H0000/CE115HA122	40/426
H0610/rCE115H	215/424
H0610/TR01H040	215/103
H0610/TR01H061	215/122
H0610/TR01H068	215/129
H0610/TR01H071	215/132
GCH054/TR01H067	197/128
GCH094/TR01H082	211/142
GCH094/TR01H084	211/144
GCH065/TR01H084	206/144
GCH065/TR01H082	206/142
GCH094/TR01H109	211/164
GCH065/TR01H109	206/164
GCH094/TR01H113	211/168
GCH065/TR01H113	206/168

Предпочтительная общая L-цепь для таких комбинаций вариательной области антитела, обладающей связывающей активностью в отношении глипикана 3, и вариательной области антитела, обладающей связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, включает, например, L0000, L0011, L0201, L0203, L0204, L0206, L0208, L0209, L0211, L0212, L0222 и общую L-цепь, которая имеет последовательности CDR (аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3), идентичные аминокислотным последовательностям CDR1, CDR2 и CDR3, указанным выше для общей L-цепи. Конкретные комбинации включают, например, комбинации вариательных областей Н-цепи антитела и общей L-цепи, которые представлены в табл. 5, комбинации вариательных областей антитела, которые имеют последовательности CDR (аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3), идентичные аминокислотным последовательностям CDR1, CDR2 и CDR3, которые входят в вариательные области общей L-цепи, представленные в табл. 5, и комбинации вариательных областей Н-цепи антитела и общей L-цепи, функционально эквивалентные указанным вариательным областям. В контексте настоящего описания понятие "функционально эквивалентные" имеет значение, указанное выше.

Таблица 5

Плецо GPC3/плецо комплекса Т-клеточного рецептора/обшая L-цепь	SEQ ID NO:
H0610/rCE115H/L0000	215/424/53
H0610/TR01H040/L0000	215/103/53
H0610/TR01H040/L0201	215/103/299
H0610/TR01H040/L0203	215/103/301
H0610/TR01H040/L0204	215/103/302
H0610/TR01H040/L0206	215/103/304
H0610/TR01H040/L0208	215/103/306
H0610/TR01H040/L0209	215/103/307
H0610/TR01H040/L0211	215/103/309
H0610/TR01H061/L0000	215/122/53
H0610/TR01H068/L0000	215/129/53
H0610/TR01H071/L0000	215/132/53
GCH054/TR01H067/L0201	197/128/299
GCH054/TR01H067/L0212	197/128/310
GCH054/TR01H067/L0222	197/128/319
GCH054/TR01H067/L0000	197/128/53
GCH094/TR01H082/L0201	211/142/299
GCH094/TR01H082/L0011	211/142/223
GCH094/TR01H084/L0011	211/144/223
GCH065/TR01H084/L0011	206/144/223
GCH065/TR01H082/L0011	206/142/223
GCH094/TR01H109/L0011	211/164/223
GCH065/TR01H109/L0011	206/164/223
GCH094/TR01H113/L0011	211/168/223
GCH065/TR01H113/L0011	206/168/223

Не накладываются конкретные ограничения на Fc-область, входящую в мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, если она представляет собой Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора, но примеры предпочтительной Fc-области, предлагаемой в настоящем изобретении, включают комбинацию участка Fc-области E22Nh и участка Fc-области E22Nk, комбинацию участка Fc-области E2702GsKsc и участка Fc-области E2704sEpsc и комбинацию участка Fc-области E2702sKsc и участка Fc-области E2704sEpsc.

Примеры предпочтительной мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, включают биспецифические антитела, которые содержат варибельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3, и варибельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении CD3ε. Более предпочтительно цитотоксическая активность является такой же или превышает активность биспецифического антитела GPC3_ERY22_rCE115. Примеры указанных биспецифических антител включают биспецифические антитела, содержащие Н- и L-цепи, указанные в табл. 13, и биспецифические антитела, которые связываются с эпитопом, перекрывающимся с эпитопом, связывающимся с указанными выше антителами, и которые содержат Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fcγ-рецептора.

Распознает ли антитело эпитоп, который перекрывается с эпитопом, распознаваемым другим антителом, можно определять на основе конкуренции между двумя антителами за эпитоп. Конкуренцию между антителами можно оценивать с помощью анализов связывания в условиях конкуренции, таких как твердофазный иммуоферментный анализ (ELISA), метод на основе флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) и метод на основе технологии флуорометрического микрообъемного анализа (FMAT (зарегистрированный товарный знак)). Количество антитела, связанного с антигеном, косвенно коррелирует со связывающей способностью конкурирующего антитела-кандидата (тестируемое антитело), которое конкурентно связывается с перекрывающимся эпитопом. Другими словами, если количество или аффинность тестируемого антитела к перекрывающемуся эпитопу возрастает, то количество антитела, связанного с антигеном, снижается, а количество антигена, связанного тестируемым антителом, возрастает. В частности, соответствующим образом меченое антитело и антитело, подлежащее изучению, добавляют одновременно к антигену, и антитело, которое в результате связывается, обнаруживают с помощью метки. Количество связанного с антигеном антитела легко можно определять с помощью предварительно меченого антитела. Указанная метка не ограничена конкретной меткой и метод мечения выбирают в зависимости от применяемой методики анализа. В частности метод мечения включает введение флуоресцентной метки, радиоактивной метки, ферментной метки и т.п.

Например, флуоресцентно меченое антитело и немеченое антитело или тестируемое антитело одновременно добавляют к гранулам, на которых иммобилизован GPC3 или CD3ε, и меченое антитело выявляют с помощью технологии флуорометрического микрообъемного анализа.

В контексте настоящего описания "антитело, которое связывается с перекрывающимся эпитопом" означает тестируемое антитело, которое может снижать количество связанного меченого антитела по меньшей мере на 50% в концентрации, которая, как правило, выше в 100 раз, предпочтительно выше в 80 раз, более предпочтительно выше в 50 раз, еще более предпочтительно выше в 30 раз и еще более предпочтительно выше в 10 раз концентрации, в которой немеченое антитело снижает на 50% количество связанного меченого антитела (IC₅₀).

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые имеют антигенсвязывающие сайты антитела, связывающиеся с эпитопами, которые перекрываются с эпитопами, связывающимися вышеуказанными антителами, могут обладать очень высокой цитотоксической активностью.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, получают с помощью такой же технологии, которая описана выше в качестве метода получения рекомбинантных антител.

Настоящее изобретение относится также к полинуклеотидам, кодирующим антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, и их можно встраивать в требуемые экспрессионные векторы. Приемлемые клетки-хозяева можно трансформировать экспрессионными векторами с получением клеток, которые экспрессируют антигенсвязывающие молекулы. Антигенсвязывающие молекулы, кодируемые полинуклеотидами, можно получать путем культивирования клеток, которые экспрессируют антигенсвязывающие молекулы, и сбора продуктов экспрессии из супернатантов культуры. Таким образом, настоящее изобретение относится к векторам, которые содержат полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении, клеткам, которые несут указанный вектор, и к способам получения антигенсвязывающих молекул, которые заключаются в том, что культивируют клетки и собирают антигенсвязывающие молекулы из супернатантов культуры. Их можно получать с помощью таких же технологий, которые описаны выше для получения рекомбинантных антител.

Фармацевтические композиции.

Другим объектом настоящего изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие в качестве действующего вещества мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая содержит: (1) домен, содержащий переменную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3, (2) домен, содержащий переменную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и (3) домен, содержащий Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fc γ -рецептора. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые индуцируют повреждение клеток, содержащим в качестве действующего вещества антигенсвязывающую молекулу. Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, которые индуцируют требуемое повреждение клеток, прежде всего зависимую от Т-клеток клеточную цитотоксичность, предпочтительно вводят индивидууму, который страдает заболеванием, при котором необходимы указанные виды активности для предупреждения или лечения, или индивидууму, у которого возможен рецидив заболевания.

Кроме того, согласно настоящему изобретению индуцирующие цитотоксичность агенты и ингибирующие рост клеток агенты, и противораковые агенты, которые содержат в качестве действующего вещества мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая содержит:

(1) домен, содержащий переменную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3,

(2) домен, содержащий переменную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и

(3) домен, содержащий Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fc γ -рецептора, можно применять в способе индукции повреждения клеток, который заключается в том, что содержит стадию, на которой вводят индивидууму антигенсвязывающую молекулу, или можно применять антигенсвязывающую молекулу для приготовления индуцирующего цитотоксичность агента и ингибирующего роста клеток агента.

В настоящем изобретении фраза "содержит в качестве действующего вещества мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая содержит:

(1) домен, содержащий переменную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3,

(2) домен, содержащий переменную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, и

(3) домен, содержащий Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fc γ -рецептора" означает, что композиция содержит антигенсвязывающую молекулу в качестве основного действующего вещества; однако не имеется конкретных ограничений на относительное содержание антигенсвязывающей молекулы.

При необходимости мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно капсулировать в микрокапсулы (микрокапсулы, изготовленные из гидроксиметилцеллюлозы, желатина, поли(метилметакрилата) и т.п.), и можно включать в компоненты коллоидных систем, предназначенных для введения лекарственных веществ (липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) (например, см. "Remington's Pharmaceutical Science 16-ое изд.", под ред. Oslo, 1980)). Кроме того, хорошо известны методы приготовления агентов в виде средств с замедленным высвобождением, и их можно применять для мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в настоящем изобретении (J. Biomed. Mater. Res. 15, 1981, с. 267-277; Chemtech. 12, 1982, с. 98-105; US № 3773719; опубликованные европейские патенты (EP) EP 58481 и EP

133988; Biopolymers 22, 1983, с. 547-556).

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, или индуцирующие цитотоксичность агенты и ингибирующие рост клеток агенты можно вводить пациенту орально или парентерально, и предпочтительным является парентеральное введение. Указанные примеры методов введения включают инъекцию, введение в нос, транспульмонарное введение и чрескожное введение. Примеры введения путем инъекции включают, например, внутривенную инъекцию, внутримышечную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию и подкожную инъекцию. Фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, или индуцирующий цитотоксичность агент и ингибирующий рост клеток агент можно применять местно или системно путем инъекции. Метод введения можно выбирать в зависимости от возраста пациента и симптомов. Дозу можно выбирать, например, из следующего диапазона: от 0,0001 до 1000 мг на 1 кг веса тела на каждое введение. Альтернативно этому, дозу можно выбирать, например, из следующего диапазона: от 0,001 до 100000 мг/пациента. Однако дозы фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, или индуцирующей цитотоксичность агента и ингибирующей рост клеток агента не ограничены указанными дозами.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, или индуцирующие цитотоксичность агенты и ингибирующие рост клеток агенты можно приготавливать с помощью общепринятых методов (например, см. Remington's Pharmaceutical Science, последнее изд., изд-во Mark Publishing Company, Easton, U.S.A.), и они могут содержать также фармацевтически приемлемые носители и добавки. Их примерами являются (но не ограничиваясь только ими) поверхностно-активные вещества, эксципиенты, красители, ароматизаторы, консерванты, стабилизаторы, буферы, суспендирующие агенты, придающие изотоничность агенты, связующие вещества, разрыхлители, замасливатели, повышающие текучесть агенты и корригенты и можно применять другие общепринятые носители. Конкретными примерами носителей являются легкая безводная кремниевая кислота, лактоза, кристаллическая целлюлоза, маннит, крахмал, кармеллоза кальция, кармеллоза натрия, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, поливинилацетальдиэтиламиноацетат, поливинилпирролидон, желатин, триглицерид со средней длиной цепи, полиоксиэтиленированное гидрогенизированное касторовое масло 60, сахараза, карбоксиметилцеллюлоза, кукурузный крахмал, неорганическая соль и т.п.

В настоящем изобретении предложены также способы повреждения экспрессирующих в качестве антигена глипикан 3 клеток или опухолевых тканей, содержащих экспрессирующие антиген клетки, или способы подавления роста указанных клеток или опухолевых тканей путем приведения в контакт клеток, экспрессирующих в качестве антигена глипикан 3, с мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, предлагаемой в настоящем изобретении, которая связывается с антигеном. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая связывается с антигеном, описана выше в качестве антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, которая связывается с антигеном, которая содержится в индуцирующих цитотоксичность агентах и ингибирующих рост клеток агентах, предлагаемых в настоящем изобретении. Клетки, с которыми связывается мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, которая связывается с антигеном, не ограничены конкретными клетками, если эти клетки экспрессируют антиген.

Согласно настоящему изобретению "приведение в контакт" можно осуществлять, например, добавляя мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении, которая связывается с антигеном, в культуральную среду экспрессирующих антиген GPC3 клеток, которые культивируют *in vitro*. В этом случае добавляемую антигенсвязывающую молекулу можно применять в пригодной для этой цели форме, такой как раствор или твердое вещество, полученное путем лиофилизации, или т.п. При добавлении в виде водного раствора он может представлять собой водный раствор, который содержит только мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении, или может представлять собой также раствор, содержащий, например, указанные выше поверхностно-активные вещества, эксципиенты, красители, ароматизаторы, консерванты, стабилизаторы, буферы, суспендирующие агенты, придающие изотоничность агенты, связующие вещества, разрыхлители, замасливатели, повышающие текучесть агенты и корригенты. На концентрацию добавляемой молекулы не накладывается специальных ограничений; однако конечная концентрация в культуральной среде предпочтительно составляет от 1 пг/мл до 1 г/мл, более предпочтительно от 1 нг/мл до 1 мг/мл и еще более предпочтительно от 1 мкг/мл до 1 мг/мл.

Кроме того, согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения "приведение в контакт" осуществляют также путем обработки животных кроме человека, в организм которых трансплантированы экспрессирующие антиген GPC3 клетки, и животных, у которых эндогенно происходит экспрессия антигена. Метод введения может быть оральным или парентеральным, и предпочтительным является парентеральное введение. Указанные примеры методов введения включают инъекцию, введение в нос, транспульмонарное введение и чрескожное введение. Примеры введения путем инъекции включают, например, внутривенную инъекцию, внутримышечную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию и подкожную инъекцию. Фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, или индуцирующий цитотоксичность агент и ингибирующий рост клеток агент можно применять местно или системно, например, путем инъекции. Метод введения можно выбирать в зависимости от возраста под-

опытного животного и симптомов. При введении в виде водного раствора можно применять водный раствор, содержащий только мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении, или можно применять раствор, содержащий также указанные выше поверхностно-активные вещества, эксципиенты, красители, ароматизаторы, консерванты, стабилизаторы, буферы, суспендирующие агенты, придающие изотоничность агенты, связующие вещества, разрыхлители, замасливатели, повышающие текучесть агенты и корригенты и т.п. Дозу можно выбирать из следующего диапазона: от 0,0001 до 1000 мг на 1 кг веса тела на одно введение.

Альтернативно этому, дозу можно выбирать, например, из следующего диапазона: от 0,001 до 100000 мг/пациента. Однако вводимое количество мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, не ограничено указанными дозами.

Описанный ниже метод предпочтительно используют в качестве метода оценки или измерения повреждения клетки, индуцированного в клетках, экспрессирующих в качестве антигена глипикан 3, который связывается доменом, который несет вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью в отношении глипикана 3, который входит в антигенсвязывающую молекулу, что является результатом контактирования клеток с мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой, предлагаемой в настоящем изобретении. Примеры метода оценки или измерения цитотоксической активности *in vitro* включает методы измерения активности цитотоксических Т-клеток или т.п. Обладает ли мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, Т-клеточной цитотоксичностью, можно определять с помощью известных методов (см., например, Current protocols in Immunology, глава 7. Immunologic studies in humans, под ред. John E. Coligan и др., изд-во John Wiley & Sons, Inc., 1993). При измерении активности антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с антигеном, отличным от глипикана 3, представляющим собой антиген, который не экспрессируется в клетках, применяемых для оценки, можно использовать в качестве контроля, который анализируют таким же образом, что и мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении, и активность можно определять, оценивая, обладает ли мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, более выраженной цитотоксической активностью, чем применяемая в качестве контроля антигенсвязывающая молекула.

Для оценки или измерения цитотоксической активности *in vivo*, например, клетки, экспрессирующие в качестве антигена глипикан 3, внутрикожно или подкожно трансплантируют подопытному животному кроме человека, а затем тестируемую антигенсвязывающую молекулу вводят внутривенно или внутрибрюшинно каждый день или с интервалами в несколько дней, начиная со дня трансплантации или на следующий после него день. Цитотоксическую активность можно определять путем ежедневного измерения размера опухолей, определяя различие в изменении размера опухолей. Аналогично методу, применяемому для оценки *in vitro*, можно считать, что антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, обладает цитотоксической активностью, если при введении контрольной антигенсвязывающей молекулы обнаружено, что размер опухолей в группе, которой вводили антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении, существенно меньшей, чем размер опухолей в группе, которой вводили контрольную антигенсвязывающую молекулу.

В качестве метода оценки или измерения подавляющего действия на пролиферацию клеток, экспрессирующих в качестве антигена глипикан 3, можно применять метод измерения поглощения меченого изотопом тимидина клетками или МТТ-метод. В качестве метода оценки или измерения подавляющего действия на пролиферацию клеток *in vivo*, можно применять метод, аналогичный описанному выше для оценки или измерения цитотоксической активности *in vivo*.

В настоящем изобретении предложены также наборы, которые можно применять в способах, предлагаемых в настоящем изобретении, которые содержат мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении, или мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, созданную способом получения, предлагаемым в настоящем изобретении. Альтернативно этому, наборы могут быть упакованы вместе с дополнительным фармацевтически приемлемым носителем, растворителем и инструкциями с описанием метода применения.

Настоящее изобретение относится также к мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле, предлагаемой в настоящем изобретении, или мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле, полученной способом, предлагаемым в настоящем изобретении, для применения в способе, предлагаемом в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение относится также к молекулам, обладающим GPC3-связывающей активностью, которые содержат домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает GPC3-связывающей активностью, мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении. Кроме того, настоящее изобретение относится к молекуле, которая обладает GPC3-связывающей активностью, которая содержит вариабельные области Н- и L-цепей антитела соответственно, содержащие три CDR Н- и L-цепей (всего шесть CDR), которые входят в молекулу. Настоящее изобретение относится также к молекулам, обладающим связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, которые содержат домен, содержащий вариабельную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора,

мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении. Кроме того, настоящее изобретение относится к молекуле, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, которая содержит переменные области Н- и L-цепей антитела соответственно, содержащие три CDR Н- и L-цепей (всего шесть CDR), которые входят в молекулу. Указанные молекулы могут представлять собой антитела или полипептиды, содержащие антигенсвязывающие фрагменты антитела. Настоящее изобретение относится также к антителам, которые связываются с эпитопами, перекрывающимися или конкурирующими с указанными молекулами или полипептидами, которые содержат их антигенсвязывающие фрагменты. Приемлемыми примерами таких полипептидов, которые содержат антигенсвязывающие фрагменты антитела, являются scFv, одноцепочечное антитело, Fv, одноцепочечный Fv₂ (scFv₂), Fab и F(ab')₂. Кроме того, указанные молекулы необязательно должны быть мультиспецифическими (биспецифическими), а могут связываться только либо с GPC3, либо с комплексом Т-клеточного рецептора (например, CD3ε-цепью).

Указанные молекулы включают молекулу, которая содержит домен, содержащий переменную область антитела, которая обладает GPC3-связывающей активностью, мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, подробное описание которой представлено в разделе "Примеры" в настоящем описании (которая содержит переменные области Н-цепи, обладающие GPC3-связывающей активностью и переменную область общей L-цепи), молекулу, которая содержит домен, содержащий переменную область антитела, которая обладает связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора, мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, подробное описание которой представлено в разделе "Примеры" в настоящем описании (которая содержит переменные области Н-цепи, обладающие связывающей активностью в отношении комплекса Т-клеточного рецептора и переменную область общей L-цепи), а также молекулу, обладающую способностью связываться с таким же антигенным белком (GPC3 или комплекс Т-клеточного рецептора), которая содержит три CDR каждой из Н- и L-цепей (всего шесть CDR), которые входят в указанную выше молекулу.

Указанные молекулы имеют CDR, которые являются одинаковыми (общими) с CDR мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении; и поэтому ожидается, что они будут связываться с эпитопом, перекрывающимся с эпитопом мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении. Таким образом, указанные молекулы могут конкурировать с мультиспецифическими антигенсвязывающими молекулами, предлагаемыми в настоящем изобретении, при их совместном присутствии с мультиспецифическими антигенсвязывающими молекулами, предлагаемыми в настоящем изобретении. Таким образом, эти молекулы можно применять, например, в качестве регуляторных агентов для подавления различных видов активности (таких как антигенсвязывающая активность, цитотоксическая активность и противоопухолевая активность) мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в настоящем изобретении. Кроме того, указанная молекула может быть предварительно связана с белком-мишенью (GPC3 или комплекс Т-клеточного рецептора), и после добавления мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, можно выявлять молекулы, диссоциирующие в результате конкуренции. При таком применении молекула пригодна в качестве агента, предназначенного для оценки связывания мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, с белком-мишенью. Согласно настоящему изобретению молекулы можно метить соответствующими флуоресцентными субстанциями или т.п. Альтернативному этому, указанные молекулы можно применять для скрининга новых антител, которые связываются с эпитопами, перекрывающимися с эпитопами, которые связываются мультиспецифическими антигенсвязывающими молекулами, предлагаемыми в настоящем изобретении. Как указано выше, указанную молекулу можно предварительно связывать с белком-мишенью (GPC3 или комплекс Т-клеточного рецептора), а затем добавлять тестируемое антитело, при этом, если имеет место диссоциация связанных молекул, то тестируемое антитело является перспективным (кандидатом) в качестве антитела, которое связывается с эпитопом, перекрывающимся с эпитопом, с которым связывается мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении. Это позволяет осуществлять эффективный скрининг новых мультиспецифических антигенсвязывающих молекул.

Приведенные в настоящем описании в качестве примеров комбинации в виде комбинаций каждого CDR мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в настоящем изобретении, можно применять непосредственно в качестве конкретных комбинаций CDR переменных областей Н-цепи и L-цепи этих молекул. Аффинность к антигену этих молекул (величины K_D) предпочтительно характеризуется величинами, приведенными в качестве примера K_D мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, но не ограничена этими величинами.

Настоящее изобретение относится также к нуклеиновым кислотам, кодирующим эти молекулы, векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, клеткам, содержащим нуклеиновые кислоты или векторы, способам получения молекул путем культивирования клеток и молекулам, полученным с помощью этих способов.

Все процитированные в настоящем описании документы, характеризующие известный уровень техники, включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Примеры

Ниже настоящее изобретение описано со ссылкой на конкретные примеры, которые не ограничивают объем изобретения.

Пример 1. Получение GPC3 ERY22 rCE115 и измерение цитотоксической активности.

(1-1) Получение GPC3 ERY22 rCE115.

Молекулу, в которой один из Fab заменяли на домен, связывающий CD3 эпсилон, получали, используя IgG против ракового антигена (GPC3) в качестве основной структуры. В этом случае Fc-область IgG, которую применяли в качестве основной структуры, представляла собой молчащую Fc с ослабленной аффинностью к FcγR (Fcγ- (Fc-гамма) рецептор). Антитело к GPC3 H0000 (SEQ ID NO: 40)/GL4 (SEQ ID NO: 41) применяли в качестве GPC3-связывающего домена. Антитело к CD3 rCE115H/rCE115L (SEQ ID NO: 42/SEQ ID NO: 43) применяли в качестве CD3-связывающего домена.

Конструкцию G1d, полученную удалением Gly и Lys на C-конце IgG1, применяли в качестве константной области H-цепи антитела и ее применяли в комбинации с H0000/GL4 и rCE115H/rCE115L. Когда константную область H-цепи антитела обозначали как H1, последовательность, соответствующую H-цепи антитела, несущую H0000 в варибельной области, обозначали как H0000-H1. В настоящем описании аминокислотное изменение обозначали, например, как D356K. Первый алфавитный символ (соответствует D в D356K) представляет собой однобуквенный код аминокислотного остатка до модификации, следующий за ним номер (соответствует 356 в D356K) обозначает положение модификации согласно EU-нумерации, а последний алфавитный символ (соответствует K в D356K) представляет собой однобуквенный код аминокислотного остатка после модификации. G1dh (SEQ ID NO: 44), полученную путем удаления Gly и Lys на C-конце IgG1, ERY22_Hk (SEQ ID NO: 45), созданную путем интродукции мутаций L234A/L235A/Y349C/T366W в G1dh, а ERY22_Hh (SEQ ID NO: 46), созданную путем интродукции мутаций L234A/L235A/D356C/T366S/L368A/Y407V в G1dh, получали согласно методу, описанному в приведенном для справки примере 1. Мутации L234A и L235A интродуцировали в соответствующие H-цепи для ослабления аффинности к FcγR (Fcγ-рецептор), а мутации Y349C/T366W и D356C/T366S/L368A/Y407V интродуцировали для эффективного образования гетеромеров каждой H-цепи при получении гетеродимерных антител, содержащих два типа H-цепей.

Гетеродимерное антитело GPC3_ERY22_rCE115, полученной заменой VH-и VL-доменов Fab против GPC3, создавали согласно методу, описанному в приведенном для справки примере 1 (фиг. 1a).

Серии экспрессионных векторов со встроенным полинуклеотидом, кодирующим каждую из конструкций GL4-ERY22_Hk (SEQ ID NO: 47), H0000-ERY22L (SEQ ID NO: 48), rCE115H-ERY22_Hh (SEQ ID NO: 49) и rCE115L-k0 (SEQ ID NO: 50), получали с помощью методов, хорошо известных специалистам в данной области, таких как методы на основе ПЦП с использованием добавленных праймеров, которые имели соответствующие последовательности, аналогичные применяемым в описанном выше методе.

Следующую комбинацию экспрессионных векторов интродуцировали в клетки FreeStyle 293-F для кратковременной экспрессии каждой молекулы-мишени.

Молекула-мишень: GPC3_ERY22_rCE115.

Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, встроенными в экспрессионные векторы: GL4-ERY22_Hk, H0000-ERY22L, rCE115H-ERY22_Hh, rCE115L-k0.

(1-2) Очистка GPC3 ERY22 rCE115.

Полученный супернатант культуры добавляли в колонку с антителом к FLAG M2 (фирма Sigma) и затем колонку промывали, после чего элюировали, используя пептид FLAG (фирма Sigma) в концентрации 0,1 мг/мл. Фракции, содержащие представляющую интерес молекулу, добавляли в колонку HisTrap HP (фирма GE Healthcare), а затем колонку промывали, после чего элюировали с использованием концентрационного градиента имидазола. Фракцию, содержащую представляющую интерес молекулу, концентрировали с использованием метода ультрафильтрации и затем концентрат вносили в колонку, заполненную Супердекс 200 (фирма GE Healthcare), и каждую из очищенных представляющих интерес молекул собирали только в виде мономерных фракций из элюированного раствора.

(1-3) Измерение цитотоксической активности GPC3_ERY22_rCE115 с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

Оценивали *in vitro* цитотоксическую активность GPC3_ERY22_rCE115.

(1-3-1) Получение раствора мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC).

Получали образцы по 50 мл периферической крови здоровых добровольцев (взрослых) с использованием шприцев, предварительно заполненных 100 мкл (1000 ед./мл) раствора гепарина (Novo-Heparin 5000 ед. на инъекцию; фирма Novo Nordisk). Эту периферическую кровь двукратно разводили 3ФП(-), разделяли на четыре аликвоты и добавляли в пробирки для разделения лимфоцитов Leucoser (каталожный № 227290; фирма Greiner bio-one), в которые предварительно вносили 15 мл фиколл-пак PLUS и центрифугировали. После центрифугирования пробирок для разделения (2150 об/мин, 10 мин, комнатная температура) собирали фракции мононуклеарных клеток. Клетки во фракции мононуклеарных клеток однократно промывали с использованием модифицированной по методу Дульбекко среды Игла (фирма SIGMA), содержащей 10% FBS (далее в контексте настоящего описания обозначена как 10%FBS/D-

MEM), а затем плотность клеток доводили до 4×10^6 клеток/мл с помощью 10% FBS/D-MEM. Полученную таким образом клеточную суспензию применяли в качестве раствора человеческих РВМС в последующих экспериментах.

(1-3-2) Анализ цитотоксической активности.

Цитотоксическую активность оценивали на основе степени ингибирования клеточного роста с помощью анализатора клеток в реальном времени xCELLigence (фирма Roche Diagnostics). Применяемые клетки-мишени представляли собой клеточную линию рака человека NCI-H446 или клеточную линию рака человека PC-10, экспрессирующую GPC3. Клетки NCI-H446 или PC-10 отделяли от чашек и высевали в планшет E-Plate 96 (фирма Roche Diagnostics) в виде аликвот 100 мкл/лунку, регулируя их количество на уровне 1×10^4 , и начинали анализ жизнеспособных клеток с помощью анализатора клеток в реальном времени xCELLigence. На следующий день планшет удаляли из анализатора клеток в реальном времени xCELLigence и в планшет добавляли по 50 мкл каждого соответствующего полученного антитела в различных концентрациях (0,004, 0,04, 0,4 и 4нМ). После осуществления реакции в течение 15 мин при комнатной температуре добавляли 50 мкл раствора человеческих РВМС (2×10^5 клеток/лунку), полученного согласно методу, описанному в разделе (1-2) и клетки вновь помещали в анализатор клеток в реальном времени xCELLigence и начинали анализ жизнеспособных клеток. Реакцию проводили в атмосфере 5% газообразного диоксида азота при 37°C и степень ингибирования роста клеток (%) определяли с помощью приведенной ниже формулы с использованием величины клеточного индекса, определенной через 72 ч после добавления человеческих РВМС. Принимаемую для расчета величины клеточного индекса стандарттизовали таким образом, что величину клеточного индекса, определенную непосредственно перед добавлением антитела, принимали за 1.

$$\text{Степень ингибирования роста клеток (\%)} = (A-B) \times 100/(A-1)$$

А обозначает среднюю величину клеточного индекса в лунках без добавления антитела (только клетки-мишени и человеческие РВМС), а В обозначает среднюю величину клеточного индекса в каждой лунке. Измерение осуществляли в трех повторностях.

Когда моноклеарные клетки периферической крови (РВМС), полученные из человеческой крови, применяли в качестве эффекторных клеток для анализа цитотоксичности GPC3_ERY22_rCE115, обнаружена очень сильная активность (фиг. 2).

Пример 2. Гуманизация Н-цепи антитела к CD3, rCE115 и "совместное использование" общей L-цепи.

(2-1) Создание hCE115HA, гуманизированной вариабельной области Н-цепи антитела rCE115.

Гуманизировали вариабельную область Н-цепи антитела rCE115 к CD3 (SEQ ID NO: 42). CDR и FR определяли по Кэботу (нумерация Кэбота).

Сначала выбирали последовательность человеческого FR путем сравнения последовательностей вариабельных областей человеческих антител в базе данных с крысиной последовательностью вариабельной области rCE115. В качестве базы данных применяли базу данных IMGТ (<http://www.imgt.org/>) и NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Гуманизированную последовательность вариабельной области Н-цепи создавали, сшивая последовательность CDR вариабельной области Н-цепи rCE115 с выбранной последовательностью человеческого FR. Таким путем получали гуманизированную последовательность вариабельной области Н-цепи, hCE115HL (SEQ ID NO: 51).

Аминокислотный остаток в положении 93 согласно нумерации Кэбота представляет собой Ala в выбранной последовательности человеческого FR3 Н-цепи, но представляет собой Arg в последовательности вариабельной области rCE115. При использовании базы данных последовательностей крысиных и человеческих зародышевых линий (база данных IMGТ (<http://www.imgt.org/>)) обнаружено лишь несколько последовательностей, которые содержат в этом сайте Arg. Известно, что аминокислотный остаток в положении 94 согласно нумерации Кэбота принимает участие в стабилизации структуры антитела путем образования верхнего ядра (Ewert и др., Methods 34(2) октябрь 2004 г., с. 184-199). На основе указанной информации создавали новую последовательность гуманизированной вариабельной области Н-цепи, в которой аминокислотные остатки в положениях по Кэботу 93 и 94 в FR3 Н-цепи заменяли на остатки, присутствующие в последовательности вариабельной области rCE115. Таким путем получали гуманизированную последовательность вариабельной области Н-цепи hCE115HA (SEQ ID NO: 52).

(2-2) Создание общей L-цепи L0000 для антитела к CD3 rCE115 и антитела к GPC3.

Осуществляли перестановку FR/CDR вариабельной области L-цепи rCE115L (SEQ ID NO: 43) антитела к CD3 rCE115 и вариабельной области L-цепи GL4 (SEQ ID NO: 41) антитела к GPC3.

Выбирали последовательность FR GL4 в качестве последовательности FR L-цепи. CDR2 L-цепи был одинаковым в rCE115L и GL4. CDR1 L-цепи выбирали из последовательностей CDR GL4, а CDR3 L-цепи выбирали из последовательностей CDR rCE115L соответственно. Кроме того, вновь создавали CDR3 L-цепи путем замены аминокислотного остатка Asp в положении 94 по Кэботу выбранного CDR3 L-цепи на остаток Val, присутствующий в GL4.

Гуманизированную последовательность вариабельной области L-цепи создавали, сшивая отобранные FR и CDR, описанные выше. В результате получали гуманизированную последовательность вариабельной области L-цепи.

бельной области L-цепи, L0000 (SEQ ID NO: 53).

(2-3) Оценка аффинности к человеческому GPC3.

Оценивали связывающую активность в отношении человеческого GPC3 при применении GL4 (SEQ ID NO: 41) и L0000 (SEQ ID NO: 53) в качестве переменных областей L-цепей. Для осуществления этого применяли молекулярную форму антитела с одним плечом, несущего один Fab, гетеродимеризованный в Fc-области человеческого IgG1 с помощью технологии "knobs-into-hole". H0000 (SEQ ID NO: 40) применяли в качестве переменной области H-цепи антитела к GPC3.

Константы аффинности и связывания антитела к GPC3 в отношении антигена измеряли с помощью метода многоциклической кинетики на основе поверхностного плазмонного резонанса с использованием устройства Biacore™-T200 (фирма GE Healthcare Japan). В качестве подвижного буфера применяли HBS-EP+ (фирма GE Healthcare Japan) и набор для аминного сочетания (фирма GE Healthcare Japan) применяли для ковалентного связывания белка A/G с CM5-чипом (чип, покрытый карбоксиметилдекстраном). Каждое антитело к GPC3 приготавливали таким образом, чтобы примерно 100 RU "захватывалось" белком A/G. Человеческий GPC3, применяемый в качестве анализата, приготавливали в концентрации 8, 16, 32, 64 и 128 нМ, используя HBS-EP+. При осуществлении измерений сначала давали белку A/G связываться с раствором антитела, а затем инъецировали раствор человеческого GPC3 со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 3 мин, давая пройти реакции. Затем раствор заменяли на буфер HBS-EP+ и осуществляли оценку фазы диссоциации в течение 15 мин. После завершения оценки фазы диссоциации сенсорный чип регенерировали, промывая 10 mM Gly-HCl при pH 1,5. Аналогично осуществляли измерение при концентрации 0, давая белку A/G осуществлять "захват" в растворе антитела, осуществляя инъекцию HBS-EP+ в течение 3 мин, давая пройти реакции, и затем заменяя раствор на HBS-EP+ для оценки фазы диссоциации в течение 15 мин. После завершения оценки фазы диссоциации сенсорный чип регенерировали, промывая 10 mM Gly-HCl при pH 1,5. Для анализа данных применяли только программу для Biacore-анализа, программу Biacore T200 Evaluation, версия 1.0 применяли для осуществления кинетического анализа для расчета константы скорости реакции связывания (k_a), константы скорости реакции диссоциации (k_d) и соотношения констант скорости на основе полученных сенсограмм. Результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6

Переменная область		Аффинность в отношении человеческого CD3		
Переменная область H-цепи	Переменная область L-цепи	KD (M)	ka (1/Mc)	kd (1/c)
H0000	GL4	$4,2 \times 10^{-9}$	$4,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-3}$
H0000	L0000	$3,6 \times 10^{-8}$	$3,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-2}$

(2-4) Оценка аффинности к человеческому CD3.

Оценивали связывающую активность в отношении человеческого CD3 при применении hCE115HA (SEQ ID NO: 52) в качестве переменной области H-цепи и L0000 (SEQ ID NO: 53) в качестве переменной области L-цепи. Для осуществления этого применяли молекулярную форму антитела с одним плечом, несущего один Fab, гетеродимеризованный в Fc-области человеческого IgG1 с помощью технологии "knobs-into-hole".

Константы аффинности и связывания антитела к CD3 в отношении антигена измеряли с помощью метода одноциклической кинетики на основе поверхностного плазмонного резонанса с использованием устройства Biacore™-T200 (фирма GE Healthcare Japan). В качестве подвижного буфера применяли HBS-EP+ (фирма GE Healthcare Japan) и набор для аминного сочетания (фирма GE Healthcare Japan) применяли для ковалентного связывания человеческого CD3 с CM5-чипом (чип, покрытый карбоксиметилдекстраном). Антитело к CD3, применяемое в качестве анализата, приготавливали в концентрациях 5 и 20 мкг/мл, используя HBS-EP+. Измерения осуществляли путем первой инъекции каждого из растворов антитела к CD3 в концентрациях 5 и 20 мкг/мл в течение 3 мин при скорости потока 20 мкл/мин, давая пройти реакции. Затем раствор заменяли на HBS-EP+ и осуществляли оценку фазы диссоциации в течение 3 мин. После завершения оценки фазы диссоциации сенсорный чип регенерировали, промывая 10 mM Gly-HCl при pH 1,5. Для анализа данных применяли только программу для Biacore-анализа, программу Biacore T200 Evaluation, версия 1.0 применяли для осуществления кинетического анализа для расчета константы скорости реакции связывания (k_a), константы скорости реакции диссоциации (k_d) и соотношения констант скорости на основе полученных сенсограмм. Результаты представлены в табл. 7.

Таблица 7

Переменная область		Аффинность в отношении человеческого CD3		
Переменная область H-цепи	Переменная область L-цепи	KD (M)	ka (1/Mc)	kd (1/c)
hCE115H	hCE115L	$1,0 \times 10^7$	$5,9 \times 10^4$	$6,0 \times 10^{-3}$
hCE115HA	L0000	$1,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^5$	$2,3 \times 10^{-2}$

(2-5) Получение GPC3 ERY27 hCE115.

IgG4 к раковому антигену (GPC3) применяли в качестве основной структуры для получения молекулы ERY27 (фиг. 16), в которой переменную область H-цепи одного из Fab заменяли на домен, связы-

вающий CD3 эpsilon, а L-цепь была общей для обоих Fab. В этом случае Fc IgG4, которую применяли в качестве основной структуры, представляла собой молчащую Fc с ослабленной аффинностью к FcγR (Fcγ- (Fc-гамма) рецептор). H0000 (SEQ ID NO: 40) применяли в качестве вариательной области H-цепи GPC3-связывающего домена, а hCE115HA (SEQ ID NO: 52) применяли в качестве вариательной области H-цепи CD3-связывающего домена. L0000 (SEQ ID NO: 53) применяли в качестве вариательной области L-цепи. Мутации D356K и K439E интродуцировали в соответствующие H-цепи для эффективного образования гетеромеров каждой H-цепи при получении гетеродимерных антител, содержащих два типа H-цепей (WO 2006/106905). H435R представляет собой модификацию, которая нарушает связывание с белком A, и ее интродуцировали для эффективного разделения гетеромера и гомомера (WO 2011/078332).

Серии экспрессионных векторов со встроенным полинуклеотидом, кодирующим каждую из конструкций f H0000-ERY27HK (SEQ ID NO: 54), hCE115HA-ERY27_HE (SEQ ID NO: 55) и L0000-k0 (SEQ ID NO: 56), получали хорошо известными методами.

Следующую комбинацию экспрессионных векторов интродуцировали в клетки FreeStyle 293-F для кратковременной экспрессии каждой молекулы-мишени.

Молекула-мишень: GPC3_ERY27_hCE115.

Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, встроенными в экспрессионные векторы: H0000-ERY27HK, hCE115HA-ERY27HE и L0000-k0

(2-6) Очистка GPC3 ERY27 hCE115.

Каждую представляющую интерес молекулу очищали методом, описанным в примере 1-2.

(2-7) Измерение цитотоксической активности с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека.

(2-7-1) Получение раствора мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC).

Раствор приготавливали согласно методу, описанному в примере 1-3-1.

(2-7-2) Оценка цитотоксической активности.

Цитотоксическую активность оценивали согласно методу, описанному в примере 1-3-2.

Когда PBMC, полученные из человеческой крови, применяли в качестве эффекторных клеток для оценки цитотоксичности GPC3_ERY27_hCE115, было обнаружено снижение активности в результате гуманизации H-цепи rCE115 и "совместного использования" общей L-цепи (фиг. 2).

Пример 3. Получение и оценка гуманизированных вариантов биспецифических антител для улучшения различных свойств.

Зависимая от T-клеток цитотоксическую активность (TDCC-активность) биспецифического гуманизированного антитела к CD3-цепи (CD3 эpsilon) и к GPC3, полученного согласно методу, описанному в примере 2, GPC3_ERY27_hCE115 (SEQ ID NO: 54, 55 и 56), оказалась ниже, чем зависимая от T-клеток цитотоксическая активность GPC3_ERY22_rCE115 (SEQ ID NO: 47, 48, 49 и 50). Это может являться результатом ослабления аффинности к GPC3 и CD3ε-цепи в результате гуманизации и "совместного использования" общей L-цепи. Касательно антигенов, таких как GPC3 и CD3ε-цепи, которые имеют независимые друг от друга последовательности, к настоящему времени отсутствуют данные о гуманизированных биспецифических антителах с повышенной зависимой от T-клеток цитотоксической активностью и улучшенной аффинностью к обоим антигенам при использовании общей L-цепи антитела. Таким образом, представляется сложным получение гуманизированных антител с двойной специфичностью, обладающих эффективностью в качестве лекарственных средств, эквивалентной или более высокой, чем у антитела GPC3_ERY22_rCE115.

С учетом указанных обстоятельств при создании изобретения получали модифицированные гуманизированные биспецифические антитела с модифицированной аффинностью к человеческому GPC3 и человеческой CD3ε-цепи с помощью методов, известных специалистам в данной области, которые включали обширную замену аминокислотных остатков, кодируемых геном антитела, с получением вариантов антител против обоих антигенов, а именно человеческого GPC3 и человеческой CD3ε-цепи, осуществление различных оценок с помощью скрининга. Кроме того, аналогичные методы применяли для получения модифицированных гуманизированных биспецифических антител с модифицированными физико-химическими свойствами. Кроме того, путем объединения замен аминокислотных остатков, обладающих эффективностью в отношении модификации аффинности и физико-химических свойств, получали оптимизированные биспецифические антитела с TDCC-активностью, эквивалентной или более высокой, чем зависимая от T-клеток клеточная цитотоксичность GPC3_ERY22_rCE115 до гуманизации.

Интродукцию точечных мутаций, экспрессию и очистку антител, оценку аффинности к антигену и определение зависимой от T-клеток клеточной цитотоксичности при оптимизации гуманизированных биспецифических антител осуществляли согласно методам, аналогичным описанным в примерах 1 и 2. CDR и FR определяли согласно Кэботу (нумерация Кэбота).

В зависимости от цели следующие конструкции применяли в качестве константных областей H-цепи антитела (номера соответствуют EU-нумерации): E22Hh (SEQ ID NO: 57), которую получали путем интродукции мутаций L234A/L235A/N97A/D356C/T366S/L368A/Y407V/G446-делеция/K447-делеция в человеческий IgG1; E22Hk (SEQ ID NO: 58), которую получали путем интродукции мутаций

L234A/L235A/N97A/Y349C/T366W/G446-делеция/K447-делеция, и инсерционной мутации Ser-Ser непосредственно перед положением 118 в человеческом IgG1; G1dh получали путем интродукции мутаций D356C/T366S/L368A/Y407V/G446-делеция/K447-делеция в человеческий IgG1; none-Hi-Kn010G3 получали путем интродукции делеции 118-215 и мутаций C220S/Y349C/T366W/H435R в человеческий IgG1; E2702GsKsc (SEQ ID NO: 60) получали путем интродукции мутаций L235R/S239K/N297A/E356K/R409K/H435R/L445P/G446-делеция/K447-делеция в человеческий IgG4; E2704sEpsc (SEQ ID NO: 61) получали путем интродукции мутаций K196Q/L235R/S239K/N297A/R409K/K439E/I445P/G446-делеция/K447-делеция в человеческий IgG4; и E2702sKsc (SEQ ID NO: 62) получали путем интродукции мутаций L235R/S239K/N297A/E356K/R409K/L445P/G446-делеция/K447-делеция в человеческий IgG4. Кроме того, человеческую к-цепь (каппа-цепь) k0 (SEQ ID NO: 63) и E22L (SEQ ID NO: 432) получали путем интродукции мутаций R108A/T109S в человеческую к-цепь, применяемую в качестве константных областей L-цепи антитела.

Мутация, приводящая к замене Asp на Cys в положении 356 согласно EU-нумерации, мутация, приводящая к замене The на Ser в положении 366 согласно EU-нумерации, мутация, приводящая к замене Leu на Ala в положении 368 согласно EU-нумерации, мутация, приводящая к заменам Tug на Val в положении 407 согласно EU-нумерации, мутация, приводящая к замене Tug на Cys в положении 349 согласно EU-нумерации, мутация, приводящая к замене Thr на Trp в положении 366 согласно EU-нумерации, и мутация, приводящая к вставке Ser-Ser непосредственно перед положением 118 согласно EU-нумерации, представляют собой мутации, предназначенные для эффективного образования гетеродимерных молекул каждой H-цепи при создании гетеромерных антител. Аналогично этому, мутация, приводящая к замене Glu на Lys в положении 356 согласно EU-нумерации, и мутация, приводящая к замене Lys на Glu в положении 439 согласно EU-нумерации, также представляют собой мутации, предназначенные для эффективного образования гетеродимерных молекул каждой H-цепи при создании гетеромерных антител. Как ожидается, они должны повышать эффективность производства биспецифических антител.

Мутация, приводящая к замене Leu на Ala в положение 234 согласно EU-нумерации, мутация, приводящая к заменам Leu на Ala или Arg в положение 235 согласно EU-нумерации, мутация, приводящая к замене Ser на Lys в положение 239 согласно EU-нумерации, и мутация, приводящая к замене Asn на Ala в положение 297 согласно EU-нумерации, представляют собой мутации, предназначенные для ослабления аффинности к Fc γ -рецептору и комплементу (C1q). Как ожидается, они должны подавлять связывание Fab с CD3 и опосредуемое Fc перекрестное сшивание Fc γ -рецептора или комплемента и позволять избегать синдрома высвобождения цитокинов, который сопровождает повышение неспецифических эффекторных функций.

H-цепь, в которую интродуцированы делеционные мутации в положениях 118-215 согласно EU-нумерации, можно объединять с полноразмерной последовательностью H-цепи с получением антитела, которое имеет только один Fab (одновалентное антитело), и ее можно применять для оценки аффинности.

Мутация, приводящая к замене Arg на Lys в положении 409 согласно EU-нумерации, и мутация, приводящая к замене His на Arg в положении 435 согласно EU-нумерации, представляют собой мутации, приводящие к модификации свойства антитела, приближая их к свойствам человеческого IgG1 и человеческого IgG3 соответственно.

(3-1) Модификация аффинности гуманизованного антитела к CD3 с помощью точечных мутаций.

Сначала интродуцировали точечные мутации в последовательность FR1, FR2, FR3, CDR1, CDR2 и CDR3 гуманизованного антитела к человеческой CD3 ϵ -цепи, полученного согласно методу, описанному в примере 2, hCE115HA-ERY27HE (SEQ ID NO: 55), для получения модифицированных антител. Затем определяли аффинность указанных модифицированных антител к растворимой человеческой CD3 ϵ -цепи. Объединяя сайты, которые обладают способностью повышать аффинность модифицированных антител, получали модифицированные антитела, аффинности которых представлены в табл. 8.

Таблица 8

Название антитела	KD (человеческий CD3)
CE115H1A-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0000-k0	1,43E-07
TR01H083-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0212-k0	5,36E-11
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0240-k0	2,17E-09
TR01H002-E22Htn/GLS3108-k0/GL4-E22HK/H0810-E22L	2,04E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0212-k0	2,17E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0235-k0	2,81E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0238-k0	2,91E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/TR01L016-k0	2,52E-09
TR01H083-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0262-k0	2,45E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0207-k0	2,60E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0241-k0	3,48E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0242-k0	3,58E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0206-k0	2,90E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/TR01L019-k0	3,20E-09
TR01H080-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0300-k0	3,25E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0211-k0	3,22E-09
TR01H002-E22Htn/Hi-Kn010G3/GLC3108-k0	4,61E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0209-k0	4,25E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0208-k0	4,16E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0224-k0	5,06E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0236-k0	5,64E-09
TR01H083-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0201-k0	4,42E-09
TR01H084-E2702GskSchone-Hi-E2704sEAL0011-k0	4,14E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0210-k0	5,06E-09
TR01H114-E2702GskSchone-Hi-E2704sEAL0011-k0	4,22E-09
CE115HA236-E22Htn/GLS3108-k0/GL4-E22HK/H0810-E22L	8,08E-09
TR01H077-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0200-k0	6,12E-09
TR01H071-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0200-k0	6,13E-09
TR01H111-E2702GskSchone-Hi-E2704sEAL0011-k0	4,91E-09
TR01H081-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0262-k0	5,76E-09
TR01H001-E22Htn/Hi-Kn010G3/LC3108-k0	8,22E-09
CE115HA179-G1dn/Hi-Kn010G3/L0000-k0	8,35E-09
TR01H112-E2702GskSchone-Hi-E2704sEAL0011-k0	5,12E-09
TR01H113-E2702GskSchone-Hi-E2704sEAL0011-k0	5,14E-09
TR01H082-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0212-k0	4,75E-09
CE115HA236-E22Htn/Hi-Kn010G3/GLC3108-k0	9,10E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0231-k0	7,75E-09
TR01H037-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0300-k0	6,93E-09
CE115HA252-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0000-k0	9,48E-09
TR01H083-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0311-k0	6,70E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0223-k0	8,15E-09
TR01H083-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0300-k0	6,83E-09
TR01H071-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0300-k0	8,85E-09
TR01H067-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0212-k0	5,88E-09
CE115HA178-G1dn/Hi-Kn010G3/L0000-k0	1,09E-08
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0237-k0	1,02E-08
TR01H083-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0222-k0	9,42E-09
TR01H064-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0262-k0	8,51E-09
TR01H071-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0215-k0	9,51E-09
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0218-k0	6,20E-09
TR01H081-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0201-k0	9,46E-09
TR01H071-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0222-k0	1,04E-08
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0220-k0	9,15E-09
TR01H087-E22Htn/Hi-Kn010G3/TR01L018-k0	1,09E-08
TR01H002-E22Htn/GLS3108-k0/GL4-E22HK/H0300-E22L	4,78E-09
TR01H067-E22Htn/Hi-Kn010G3/TR01L019-k0	1,21E-08
TR01H038-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0300-k0	1,24E-08
TR01H081-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0200-k0	1,27E-08
TR01H082-E2702GskSchone-Hi-E2704sEAL0011-k0	1,01E-08
CE115HA180-G1dn/Hi-Kn010G3/L0000-k0	1,68E-08
CE115HA251-E22Htn/L0000-k0/GL4-E22HK/H0610-E22L	1,37E-08
TR01H100-E2702GskSchone-Hi-E2704sEAL0011-k0	1,11E-08
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0228-k0	1,60E-08
TR01H081-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0011-k0	1,35E-08
TR01H081-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0215-k0	1,54E-08
TR01H110-E2702GskSchone-Hi-E2704sEAL0011-k0	1,26E-08
TR01H043-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0300-k0	1,52E-08
TR01H081-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0300-k0	1,56E-08
CE115HA251-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0000-k0	2,23E-08
TR01H091-E2702GskSchone-Hi-E2704sEAL0011-k0	1,39E-08
CE115HA236-E22Htn/GLS3108-k0/GL4-E22HK/H0000-E22L	8,95E-09
TR01H084-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0201-k0	1,65E-08
TR01H072-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0300-k0	2,03E-08
TR01H099-E2702GskSchone-Hi-E2704sEAL0011-k0	1,46E-08
TR01H081-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0222-k0	1,88E-08
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0239-k0	2,31E-08
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0262-k0	1,81E-08
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0234-k0	2,40E-08
TR01H012-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0300-k0	7,94E-09
TR01H061-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0300-k0	1,71E-08
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0243-k0	2,46E-08
TR01H109-E2702GskSchone-Hi-E2704sEAL0011-k0	1,64E-08
TR01H047-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0300-k0	2,04E-08
TR01H082-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0267-k0	2,29E-08
TR01H082-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0266-k0	2,29E-08
TR01H084-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0011-k0	1,98E-08
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0250-k0	2,15E-08
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0204-k0	2,21E-08
TR01H084-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0300-k0	2,13E-08
TR01H040-E22Htn/Hi-Kn010G3/L0213-k0	2,01E-08

hCE115HA-E22Hln/4-Kn010G3/L0000-k0	1.43E-07
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0214-k0	2.02E-08
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0217-k0	2.07E-08
TR01H071-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0226-k0	2.51E-08
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0200-k0	2.67E-08
TR01H074-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.91E-08
TR01H039-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.61E-08
CE115HA177-G1dn/Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.55E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0201-k0	2.81E-06
TR01H082-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0263-k0	3.09E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.60E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0216-k0	2.53E-06
TR01H051-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.91E-06
TR01H003-E22Hln/Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.03E-06
TR01H082-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0264-k0	3.44E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0232-k0	3.88E-06
TR01H041-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.16E-06
CE115HA122-E22Hln/Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.28E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0233-k0	4.01E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0215-k0	3.37E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0203-k0	3.24E-06
TR01H015-E2202Gskc/GCH018-E27048Epsg/L0000-k0	2.96E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/TR01L008-k0	2.93E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0205-k0	3.42E-06
TR01H015-E22HlnL0000-k0/GL4-E22Hln/H0810-E22L	3.57E-06
TR01H064-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.07E-06
TR01H044-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.52E-06
TR01H082-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0262-k0	3.98E-06
TR01H062-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.13E-06
CE115HA251-E22HlnL0000-k0/GL4-E22Hln/H0000-E22L	1.48E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0311-k0	3.46E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0222-k0	4.65E-06
CE115HA192-E22Hln/Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.05E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/TR01L010-k0	3.28E-06
TR01H025-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.66E-06
TR01H082-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/TR01L023-k0	4.25E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/TR01L015-k0	3.95E-06
TR01H055-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.88E-06
TR01H082-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0260-k0	4.53E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/TR01L009-k0	3.56E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/TR01L011-k0	3.57E-06
TR01H017-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.50E-06
CE115HA122-E22HlnL0000-k0/GL4-E22Hln/H0000-E22L	1.69E-06
TR01H078-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.78E-06
TR01H082-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0258-k0	4.70E-06
TR01H046-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.23E-06
rCE115H-G1dn/Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.76E-06
TR01H082-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/TR01L024-k0	4.76E-06
TR01H016-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.69E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/TR01L018-k0	4.51E-06
TR01H084-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0271-k0	2.78E-06
TR01H084-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0270-k0	2.78E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000v1-k0	4.69E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0219-k0	3.94E-06
TR01H014-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.67E-06
TR01H061-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0226-k0	4.71E-06
TR01H048-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.52E-06
TR01H082-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0259-k0	5.07E-06
TR01H028-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.80E-06
TR01H082-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0201-k0	4.49E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/TR01L013-k0	4.15E-06
TR01H033-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.88E-06
hCE115HA-G1dn/Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.50E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/TR01L012-k0	4.22E-06
TR01H065-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.31E-06
TR01H078-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.05E-06
TR01H042-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.48E-06
TR01H063-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.35E-06
TR01H084-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0272-k0	3.10E-06
CE115HA121-E22Hln/Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.78E-06
TR01H026-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.12E-06
TR01H067-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0262-k0	4.92E-06
TR01H073-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.97E-06
TR01H045-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.22E-06
TR01H007-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.17E-06
TR01H082-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0203-k0	4.07E-06
TR01H032-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.73E-06
TR01H006-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	2.30E-06
TR01H013-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.94E-06
TR01H050-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.76E-06
TR01H067-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0200-k0	6.03E-06
TR01H019-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.13E-06
hCE115HA-E22HlnL0000-k0/GL4-E22Hln/H0000-E22L	6.16E-06
hCE115HA-E22Hln/none-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.17E-06
TR01H069-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	7.11E-06
TR01H015-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/TR01L003-k0	6.34E-06
TR01H040-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0202-k0	6.19E-06
TR01H067-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0201-k0	5.93E-06
TR01H020-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.48E-06
TR01H082-E22Hlnnone-Hi-Kn010G3/L0011-k0	5.95E-06

hCE115HA-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	1.43E-07
TR01H082-E22Hh/none-Hi-Kn010G3/TR01L018-k0	4.72E-08
TR01H015-E22Hh/none-Hi-Kn010G3/TR01L006-k0	6.59E-08
TR01H052-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	6.27E-08
TR01H036-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	6.50E-08
TR01H067-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0203-k0	4.79E-08
TR01H030-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	6.54E-08
TR01H015-E22Hh/none-Hi-Kn010G3/TR01L001-k0	6.56E-08
TR01H100-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	6.25E-08
TR01H029-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	6.70E-08
TR01H019-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	6.65E-08
TR01H082-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	7.37E-08
TR01H018-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	6.93E-08
TR01H027-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	6.96E-08
TR01H049-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	6.79E-08
TR01H066-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	6.02E-08
TR01H091-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	6.67E-08
rCE115H-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	8.00E-08
TR01H015-E22Hh/none-Hi-Kn010G3/TR01L002-k0	7.14E-08
TR01H040-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0226-k0	8.01E-08
TR01H067-E22Hh/none-Hi-Kn010G3/TR01L018-k0	5.26E-08
TR01H039-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	6.60E-08
TR01H067-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0215-k0	7.41E-08
TR01H015-E22Hh/none-Hi-Kn010G3/TR01L004-k0	7.54E-08
TR01H105-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	6.91E-08
TR01H050-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	6.95E-08
TR01H106-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	6.96E-08
TR01H094-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	7.00E-08
TR01H108-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	7.06E-08
TR01H056-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	7.32E-08
TR01H031-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	7.55E-08
TR01H022-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	7.58E-08
TR01H052-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	7.21E-08
TR01H057-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	7.15E-08
TR01H057-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	7.18E-08
TR01H040-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0248-k0	7.89E-08
TR01H009-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	3.15E-08
TR01H023-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	7.94E-08
TR01H096-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	7.47E-08
TR01H040-E22Hh/none-Hi-Kn010G3/TR01L007-k0	6.82E-08
TR01H054-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	7.79E-08
TR01H021-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	8.06E-08
TR01H103-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	7.72E-08
TR01H099-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	7.74E-08
rCE115H-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000k1-k0	8.52E-08
TR01H101-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	7.67E-08
TR01H053-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	8.23E-08
TR01H035-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	8.49E-08
TR01H067-E22Hh/none-Hi-Kn010G3/TR01L015-k0	8.64E-08
TR01H104-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	8.26E-08
TR01H076-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	9.88E-08
TR01H040-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0227-k0	1.01E-07
TR01H102-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	8.54E-08
TR01H034-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	9.11E-08
TR01H082-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0222-k0	1.01E-07
rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/4-E22Hh/H0000-E22L	9.37E-08
TR01H015-E22Hh/none-Hi-Kn010G3/TR01L006-k0	9.30E-08
TR01H040-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0248-k0	9.28E-08
TR01H097-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	8.76E-08
TR01H011-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	3.71E-08
TR01H010-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	3.73E-08
TR01H095-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	9.08E-08
TR01H082-E22Hh/none-Hi-Kn010G3/TR01L020-k0	1.06E-07
TR01H098-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	9.14E-08
TR01H082-E22Hh/none-Hi-Kn010G3/TR01L017-k0	1.09E-07
TR01H040-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0247-k0	1.00E-07
rCE115H-E22Hh/none-Hi-Kn010G3/rCE115L-k0	1.24E-07
TR01H004-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	1.35E-07
TR01H067-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0222-k0	7.63E-08
rCE115H-E22Hh/none-Hi-Kn010G3/rCE115L-k0	1.38E-07
TR01H008-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	4.22E-08
TR01H070-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	1.20E-07
TR01H106-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	1.00E-07
TR01H024-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	1.08E-07
CE115HA124-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	1.43E-07
TR01H040-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0248-k0	1.11E-07
TR01H082-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0271-k0	6.82E-08
TR01H057-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	1.12E-07
TR01H058-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	1.15E-07
TR01H068-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	1.01E-07
TR01H082-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0270-k0	7.42E-08
TR01H082-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0272-k0	7.44E-08
hCE115HA-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	1.24E-07
TR01H082-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0268-k0	1.36E-07
rCE115HA-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	1.06E-07
TR01H067-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0226-k0	1.32E-07
TR01H067-E22Hh/none-Hi-Kn010G3L0248-k0	1.39E-07

(3-2) Модификация аффинности гуманизированного антитела к GPC3 с помощью точечных мутаций.

Сначала интродуцировали точечные мутации в последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 биспецифического антитела, полученного согласно методу, описанному в примере 2, H0000-ERY27HK (SEQ ID NO: 54), для получения модифицированных антител. Затем определяли аффинность указанных модифицированных антител к растворимому человеческому GPC3. Объединяя сайты, которые обладают способностью повышать аффинность модифицированных антител, получали модифицированные антитела, аффинности которых представлены в табл. 9.

Таблица 9

Название антитела	KD (человеческий GPC3)
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0000-k0	3.97E-09
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0222-k0	1.40E-13
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0259-k0	3.52E-13
GCH054-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0262-k0	5.25E-13
GCH060-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0222-k0	6.42E-13
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0246-k0	1.21E-12
GCH057-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0222-k0	1.86E-12
GCH054-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0249-k0	3.61E-12
GCH055-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0222-k0	3.90E-12
GCH094-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0246-k0	4.12E-12
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0249-k0	6.86E-12
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3/TR01L017-k0	8.27E-12
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0265-k0	8.70E-12
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0261-k0	1.07E-11
GCH065-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0262-k0	1.18E-11
GCH056-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0262-k0	1.19E-11
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0269-k0	1.69E-11
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3/TR01L020-k0	2.24E-11
GCH054-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0245-k0	3.15E-11
GCH054-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0222-k0	3.15E-11
GCH073-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0201-k0	3.50E-11
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0249-k0	5.55E-11
GCH065-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0201-k0	7.74E-11
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0225-k0	9.30E-11
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0093-k0	1.06E-10
GCH098-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0201-k0	1.11E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0267-k0	1.79E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0228-k0	2.02E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0262-k0	2.11E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0265-k0	2.13E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0264-k0	2.19E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0224-k0	2.43E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0167-k0	2.11E-10
CE115HA251-E22HhL0000-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L	2.36E-10
TR01H015-E22HhL0000-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L	2.63E-10
CE115HA236-E22HhLGLS3108-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L	2.67E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0259-k0	3.34E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0227-k0	4.08E-10
GCH065-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0272-k0	3.93E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0269-k0	4.59E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0223-k0	4.75E-10
TR01H092-E22HhLGLS3108-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L	4.75E-10
GCH054-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0212-k0	5.17E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0209-k0	5.30E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0263-k0	5.64E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0231-k0	5.89E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0143-k0	5.73E-10
GCH055-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0212-k0	6.14E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0211-k0	6.47E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0238-k0	6.37E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0214-k0	6.57E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0243-k0	6.49E-10
GCH025-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0204-k0	6.70E-10
GCH054-G1dh/none-Hi-Kn010G3/TR01L016-k0	7.83E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0169-k0	6.99E-10
GCH094-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0271-k0	6.92E-10
GCH054-G1dh/none-Hi-Kn010G3/TR01L019-k0	8.71E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0234-k0	7.78E-10
GCH098-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	8.02E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0204-k0	7.27E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0240-k0	8.48E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0239-k0	8.74E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0212-k0	9.94E-10
GCH065-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	8.84E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0203-k0	1.04E-09
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0124-k0	9.72E-10
GCH073-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0011-k0	9.10E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3/TR01L016-k0	1.08E-09
GCH054-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0201-k0	1.08E-09
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0090-k0	1.12E-09
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0209-k0	1.12E-09
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0201-k0	1.13E-09
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0161-k0	9.73E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0209-k0	8.65E-10
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0185-k0	1.06E-09
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3/TR01L019-k0	1.15E-09
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0085-k0	1.17E-09
GCH055-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0200-k0	1.13E-09
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0154-k0	1.01E-09
H0610-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0229-k0	1.20E-09
GCH054-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0209-k0	1.18E-09
GCH094-G1dh/none-Hi-Kn010G3L0201-k0	1.17E-09

H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L000-k0	3.97E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0205-k0	1.01E-09
GCH099-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0201-k0	1.29E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0242-k0	1.19E-09
GCH056-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0201-k0	1.16E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0213-k0	1.25E-09
GCH060-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0200-k0	1.34E-09
GCH065-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0030-k0	1.41E-09
GCH100-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0201-k0	1.37E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0015-k0	1.31E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0151-k0	1.25E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0237-k0	1.31E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0220-k0	1.36E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0155-k0	1.28E-09
GCH055-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0215-k0	1.52E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0202-k0	1.22E-09
GCH056-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0215-k0	1.59E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0012-k0	1.55E-09
GCH054-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0215-k0	1.62E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0215-k0	1.64E-09
GCH088-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0000-k0	1.77E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0125-k0	1.71E-09
GCH057-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0215-k0	1.83E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0217-k0	1.79E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0014-k0	1.82E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0216-k0	1.86E-09
TR01H015-E2702GsKso/GCH019-E2704eEpsc/L0000-k0	1.64E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/TR01L015-k0	2.16E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/TR01L018-k0	2.17E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0218-k0	1.99E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0000-k1-k0	2.16E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0160-k0	2.12E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0047-k0	2.23E-09
GCH073-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0000-k0	2.00E-09
GCH054-G1d/none-Hi-Kr010G3/TR01L015-k0	2.45E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0219-k0	2.28E-09
GCH094-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0272-k0	2.10E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0149-k0	2.16E-09
GCH054-G1d/none-Hi-Kr010G3/TR01L018-k0	2.59E-09
GCH054-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0203-k0	2.48E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0122-k0	2.42E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0134-k0	2.53E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0152-k0	2.36E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0203-k0	2.11E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0075-k0	2.85E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0038-k0	2.75E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0011-k0	2.76E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0157-k0	2.60E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0145-k0	2.66E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/TR01L010-k0	2.92E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0009-k0	2.99E-09
GCH099-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0011-k0	2.78E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0006-k0	3.04E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0173-k0	2.83E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0127-k0	3.12E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0082-k0	3.43E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0064-k0	3.37E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0008-k0	3.30E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0013-k0	3.35E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0140-k0	3.38E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0039-k0	3.41E-09
GCH043-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0000-k0	3.74E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/TR01L008-k0	3.48E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0148-k0	3.28E-09
GCH062-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0000-k0	3.73E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0163-k0	3.38E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0233-k0	3.55E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0230-k0	4.00E-09
GCH006-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0000-k0	4.06E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0032-k0	3.72E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0181-k0	3.51E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/TR01L009-k0	3.81E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0141-k0	3.86E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0079-k0	4.23E-09
GCH094-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0270-k0	3.60E-09
GCH066-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0000-k0	4.29E-09
GCH064-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0000-k0	4.14E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0066-k0	4.20E-09
GCH027-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0000-k0	3.83E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0003-k0	4.01E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/L0042-k0	4.27E-09
H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3/TR01L011-k0	4.02E-09

H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	3.97E-09
GCH015-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.14E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0175-k0	3.84E-09
GCH100-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0011-k0	3.81E-09
GCH014-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.20E-09
GCH053-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.05E-09
HCE115HA-E22Hn/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L	4.28E-09
GCH094-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0011-k0	3.88E-09
GCH045-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.63E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/TR01L012-k0	4.25E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0115-k0	4.34E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0044-k0	4.57E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0107-k0	4.38E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0007-k0	4.39E-09
GCH013-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.44E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0045-k0	4.66E-09
GCH010-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.12E-09
GCH040-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.80E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0002-k0	4.43E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0016-k0	4.44E-09
GCH007-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.93E-09
GCH042-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.89E-09
rCE115H-E22Hh/CE115L-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L	4.57E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0120-k0	4.54E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0065-k0	4.79E-09
GCH016-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.59E-09
GCH035-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.94E-09
GCH039-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.95E-09
GCH069-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.24E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0041-k0	4.85E-09
GCH019-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.38E-09
GCH029-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.01E-09
GCH056-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0011-k0	4.31E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0147-k0	4.38E-09
GCH034-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.09E-09
GCH003-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.20E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0139-k0	4.78E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0089-k0	5.24E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0113-k0	4.82E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0180-k0	4.48E-09
GCH005-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.32E-09
GCH067-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.24E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0187-k0	4.92E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0043-k0	5.14E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0117-k0	4.92E-09
GCH061-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.13E-09
GCH022-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.92E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0091-k0	5.43E-09
GCH023-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	4.94E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0062-k0	5.28E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0136-k0	5.04E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/TR01L0003-k0	5.08E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0069-k0	5.32E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0123-k0	5.08E-09
GCH025-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.05E-09
GCH100-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.39E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0046-k0	5.45E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0144-k0	4.84E-09
GCH026-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.17E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0138-k0	5.24E-09
GCH056-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.03E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0129-k0	5.28E-09
GCH032-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.74E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/TR01L0005-k0	5.37E-09
GCH012-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.40E-09
GCH055-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.60E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0104-k0	5.90E-09
GCH059-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.70E-09
GCH054-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.30E-09
GCH008-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.55E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0232-k0	5.38E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0126-k0	5.62E-09
GCH094-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.89E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0132-k0	5.65E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0106-k0	5.69E-09
GCH054-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0011-k0	5.25E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0109-k0	5.70E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0063-k0	6.03E-09
GCH068-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	6.23E-09
GCH057-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0000-k0	5.61E-09
H0810-G1dHnone-Hi-Kn010G3/L0137-k0	5.87E-09

(3-3) Модификация pI с помощью точечных мутаций.

При коммерческом производстве биспецифических антител требуется высокий уровень чистоты. При использовании ионообменной хроматографии эффективной является модификация изоэлектрической точки (pI) молекул (PLoS One. 2013;8(2):e57479). По этой причине интродуцировали мутации для модификаций pI в последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 гуманизированного антитела к человеческому GPC3, полученного согласно методу, описанному в примере 2, H0000-ERY27_HK (SEQ ID NO: 54), для получения модифицированных антител. Затем определяли аффинность указанных модифицированных антител к растворимому человеческому GPC3.

В результате установлено, что аминокислотным модификациям, которые могут приводить к снижению pI, сохраняя при этом аффинность к человеческому GPC3, следует подвергать аминокислоты в положениях 19, 43, 53 и 61 согласно нумерации Кэбота.

Объединяя сайты, которые обладают способностью поддерживать аффинность к человеческому GPC3 и снижать pI, получали антитела, аффинности и pI которых представлены в табл. 10.

Таблица 10

Название антитела (гомомерное антитело)	Расчет. величина PI (гомомерное антитело)	Название антитела (однородное антитело)	KD человек. GPC3 (однородное антитело)	Сайты мутации на основе H0610-E2704sEpsc
H0610-E2704sEpsc/L0000-k0	7.8	H0610-G1d/none-Hi-Kr010G3L0000-k0	4.16E-09	-
GCH054-E2704sEpsc/L0011-k0	6.2	GCH054-G1d/none-Hi-Kr010G3L0011-k0	5.25E-09	K19T/Q43E/P52aG/K53E/G55P/Q61E
GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0	6.4	GCH065-G1d/none-Hi-Kr010G3L0011-k0	8.84E-10	K19T/Q43E/P52aG/K53P/G55P/Q61E
GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0	6.2	GCH094-G1d/none-Hi-Kr010G3L0011-k0	4.54E-08	K19T/I37V/P40A/Q43E/I48M/P52aG/K53E/G55P/Q61E

(3-4) Модификация способности связывать внеклеточный матрикс с помощью точечной мутации.

Известно, что неспецифическое связывание с внеклеточным матриксом (ECM) и т.п. может оказывать влияние на фармакокинетику (MAbs. 4(6), ноябрь-декабрь 2012 г., с. 753-760). Таким образом, ЕСМ-связывающую способность модифицированных антител, полученных согласно описанным в примерах методам, определяли с помощью метода, представленного в приведенном для справки примере 4. В результате было подтверждено, что гуманизованное биспецифическое антитело к человеческой CD3ε-цепи и к человеческому GPC3, GPC3_ERY27_hCE115 (SEQ ID NO: 54, 55 и 56), обладало высокой ЕСМ-связывающей способностью. Таким путем изучали любую из оцененных в примерах 3-1, 3-2 и 3-3 точечных мутаций в последовательности гуманизованного антитела к человеческой CD3ε-цепи hCE115HA-ERY27HE (SEQ ID NO: 55) в качестве комбинации для снижения ЕСМ-связывающей способности. В результате было установлено, что аминокислоты в положениях 11, 16, 52a, 53, 98 и 100 согласно нумерации Кэбота участвуют в поддержании аффинности к CD3ε и могут влиять на снижение ЕСМ-связывающей способности, и получали антитела с пониженной ЕСМ-связывающей способностью по сравнению со способностью варианта гуманизованного биспецифического антитела к человеческой CD3ε-цепи и к человеческому GPC3, GPC3_ERY27_hCE115 (табл. 11).

Таблица 11

Название антитела	Соотношение связывания ECM (стандарт = 1)
GPC3_ERY27_CE115 (rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L)	4.0
GPC3_ERY27 (hCE115HA-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L)	50.9
CE115HA236-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L	429.9
CE115HA236-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L	414.8
CE115HA251-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L	346.9
CE115HA251-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L	334.4
TR01H002-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L	301.1
TR01H002-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L	216.9
TR01H015-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L	185.7
TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0208-k0	50.4
CE115HA122-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L	47.0
TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0211-k0	15.5
TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0206-k0	15.4
TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0209-k0	7.4
rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L	4.6
TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0204-k0	4.4
TR01H067-E2702GsKsc/GCH054-E2704sEpsc/L0212-k0	3.3
TR01H113-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0	2.5
TR01H082-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0	1.7
TR01H113-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0	1.6
rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/L0000-E22Hk/H0610-E22L	1.4
TR01H084-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0	1.3
TR01H084-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0	1.2
TR01H082-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0201-k0	1.1
TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0000-k0	0.8
TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0201-k0	0.8
TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0203-k0	0.8
TR01H082-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0	0.7
TR01H109-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0	0.7
TR01H067-E2702GsKsc/GCH054-E2704sEpsc/L0222-k0	0.6
TR01H067-E2702GsKsc/GCH054-E2704sEpsc/L0201-k0	0.5
TR01H109-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0	0.4
TR01H113-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0	0.3
MRAH-G1d/MRAL-k0(стандарт)	1

(3-5) Модификации способности связываться с лигандом SuRe с помощью точечных мутаций.

Известен пример того, что связывание антитела с белком А зависит от последовательности вариативной области (VH3) (J Biomol Tech. 22(2), июль 2011 г., с. 50-52). При очистке на белке А гуманизованного биспецифического антитела к человеческой CD3ε-цепи и к человеческому GPC3, удаление гомомерного антитела к CD3 являлось важным для подавления неспецифических реакций посредством CD3. Таким образом, представляется желательным подавлять связывание гомомерного антитела к CD3 с белком А.

Вероятно, лиганд SuRe™ можно применять при коммерческом производстве и поэтому точечные мутации, влияющие на связывание с лигандом SuRe™, интродуцировали в CDR2 Н-цепи вариантов гуманизованного антитела к CD3, TR01H082-E2702GsKsc и TR01H084-E2702GsKsc (SEQ ID NO: 398 и 399), для получения модифицированных антител. Связывающую способность этих модифицированных антител с лигандом SuRe™ определяли с помощью метода, представленного в приведенном для справки примере 5. В результате было установлено, что аминокислоты в положениях 19, 57 и 59 согласно нумерации Кэбота участвуют в поддержании аффинности к CD3ε и могут влиять на способность связываться с лигандом Sure™, и получали антитела с пониженной способностью связываться с лигандом Sure™ по

сравнению со способностью антител TR01H082-E2702GsKsc/L0011-k0 (SEQ ID NO: 398 и 410) или TR01H084-E2702GsKsc/L0011-k0 (SEQ ID NO: 399 и 410) (табл. 12).

Таблица 12

Название антитела	Связывание SuRe™ (RU)	Сайты связывания на основе CE115HA000
TR01H084-E2702GsKsc/L0011-k0	5065.8	R16G/A52aD/N53Q/D72A/L78I/G98A/Y100G/A102I
TR01H082-E2702GsKsc/L0011-k0	4469.2	V11L/A52aD/N53Q/G98A/Y100G
TR01H090-E2702GsKsc/L0011-k0	3606.3	V11L/R16G/A52aD/N53Q/G98A/Y100G
TR01H093-E2702GsKsc/L0011-k0	2459.7	V11L/A52aD/N53Q/K64Q/G98A/Y100G
TR01H094-E2702GsKsc/L0011-k0	2351.9	V11L/A52aD/N53Q/K64S/G98A/Y100G
TR01H114-E2702GsKsc/L0011-k0	1485.5	R16G/A52aD/N53Q/T57S/D72A/L78I/G98A/Y100G/A102I
TR01H092-E2702GsKsc/L0011-k0	1159.5	V11L/A52aD/N53Q/K64A/G98A/Y100G
TR01H100-E2702GsKsc/L0011-k0	383.0	V11L/A52aD/N53Q/T57S/G98A/Y100G
TR01H111-E2702GsKsc/L0011-k0	50.7	R16G/R19K/A52aD/N53Q/D72A/L78I/G98A/Y100G/A102I
TR01H110-E2702GsKsc/L0011-k0	29.5	R19K/A52aD/N53Q/G98A/Y100G
TR01H091-E2702GsKsc/L0011-k0	27.5	V11L/R19K/A52aD/N53Q/G98A/Y100G
TR01H091-E2702GsKsc/L0011-k0	15.0	V11L/R19K/A52aD/N53Q/G98A/Y100G
TR01H112-E2702GsKsc/L0011-k0	8.8	R16G/A52aD/N53Q/T57Q/D72A/L78I/G98A/Y100G/A102I
TR01H113-E2702GsKsc/L0011-k0	7.0	R16G/A52aD/N53Q/Y59V/D72A/L78I/G98A/Y100G/A102I
TR01H096-E2702GsKsc/L0011-k0	2.7	V11L/A52aD/N53Q/T57G/G98A/Y100G
TR01H109-E2702GsKsc/L0011-k0	2.2	V11L/A52aD/N53Q/Y59V/G98A/Y100G
TR01H098-E2702GsKsc/L0011-k0	1.6	V11L/A52aD/N53Q/T57P/G98A/Y100G
TR01H107-E2702GsKsc/L0011-k0	1.4	V11L/A52aD/N53Q/Y59Q/G98A/Y100G
TR01H103-E2702GsKsc/L0011-k0	1.4	V11L/A52aD/N53Q/Y59G/G98A/Y100G
TR01H104-E2702GsKsc/L0011-k0	1.0	V11L/A52aD/N53Q/Y59V/G98A/Y100G
TR01H105-E2702GsKsc/L0011-k0	0.8	V11L/A52aD/N53Q/Y59L/G98A/Y100G
TR01H099-E2702GsKsc/L0011-k0	0.6	V11L/A52aD/N53Q/T57Q/G98A/Y100G
TR01H102-E2702GsKsc/L0011-k0	0.5	V11L/A52aD/N53Q/Y59F/G98A/Y100G
TR01H101-E2702GsKsc/L0011-k0	0.5	V11L/A52aD/N53Q/T57V/G98A/Y100G
TR01H108-E2702GsKsc/L0011-k0	0.4	V11L/A52aD/N53Q/Y59T/G98A/Y100G
TR01H097-E2702GsKsc/L0011-k0	0.1	V11L/A52aD/N53Q/T57L/G98A/Y100G
TR01H106-E2702GsKsc/L0011-k0	0.0	V11L/A52aD/N53Q/Y59P/G98A/Y100G
TR01H095-E2702GsKsc/L0011-k0	-0.2	V11L/A52aD/N53Q/T57F/G98A/Y100G

(3-6) Получение оптимизированных биспецифических антител путем объединения точечных мутаций, приводящих к улучшению различных свойств.

Оптимизированные модифицированные антитела можно получать, объединяя точечные мутации, которые приводят к улучшению различных свойств, описанных в примерах 3-1-3-5. В качестве примеров указанных модифицированных антител получали антитела, представленные в табл. 13, и у них оценивали зависимость от Т-клеток клеточную цитотоксичность (TDCC) с помощью методов, аналогичных описанным в примере 1. Результаты представлены на фиг. 4-9. В результате получали оптимизированные гуманизированные биспецифические антитела к человеческой CD3ε-цепи и к человеческому GPC3, обладающие эквивалентной или более высокой зависимой от Т-клеток клеточной цитотоксичностью, чем GPC3_ERY22_rCE115 до его гуманизации.

Таблица 13

Номер образца в анализе TDCC	Название антитела
1	GPC3_ERY22_CE115 (rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L)
2	GPC3_ERY27 (hCE115HA-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L)
3	CE115HA251-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L
4	CE115HA236-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L
5	TR01H002-E22Hh/GLS3108-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L
6	CE115HA122-E22Hh/L0000-k0/GL4-E22Hk/H0000-E22L
7	rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/L0000-E22Hk/H0610-E22L
8	rCE115H-E22Hh/rCE115L-k0/GL4-E22Hk/H0610-E22L
13	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0000-k0
14	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0201-k0
15	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0203-k0
16	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0204-k0
17	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0206-k0
18	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0208-k0
19	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0209-k0
20	TR01H040-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0211-k0
21	rCE115H-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0000-k0
22	TR01H061-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0000-k0
23	TR01H068-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0000-k0
24	TR01H071-E2702GsKsc/H0610-E2704sEpsc/L0000-k0
25	TR01H067-E2702GsKsc/GCH054-E2704sEpsc/L0201-k0
26	TR01H067-E2702GsKsc/GCH054-E2704sEpsc/L0212-k0
27	TR01H067-E2702GsKsc/GCH054-E2704sEpsc/L0222-k0
28	TR01H067-E2702GsKsc/GCH054-E2704sEpsc/L0000-k0
29	TR01H082-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0201-k0
30	TR01H082-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0
31	TR01H084-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0
32	TR01H084-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0
33	TR01H082-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0
34	TR01H109-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0
35	TR01H109-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0
36	TR01H113-E2702GsKsc/GCH094-E2704sEpsc/L0011-k0
37	TR01H113-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0
38	TR01H113-E2702GsKsc/GCH065-E2704sEpsc/L0011-k0

В примерах 3-1-3-6 продемонстрировано, что указанные ниже аминокислотные остатки, например, являются важными для поддержания свойств оптимизированных биспецифических антител к человеческой CD3ε-цепи и к человеческому GPC3, которые обладали эквивалентной или более высокой зависимой от Т-клеток клеточной цитотоксичностью, чем GPC3_ERY22_rCE115 до его гуманизации.

В антителах к человеческой CD3ε-цепи присутствуют, например, Leu в положении 11, Gly в положении 16, Asp в положении 52a, Gln в положении 53, Ala в положении 72, He в положении 78, Ala в положении 98, Gly в положении 100 и Ile в положении 102. В антителах к человеческому GPC3 присутст-

вуют, например, Thr в положении 19, Glu в положении 43, Gly в положении 52a, Pro или Glu в положении 53, Pro в положении 55 и Glu в положении 61. Кроме того, в общих L-цепях присутствуют, например, Pro в положении 25, Pro в положении 27a, Pro в положении 27b, He в положении 33, Gln в положении 34, Arg или Trp в положении 56 и Tyr в положении 89 (все положения обозначены согласно нумерации Кэбота).

Пример 4. Оценка эффективности *in vivo*.

Эффективность некоторых из описанных выше антител оценивали *in vivo* с использованием несущих опухоли модельных животных.

Оценку эффективности *in vivo* осуществляли для репрезентативных антител из представленных в табл. 13, для которых продемонстрировано наличие цитотоксической активности при оценке с использованием анализа *in vitro*, описанного в примерах 3-6. При оценке эффективности *in vivo* следует принимать во внимание любое влияние, вызываемое различиями в микроокружении из-за образования агрегатов опухолей, на результаты оценки. Для изучения использовали два типа клеточных линий человеческого рака с различной чувствительностью к действию применяемых в качестве лекарственных средств антител, т.е. линии PC-10 и NCI-H446, несмотря на то, что уровни экспрессии GPC3 в этих клетках были практически одинаковыми. Клеточные линии трансплантировали мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (NOD scid) и мышам NOD scid, у которых было подтверждено образование опухолей, трансплантировали Т-клетки, выращенные культивированием *in vitro* человеческих РВМС. Мышей (которых обозначали как модель с инъецированными Т-клетками) обрабатывали путем введения оптимизированных биспецифических антител к человеческой CD3ε-цепи и человеческому GPC3.

Более конкретно, в опытах по оценке эффективности в качестве лекарственных средств оптимизированных биспецифических антител к человеческой CD3ε-цепи и человеческому GPC3, в которых применяли клетки линии PC-10 на модели с инъецированными Т-клетками, осуществляли описанные ниже опыты. Т-клетки размножали культивированием с использованием РВМС, выделенных из крови здоровых доноров, и набора для активации/экспансии человеческих Т-клеток (T cell activation/expansion kit/human) (фирма MACS Miltenyi biotec). Смешивали клеточную линию человеческого рака PC-10 (1×10^7 клеток) с матриксом базальной мембраны Matrigel (фирма BD) и трансплантировали подкожно в паховую область мышей NOD scid (фирма CLEA Japan, самки возрастом 6 недель). День трансплантации обозначали как день 0. За 1 день до трансплантации мышам внутрибрюшинно вводили антитело к асиалоганглиозиду M1 (асиало-GM1) (фирма Wako Pure Chemical Industries) из расчета 0,2 мг/мышь. Через 13-15 дней после трансплантации мышей разделяли на группы в зависимости от веса тела и размера опухолей и вновь внутрибрюшинно вводили антитело к асиало-GM1 из расчета 0,2 мг/мышь. На следующий день внутрибрюшинно трансплантировали Т-клетки, полученные вышеописанным методом размножения культивированием, из расчета 3×10^7 клеток/мышь. Через 4 ч после трансплантации Т-клеток внутривенно через каудальную вену вводили оптимизированные биспецифические антитела к человеческой CD3ε-цепи и человеческому GPC3 из расчета 1 мг/кг. Оптимизированные биспецифические антитела к человеческой CD3ε-цепи и человеческому GPC3 вводили только один раз.

В результате установлена более выраженная противоопухолевая активность в группе, обработанной оптимизированными биспецифическими антителами к человеческой CD3ε-цепи и человеческому GPC3, по сравнению с группой, обработанной растворителем (фиг. 10a, б).

Аналогичными методами осуществляли опыты по оценке эффективности в качестве лекарственных средств оптимизированных биспецифических антител к человеческой CD3ε-цепи и человеческому GPC3, в которых применяли клетки линии NCI-H446, на модели с инъецированными Т-клетками. Для оценки воздействия на NCI-H446 оптимизированные биспецифические антитела к человеческой CD3ε-цепи и человеческому GPC3 вводили один раз через каудальную вену из расчета 5 мг/кг.

В результате установлена более выраженная противоопухолевая активность в группе, обработанной оптимизированными биспецифическими антителами к человеческой CD3ε-цепи и человеческому GPC3, по сравнению с группой, обработанной растворителем (фиг. 11a, б).

Приведенные для справки примеры.

Приведенный для справки пример 1. Получение экспрессионных векторов антител и экспрессия и очистка антител.

Аминокислотные замены интродуцировали методами, известными специалистам в данной области, например, с использованием набора для сайтнаправленного мутагенеза QuikChange (фирма Stratagene), ПЦР или набора для ПЦР-клонирования In-fusion Advantage (фирма TAKARA), для создания экспрессионных векторов. Нуклеотидные последовательности полученных экспрессионных векторов определяли с помощью метода, известного специалистам в данной области. Полученные плазмиды кратковременно интродуцировали в клетки клеточной линии, полученной из почки человеческого эмбриона HEK293H (фирма Invitrogen) или FreeStyle293 (фирма Invitrogen) для экспрессии антител. Из полученных супернатантов культуры антитела очищали с использованием колонки rProtein A Sepharose Fast Flow (фирма GE Healthcare) с помощью метода, известного специалистам в данной области. Измеряли абсорбцию при 280 нм растворов очищенных антител с помощью спектрофотометра, и концентрацию антител рассчитывали

на основе определенных величин, применяя коэффициент абсорбции, рассчитанный с помощью метода PACE (Protein Science 4, 1995, с. 2411-2423).

Приведенный для справки пример 2. Определение ADCC-активности каждого из тестируемых антител с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека в качестве эффекторных клеток ADCC-активность каждого из тестируемых антител определяли с помощью описанного ниже метода.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (обозначены далее как человеческие РВМС) применяли в качестве эффекторных клеток для измерения ADCC-активности каждого из тестируемых антител согласно описанному ниже методу.

(1) Получение раствора человеческих РВМС.

Получали образцы по 50 мл периферической крови здоровых добровольцев (взрослые мужчины) с использованием шприцев, предварительно заполненных 200 мкл (1000 ед./мл) раствора гепарина (Novo-Heparin 5000 ед. на инъекцию; фирма Novo Nordisk). Эту периферическую кровь двукратно разводили 3ФР(-), разделяли на четыре аликвоты и добавляли в пробирки для разделения лимфоцитов Leucoser (фирма Greiner bio-one), в которые предварительно вносили 15 мл фиколл-пак PLUS и центрифугировали. После центрифугирования пробирок для разделения, содержащих аликвоты периферической крови, при 2150 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре собирали фракции мононуклеарных клеток. Клетки в каждой фракции однократно промывали с использованием модифицированной по методу Дульбекко среды Игла (фирма SIGMA), содержащей 10% FBS (далее в контексте настоящего описания обозначена как 10%FBS/D-MEM), а затем плотность клеток доводили до 5×10^6 клеток/мл с помощью 10% FBS/D-MEM. Клеточную суспензию в приведенных ниже экспериментах использовали в качестве клетки-мишени.

(2) Анализ высвобождения хрома (ADCC-активность).

ADCC-активность оценивали по удельной скорости высвобождения хрома, определенной методом определения высвобождения хрома. Сначала растворы антитела в каждой из приготовленных концентраций (0, 0,004, 0,04, 0,4, 4 и 40 мкг/мл) добавляли в 96-луночный планшет с U-образным дном из расчета 50 мкл на лунку. Затем высеивали клетки-мишени из расчета 50 мкл на лунку (1×10^4 клеток/лунку) и давали выстояться при комнатной температуре в течение 15 мин. Раствор человеческих РВМС, приготовленный согласно методу, описанному в подпункте (1), добавляли из расчета 100 мкл на лунку (5×10^5 клеток/лунку) и планшет выдерживали в инкубаторе в атмосфере, содержащей 5% диоксида углерода, при 37°C в течение 4 ч, после чего центрифугировали. Радиоактивность в 100 мкл супернатанта культуры в каждой лунке планшета измеряли с помощью гамма-счетчика. Удельную скорость высвобождения хрома определяли по следующей формуле:

$$\text{удельная скорость высвобождения хрома (\%)} = (A-B) \times 100 / (B-B),$$

где А представляет собой среднее значение радиоактивности (срм) 100 мкл супернатанта культуры в каждой лунке; В представляет собой среднее значение радиоактивности (срм) 100 мкл супернатанта культуры в лунках, в которых к клеткам-мишеням добавляли 100 мкл 2%-ного водного раствора NP-40 (Nonidet P-40, фирма Nacalai Tesque) и 50 мкл 10%-ной среды FBS/D-MEM; и В представляет собой среднее значение радиоактивности (срм) 100 мкл супернатанта культуры в лунках, в которых к клеткам-мишеням добавляли 150 мкл 10%-ной среды FBS/D-MEM. Эксперименты осуществляли в трех повторностях и по результатам вышеуказанного эксперимента вычисляли среднее значение и стандартное отклонение удельной скорости высвобождения хрома (%), отражающей ADCC-активность, для каждого из тестируемых антител.

Приведенный для справки пример 3. Определение T_m модифицированных антител с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии.

При такой оценке определяли величину T_m (температура тепловой денатурации) модифицированных антител с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии с использованием устройства Rotor-Gene Q (фирма QIAGEN). Известно, что этот метод обеспечивает предпочтительную корреляцию с величиной T_m , установленной с использованием дифференциального сканирующего калориметра, что является широко известным методом оценки термостабильности антител (Journal of Pharmaceutical Science 4, 2010, с. 1707-1720).

5000-кратный концентрат SYPRO оранжевого (фирма Molecular Probes) разводили 3ФР (фирма Sigma) и затем смешивали с растворами антител с получением образцов для измерения. Аликвоты по 20 мкл каждого образца вносили в измерительные пробирки и температуру повышали с 30 до 99°C со скоростью повышения температуры 240°C/ч. Изменения флуоресценции, сопровождающие повышение температуры, определяли при 470 нм (длина волны возбуждения)/555 нм (длина волны флуоресцентного испускания).

Данные анализировали с использованием программы Rotor-Gene Q Series (фирма QIAGEN) для расчета температуры, при которой наблюдается переход флуоресценции, и эту температуру принимали за T_m .

Приведенный для справки пример 4. Определение ЕСМ-связывающей способности.

Определение осуществляли согласно методу, описанному в WO 2012/093704. В целом, метод состоял в следующем: BD-Matrigel (фирма BD Biosciences, № 356237) получали в концентрации 2 мг/мл с использованием TBS (фирма Takara, № T903) и переносили в 96-луночный планшет для измерения (фирма Meso Scale Discovery, № L15XB-3(High Bind, высокая способность связываться)) из расчета 5 мкл на лунку и затем давали выстояться в течение ночи в холодном месте. Затем в каждую лунку планшета вносили по 150 мкл блокирующего ECL-буфера (ЗФР, содержащий 0,05% Твин20, 0,5% БСА и 0,01% азида натрия) и давали выстояться при комнатной температуре в течение 2 ч или более.

Козий античеловеческий IgG(γ) (фирма Invitrogen, № 628400) метили рутением с использованием сложного эфира NHS, меченного MSD-SULFO (фирма Meso Scale Discovery, №R91AN-2) согласно прилагаемым инструкциям. Его разводили ECL-буфером для разведения (ЗФР, содержащий 0,01% Твин20, 0,1% БСА и 0,01% азида натрия) до конечной концентрации 2 мкг/мл. Кроме того, стандартное антитело и тестируемые антитела разводили ЗФР-Т (ЗФР, содержащий 0,05% Твин20 и 0,01% азида натрия) до получения конечной концентрации 3 мкг/мл.

В 96-луночный планшет для проведения реакции (фирма Thermo scientific, Nunc № 145399), последовательно добавляли 10 мкл ECL-буфера для разведения, 20 мкл стандартного антитела и тестируемого антитела (3 мкг/мл) и 30 мкл меченного рутением антитела (2 мкг/мл), и давали прореагировать в течение 1 ч при комнатной температуре при перемешивании в темноте.

Блокирующий ECL-буфер удаляли из 96-луночного планшета для измерения путем опрокидывания, добавляли 50 мкл раствора образца из 96-луночного реакционного планшета и давали выстояться в темноте при комнатной температуре в течение 1 ч. После этого удаляли раствор образца из 96-луночного планшета для измерения (измерительный планшет) путем опрокидывания и немедленно добавляли 150 мкл 2 \times T-буфера (4 \times MSD T-буфер для считывания (фирма Meso Scale Discovery), двукратно разведенный с помощью ECL-буфера для разведения), осуществляли измерения ECL. Для измерений использовали устройство SECTOR Imager 2400 (фирма Meso Scale Discovery).

Анализы осуществляли путем деления интенсивности флуоресценции тестируемого антитела на интенсивность флуоресценции стандартного антитела, для расчета и сравнения интенсивностей, принимая величину для стандартного антитела за 1.

Приведенный для справки пример 5. Определение способности связывать лиганд SuRe™.

Способность связываться с лигандом SuRe оценивали, используя Biacore™-T200 (GE Healthcare Japan). В качестве подвижного буфера применяли HBS-EP+ (фирма GE Healthcare Japan) и набор для аминного сочетания (фирма GE Healthcare Japan) применяли для ковалентного связывания лиганда Mab Select SuRe™ (фирма GE Healthcare Japan) с CM5-чипом (чип, покрытый карбоксиметилдекстраном). Антитело, применяемое в качестве аналита, приготавливали в концентрации 5 мкг/мл с использованием HBS-EP+. Для осуществления измерений сначала инъецировали раствор с концентрацией антитела 5 мкг/мл со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 3 мин, затем аналит заменяли на HBS-EP+ и оценивали ответ (RU) после пропускания потока в течение 0,5 мин. После завершения измерений сенсорный чип регенерировали, промывая 10 mM Gly-HCl при pH 1,5. В контрольной проточной ячейке осуществляли такой же эксперимент без ковалентного связывания лиганда с чипом, и аффинность к лиганду SuRe™ анализировали на основе различия между ответами (RU).

Последовательности, соответствующие упомянутым выше номерам последовательностей (SEQ ID NO:), представлены ниже в таблице.

Таблица 14

SEQ ID NO	название	SEQ ID NO	название	SEQ ID NO	название
1	нуклеотидная последовательность GPC3 (NP_991164617.1)	81	TR01H018	154	TR01H099
2	аминокислотная последовательность GPC3 (NP_991158089.1)	82	TR01H019	155	TR01H100
3	сигнальная последовательность	83	TR01H020	156	TR01H101
4	пептид α -цепи Т-клеточного рецептора (CAA_26636.1)	84	TR01H021	157	TR01H102
5	пептид β -цепи Т-клеточного рецептора (C25777)	85	TR01H022	158	TR01H103
6	пептид γ 1-цепи Т-клеточного рецептора (A26659)	86	TR01H023	159	TR01H104
7	пептид γ 2-цепи Т-клеточного рецептора (AAB63312.1)	87	TR01H024	160	TR01H105
8	пептид δ -цепи Т-клеточного рецептора (AA61033.1)	88	TR01H025	161	TR01H106
9	нуклеотид γ -цепи CD3 (NM_000732.2)	89	TR01H026	162	TR01H107
10	нуклеотид δ -цепи CD3 (NM_000732.4)	90	TR01H027	163	TR01H108
11	нуклеотид ϵ -цепи CD3 (NM_000733.3)	91	TR01H028	164	TR01H109
12	пептид γ -цепи CD3 (NP_000664.1)	92	TR01H029	165	TR01H110
13	пептид δ -цепи CD3 (NP_000723.1)	93	TR01H030	166	TR01H111
14	пептид ϵ -цепи CD3 (NP_000724.1)	94	TR01H031	167	TR01H112
15-22	пептидный инверс	95	TR01H032	168	TR01H113
23	человеческий C γ 1	96	TR01H033	169	TR01H114
24	человеческий C γ 2	97	TR01H034	170	GCH003
25	человеческий C γ 3	98	TR01H035	171	GCH005
26	человеческий C γ 4	99	TR01H036	172	GCH006
27	нуклеотид Fc γ RI (NM_000566.3)	100	TR01H037	173	GCH007
28	пептид Fc γ RI (NM_000557.1)	101	TR01H038	174	GCH008
29	нуклеотид Fc γ RIIA (BC020823.1)	102	TR01H039	175	GCH010
30	пептид Fc γ RIIA (AAB20823.1)	103	TR01H040	176	GCH012
31	нуклеотид Fc γ RIIB (BC146678.1)	104	TR01H041	177	GCH013
32	пептид Fc γ RIIB (AA146679.1)	105	TR01H042	178	GCH014
33	нуклеотид Fc γ RIIIA (BC033678.1)	106	TR01H043	179	GCH015
34	пептид Fc γ RIIIA (AAH033678.1)	107	TR01H044	180	GCH016
35	нуклеотид Fc γ RIIIB (BC128562.1)	108	TR01H045	181	GCH019
36	пептид Fc γ RIIIB (AA128563.1)	109	TR01H046	182	GCH022
37	Fc-обл. (доб. А к N-концу RefSeq рег. номер AAC82527.1)	110	TR01H047	183	GCH023
38	Fc-обл. (доб. А к N-концу RefSeq рег. номер AAB59393.1)	111	TR01H048	184	GCH025
39	Fc-обл. (доб. А к N-концу RefSeq рег. номер AAB59394.1)	112	TR01H049	185	GCH026
40	H0000, переменная область H-цепи GPC3	113	TR01H050	186	GCH027
41	GL4, переменная область L-цепи GPC3	114	TR01H051	187	GCH029
42	rCE115H, переменная область H-цепи CE115	115	TR01H052	188	GCH032
43	rCE115L, переменная область L-цепи CE115	116	TR01H053	189	GCH034
44	G1dh	117	TR01H054	190	GCH035
45	ERY22_Hk	118	TR01H055	191	GCH039
46	ERY22_Hh	119	TR01H056	192	GCH040
47	GL4-ERY22_Hk	120	TR01H057	193	GCH042
48	H0000-ERY22_L	121	TR01H058	194	GCH043
49	rCE115H-ERY22_Hh	122	TR01H061	195	GCH045
50	rCE115L-k0	123	TR01H062	196	GCH053
51	hCE115HL (тяжелая цепь гуманизированного CE115)	124	TR01H063	197	GCH054
52	hCE115HA (тяжелая цепь гуманизированного CE115)	125	TR01H064	198	GCH055
53	L0000 (легкая цепь гуманизированного CE115)	126	TR01H065	199	GCH056
54	H0000-ERY27_HK	127	TR01H066	200	GCH057
55	hCE115HA-ERY27_HE	128	TR01H067	201	GCH059
56	L0000-k0	129	TR01H068	202	GCH060
57	E22Hh	130	TR01H069	203	GCH061
58	E22Hk	131	TR01H070	204	GCH062
59	H-Kn010G3	132	TR01H071	205	GCH064
60	E2702GsKsc	133	TR01H072	206	GCH065
61	E2704sEpsc	134	TR01H073	207	GCH066
62	E2702sKsc	135	TR01H074	208	GCH067
63	k0	136	TR01H075	209	GCH068
64	CE115HA177	137	TR01H076	210	GCH073
65	CE115HA178	138	TR01H077	211	GCH094
66	CE115HA179	139	TR01H079	212	GCH098
67	CE115HA180	140	TR01H080	213	GCH099
68	hCE115HAa	141	TR01H081	214	GCH100
69	TR01H006	142	TR01H082	215	H0610
70	TR01H007	143	TR01H083	216	L0000wk1
71	TR01H008	144	TR01H084	217	L0002
72	TR01H009	145	TR01H090	218	L0003
73	TR01H010	146	TR01H091	219	L0006
74	TR01H011	147	TR01H092	220	L0007
75	TR01H012	148	TR01H093	221	L0008
76	TR01H013	149	TR01H094	222	L0009
77	TR01H014	150	TR01H095	223	L0011
78	TR01H015	151	TR01H096	224	L0012
79	TR01H016	152	TR01H097	225	L0013
80	TR01H017	153	TR01H098	226	L0014

SEQ ID NO.	название	SEQ ID NO.	название	SEQ ID NO.	название
227	L0015	300	L0202	373	TR01L015
228	L0016	301	L0203	374	TR01L016
229	L0032	302	L0204	375	TR01L017
230	L0038	303	L0205	376	TR01L018
231	L0039	304	L0206	377	TR01L019
232	L0041	305	L0207	378	TR01L020
233	L0042	306	L0208	379	TR01L023
234	L0043	307	L0209	380	TR01L024
235	L0044	308	L0210	381	CE115HA122-E22Hh
236	L0045	309	L0211	382	CE115HA236-E22Hh
237	L0046	310	L0212	383	CE115HA251-E22Hh
238	L0047	311	L0213	384	GCH054-E2704sEpsc
239	L0062	312	L0214	385	GCH065-E2704sEpsc
240	L0063	313	L0215	386	GCH094-E2704sEpsc
241	L0064	314	L0216	387	H0610-E2704sEpsc
242	L0065	315	L0217	388	hCE115HA-E22Hh
243	L0066	316	L0218	389	rCE115H-E22Hh
244	L0069	317	L0219	390	rCE115H-E2702GsKsc
245	L0075	318	L0220	391	TR01H002-E22Hh
246	L0079	319	L0222	392	TR01H015-E22Hh
247	L0082	320	L0223	393	TR01H040-E2702GsKsc
248	L0085	321	L0224	394	TR01H061-E2702GsKsc
249	L0089	322	L0226	395	TR01H067-E2702GsKsc
250	L0090	323	L0227	396	TR01H068-E2702GsKsc
251	L0091	324	L0228	397	TR01H071-E2702GsKsc
252	L0093	325	L0229	398	TR01H082-E2702GsKsc
253	L0104	326	L0230	399	TR01H084-E2702GsKsc
254	L0106	327	L0231	400	TR01H109-E2702GsKsc
255	L0107	328	L0232	401	TR01H113-E2702GsKsc
256	L0109	329	L0233	402	TR01H113-E2702sKsc
257	L0113	330	L0234	403	GL4-E22Hk
258	L0115	331	L0235	404	L0000-E22Hk
259	L0117	332	L0236	405	H0000-E22L
260	L0120	333	L0237	406	H0610-E22L
261	L0122	334	L0238	407	rCE115L-k0
262	L0123	335	L0239	408	GLS3108-k0
263	L0124	336	L0240	409	L0000-k0
264	L0125	337	L0241	410	L0011-k0
265	L0126	338	L0242	411	L0201-k0
266	L0127	339	L0243	412	L0203-k0
267	L0129	340	L0246	413	L0204-k0
268	L0132	341	L0247	414	L0206-k0
269	L0134	342	L0248	415	L0208-k0
270	L0136	343	L0249	416	L0209-k0
271	L0137	344	L0250	417	L0211-k0
272	L0138	345	L0258	418	L0212-k0
273	L0139	346	L0259	419	L0222-k0
274	L0140	347	L0260	420	TR01H001
275	L0141	348	L0261	421	TR01H002
276	L0143	349	L0262	422	TR01H003
277	L0144	350	L0263	423	TR01H004
278	L0145	351	L0264	424	rCE115H
279	L0147	352	L0265	425	CE115HA121
280	L0148	353	L0266	426	CE115HA122
281	L0149	354	L0267	427	CE115HA124
282	L0151	355	L0268	428	CE115HA192
283	L0152	356	L0269	429	CE115HA236
284	L0154	357	L0270	430	CE115HA251
285	L0155	358	L0271	431	CE115HA252
286	L0157	359	L0272	432	E22L
287	L0160	360	TR01L001		
288	L0161	361	TR01L002		
289	L0163	362	TR01L003		
290	L0167	363	TR01L004		
291	L0168	364	TR01L005		
292	L0173	365	TR01L006		
293	L0175	366	TR01L007		
294	L0180	367	TR01L008		
295	L0181	368	TR01L009		
296	L0186	369	TR01L010		
297	L0187	370	TR01L011		
298	L0200	371	TR01L012		
299	L0201	372	TR01L013		

Промышленная применимость

В настоящем изобретении предложены новые мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые сохраняют сильную противораковую активность, свойственную ViTE, и обладают очень высокой безопасностью, что проявляется в отсутствии индукции независимого от ракового антигена цитокинового шторма, а также обладают продолжительным временем полужизни в крови. Индуцирующие цитотоксичность агенты, которые содержат в качестве действующего вещества антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении, могут направленно воздействовать на экспрессирующие глипикан 3 клетки и опухолевые ткани, которые содержат такие клетки, и индуцировать повреждение клеток. Введение мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в настоящем изобретении, пациентам позволяет осуществлять требуемое лечение, которое не только отличается высоким уровнем безопасности, но также снижает физическую нагрузку на пациентов и является очень удобным.

тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206;

вариабельная область, имеющая CD3ε связывающую активность, имеет вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142, и

обе вариабельные области, как имеющая глипикан 3 связывающую активность, так и имеющая CD3ε связывающую активность, имеют общую вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223;

(2) биспецифическое антитело, где

вариабельная область, имеющая глипикан 3 связывающую активность, имеет вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206;

вариабельная область, имеющая CD3ε связывающую активность, имеет вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164 соответственно; и

обе вариабельные области, как имеющая глипикан 3 связывающую активность, так и имеющая CD3ε связывающую активность, имеют общую вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223;

(3) биспецифическое антитело, где

вариабельная область, имеющая глипикан 3 связывающую активность, имеет вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206;

вариабельная область, имеющая CD3ε связывающую активность, имеет вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168; и

обе вариабельные области, как имеющая глипикан 3 связывающую активность, так и имеющая CD3ε связывающую активность, имеют общую вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223;

(4) биспецифическое антитело, где

вариабельная область, имеющая глипикан 3 связывающую активность, имеет вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211;

вариабельная область, имеющая CD3ε связывающую активность, имеет вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142; и

обе вариабельные области, как имеющая глипикан 3 связывающую активность, так и имеющая CD3ε связывающую активность, имеют общую вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223;

(5) биспецифическое антитело, где

вариабельная область, имеющая глипикан 3 связывающую активность, имеет вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211;

вариабельная область, имеющая CD3ε связывающую активность, имеет вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164; и

обе вариабельные области, как имеющая глипикан 3 связывающую активность, так и имеющая CD3ε связывающую активность, имеют общую вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223.

5. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-4, в котором биспецифическое антитело дополнительно имеет Fc-область по меньшей мере с одной аминокислотной мутацией любой из образующих Fc-область аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 23-26 (IgG1-IgG4), где по меньшей мере одна мутация выбрана из аминокислот в следующих аминокислотных положениях согласно EU-нумерации: положение 220, положение 226, положение 229, положение 231, положение 232, положение 233, положение 234, положение 235, положение 236, положение 237, положение 238, положение 239, положение 240, положение 264, положение 265, положение 266, положение 267, положение 269, положение 270, положение 295, положение 296, положение 297, положение 298, положение 299, положение 300, положение 325, положение 327, положение 328, положение 329, положение 330, положение 331 и положение 332.

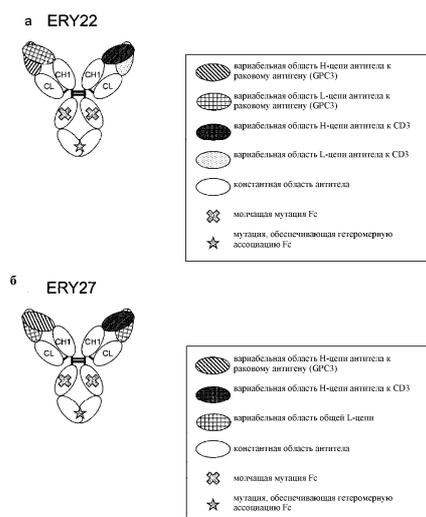
6. Биспецифическое антитело по п.5, в котором Fc-область биспецифического антитела представляет собой Fc-область, которая содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из указанных ниже аминокислот, согласно EU-нумерации: Arg в аминокислотном положении 234, Ala или Arg в аминокислотном положении 235, Lys в аминокислотном положении 239 и Ala в аминокислотном положении 297.

7. Биспецифическое антитело, связывающее глипикан 3 и CD3ε, выбранное из группы, включающей:

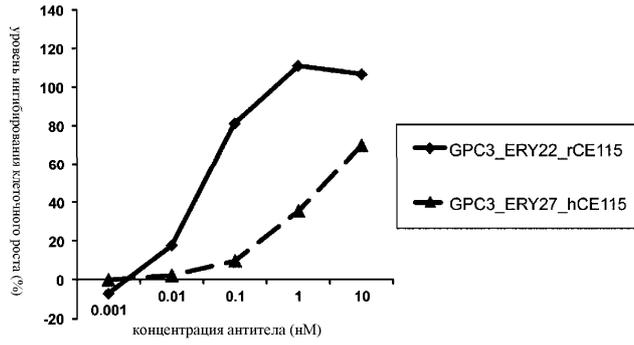
(1) биспецифическое антитело, которое имеет тяжелую цепь антитела, включающую вариабельную область тяжелой цепи антитела с глипикан 3 связывающей активностью, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206, и константную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; тяжелую цепь антитела, включающую вариабельную область тяжелой цепи антитела с CD3ε-связывающей активностью, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142, и константную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и

две идентичные вариабельные области легкой цепи антитела, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223; и

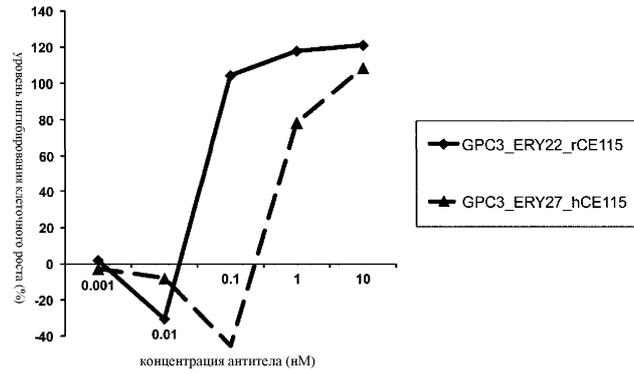
- NO: 168, и константную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и две идентичные легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 410;
- (4) биспецифическое антитело, которое имеет тяжелую цепь антитела, включающую вариабельную область тяжелой цепи антитела с глипикан 3 связывающей активностью, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206, и константную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; тяжелую цепь антитела, включающую вариабельную область тяжелой цепи антитела с CD3ε-связывающей активностью, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168, и константную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и две идентичные легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 410;
- (5) биспецифическое антитело, которое имеет тяжелую цепь антитела, включающую вариабельную область тяжелой цепи антитела с глипикан 3 связывающей активностью, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211, и константную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; тяжелую цепь антитела, включающую вариабельную область тяжелой цепи антитела с CD3ε-связывающей активностью, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 142, и константную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и две идентичные легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 410; и
- (6) биспецифическое антитело, которое имеет тяжелую цепь антитела, включающую вариабельную область тяжелой цепи антитела с глипикан 3 связывающей активностью, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211, и константную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; тяжелую цепь антитела, включающую вариабельную область тяжелой цепи антитела с CD3ε-связывающей активностью, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164, и константную область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; и две идентичные легкие цепи, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 410.
9. Нуклеиновая кислота, которая кодирует биспецифическое антитело по любому из пп.1-8.
10. Вектор экспрессии, включающий нуклеиновую кислоту по п.9.
11. Клетка-хозяин для получения биспецифического антитела по любому из пп.1-8, содержащая нуклеиновую кислоту по п.9 или вектор по п.10.
12. Способ получения биспецифического антитела по любому из пп.1-8 с помощью культивирования клетки по п.11, и выделение биспецифического антитела из культуры супернатантов.
13. Биспецифическое антитело, полученное способом по п.12.
14. Фармацевтическая композиция для лечения рака, включающего глипикан 3 экспрессирующие раковые клетки, содержащая биспецифическое антитело по любому из пп.1-8 и фармацевтически приемлемый носитель.
15. Фармацевтическая композиция по п.14, которая индуцирует цитотоксичность.
16. Фармацевтическая композиция по п.15, где цитотоксичность представляет собой зависимость от Т-клеток цитотоксичность.



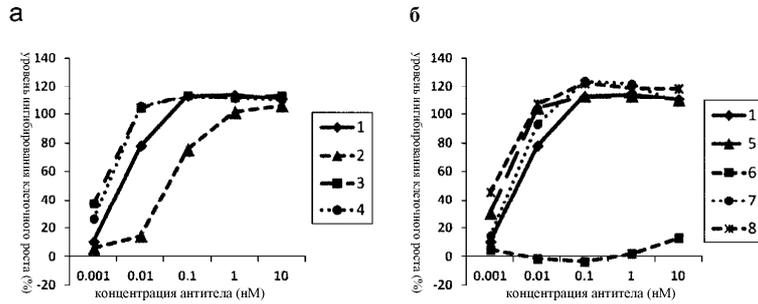
Фиг. 1



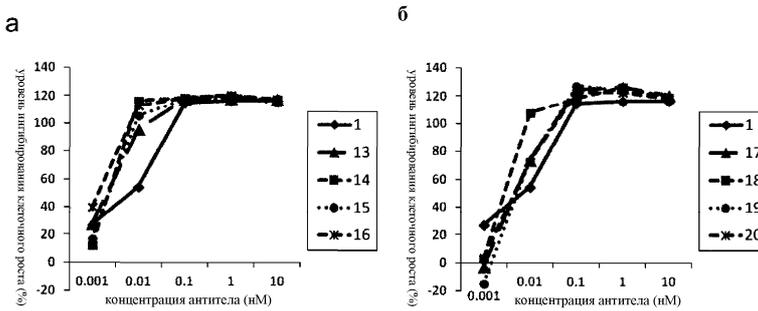
Фиг. 2



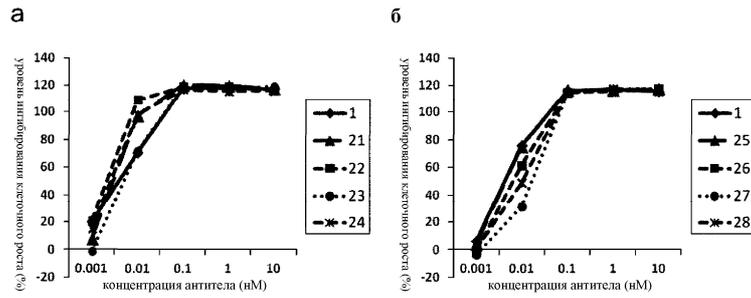
Фиг. 3



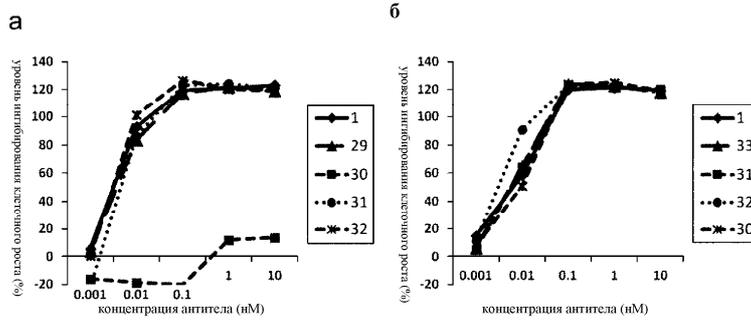
Фиг. 4



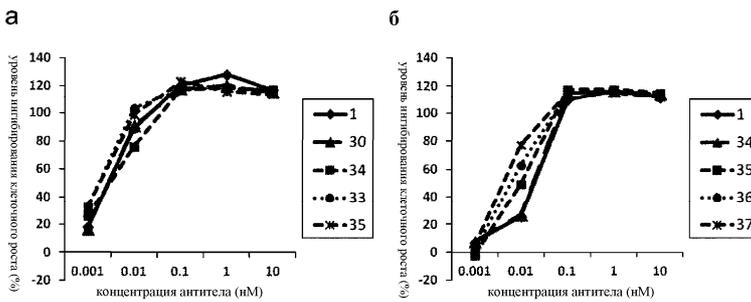
Фиг. 5



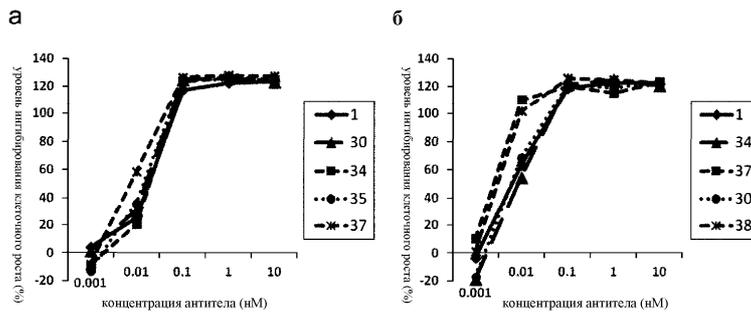
Фиг. 6



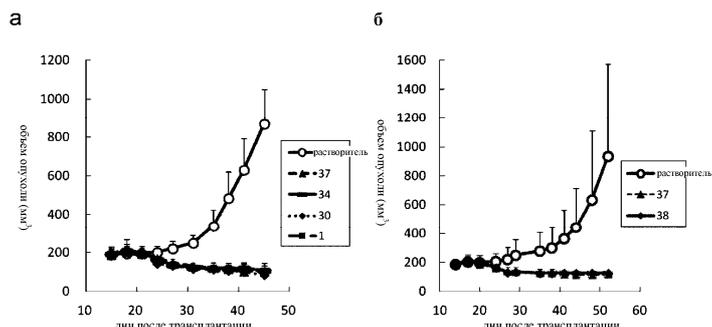
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

