

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291415** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.07

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.10

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К ВСМА/4-1ВВ И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/945,965; PCT/KR2019/018357

(32) 2019.12.10; 2019.12.24

(33) US; KR

(86) PCT/KR2020/018029

(87) WO 2021/118246 2021.06.17

(71) Заявитель:
ЭЙБИЭЛ БИО, ИНК. (KR)

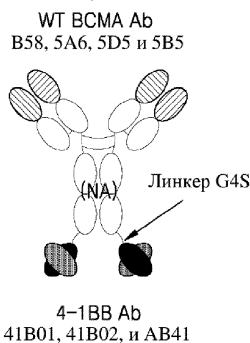
(72) Изобретатель:

Пак Кён Джин, Ли Ян Сун, Лим Сэ И,
Чон Хэ Джин, Пак Кён Су, Сон Ён Кю,
Сон Сон Кю, Сон Вон Чжун, Ким Ын
Чон, Ом Дже Хён, Чон Ый Чон, Пак
Мин Чжи, Хон Чон Хён (KR)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Представлено биспецифическое антитело к антигену созревания В-клеток (BCMA)/4-1ВВ или его антигенсвязывающий фрагмент, а также их применение. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут характеризоваться высокой аффинностью связывания как с белком BCMA, так и с белком 4-1ВВ, и могут быть эффективно применимы для предупреждения или лечения заболевания, связанного с BCMA, 4-1ВВ или обоими из них (например, рак).



A1

202291415

202291415

A1

БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К ВСМА/4-1ВВ И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

【Область техники, к которой относится изобретение】

Настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам к ВСМА/4-1ВВ, обеспечивающим эффективное блокирование взаимодействий между ВСМА и его лигандом, а также активирование передачи сигналов с участием 4-1ВВ; способу их получения и их применению. Биспецифические антитела могут иметь высокую аффинность связывания как с белком ВСМА, так и с белком 4-1ВВ.

【Предпосылки изобретения】

Антиген созревания В-клеток (ВСМА) представляет собой белок весом приблизительно 20 кДа и принадлежит к надсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR). Также известно, что ВСМА имеет лиганд В-клеточного активирующего фактора, принадлежащего к семейству факторов некроза опухоли (BAFF), и лиганд А, индуцирующий пролиферацию (APRIL). В патологических ситуациях ВСМА экспрессируется в опухолевых плазматических клетках пациентов с множественной миеломой (ММ), а показатели выживаемости пациентов с множественной миеломой ниже при более высокой экспрессии ВСМА (Moreaux et al., Eur J Haematol 2009 83: 119-129). Множественная миелома представляет собой неопластическое заболевание, вызванное моноклональной пролиферацией плазматических клеток. Уровень начального лечения увеличился благодаря разработке таких лекарственных средств, как талидомид, бортезомиб и леналидомид, а также разработке способов лечения. Однако выживаемость пациентов с множественной миеломой значительно не улучшилась.

4-1ВВ является представителем надсемейства TNF-рецепторов (TNFRSF) и представляет собой костимулирующую молекулу, которая экспрессируется после активации иммунных клеток, включая как врожденные, так и адаптивные иммунные клетки. 4-1ВВ играет важную роль в модулировании активности различных иммунных клеток. Агонистические в отношении 4-1ВВ антитела усиливают пролиферацию иммунных клеток, выживаемость, секрецию цитокинов и цитолитическую активность CD8 Т-клеток. Многие другие исследования показали, что активация 4-1ВВ усиливает иммунный ответ в отношении устранения опухолей у мышей. Следовательно, это предполагает, что 4-1ВВ является многообещающей целевой молекулой в иммунологии рака. Несмотря на свою противоопухолевую эффективность, антитела к 4-1ВВ при клиническом применении вызывают серьезную гепатотоксичность.

Мультиспецифические антитела, нацеленные на два или более антигенов, были разработаны в различных видах и формах, и ожидается, что они станут новыми лекарственными антителами, характеризующимися превосходными терапевтическими эффектами по сравнению с моноклональными антителами. Соответственно, существует потребность в разработке мультиспецифических антител, эффективных при лечении рака,

например, множественной миеломы.

【Раскрытие изобретения】

【Техническая проблема】

Представлено биспецифическое антитело к антигену созревания В-клеток (BCMA)/4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент.

Представлена фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения заболевания, связанного с BCMA, 4-1BB или обоими из них.

Представлен способ предупреждения или лечения заболевания, связанного с BCMA, 4-1BB или обоими из них, у индивидуума.

Представлено биспецифическое антитело к антигену созревания В-клеток (BCMA)/4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в предупреждении или лечении заболевания, связанного с BCMA, 4-1BB или обоими из них.

【Техническое решение】

Далее будет приведена подробная ссылка на примерные варианты осуществления, которые проиллюстрированы на прилагаемых графических материалах, на которых одинаковые ссылочные позиции по всему документу относятся к одинаковым элементам. В этом отношении представленные примерные варианты осуществления могут иметь различные формы и не должны рассматриваться как ограничивающие описания, изложенные в данном документе. Соответственно, примерные варианты осуществления просто описаны ниже со ссылками на графические материалы для пояснения аспектов настоящего изобретения. Используемый в данном документе термин "и/или" включает любые и все комбинации одного или нескольких связанных перечисленных элементов. Такие выражения, как "по меньшей мере один из", когда они предшествуют перечню элементов, изменяют весь перечень элементов и не изменяют отдельные элементы перечня.

В соответствии с аспектом настоящего изобретения биспецифическое антитело к антигену созревания В-клеток (BCMA)/4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент включает антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент.

Термин "антитело" взаимозаменяемо используют с термином "иммуноглобулин (Ig)". Полное антитело имеет структуру, включающую две полноразмерные легкие цепи и две полноразмерные тяжелые цепи, которые соединены дисульфидными (SS) связями. Антитело может представлять собой, например, IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. Антитело может быть моноклональным антителом или поликлональным антителом. Антитело может быть антителом животного происхождения, химерным антителом мыши-человека, гуманизированным антителом или человеческим антителом.

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту полной структуры иммуноглобулина, который может быть частью полипептида, в том числе

антигенсвязывающим сайтом. Например, антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой scFv, (scFv)₂, Fv, Fab, Fab', Fv F(ab')₂ или их комбинацию.

Существует пять типов тяжелых цепей, обозначаемых γ , δ , α , μ и ϵ . Тип тяжелой цепи определяет класс антитела. Каждая цепь тяжелых цепей α и γ типов состоит из примерно 450 аминокислот, тогда как каждая цепь μ и ϵ состоит из примерно 550 аминокислот. Каждая тяжелая цепь имеет две области, т. е. переменную область и константную область.

Существует два типа легких цепей, обозначаемых λ и κ . Каждая легкая цепь состоит из примерно 211–217 аминокислот. Каждое антитело человека содержит только один тип легкой цепи. Каждая легкая цепь содержит два последовательных домена, в том числе одну константную область и одну переменную область.

Переменная область относится к области антитела, которая связывается с антигеном.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно модифицировать. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно модифицированы путем конъюгирования или связывания, гликозилирования, прикрепления метки или их комбинации. Антитело может быть конъюгировано с другими лекарственными средствами, как, например, противораковым лекарственным средством. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы с пероксидазой хрена (HRP), щелочной фосфатазой, гаптеном, биотином, стрептавидином, флуоресцентным материалом, радиоактивным материалом, квантовыми точками, полиэтиленгликолем (ПЭГ), гистиридиновой меткой или их комбинацией. Флуоресцентный материал может представлять собой ALEXA FLUOR®532, ALEXA FLUOR®546, ALEXA FLUOR®568, ALEXA FLUOR®680, ALEXA FLUOR®750, ALEXA FLUOR®790 или ALEXA FLUOR™350.

Антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент

Антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать переменную область тяжелой цепи, включающую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10-21, переменную область легкой цепи, включающую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22-32 и 54-64, или переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи.

Антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать переменную область тяжелой цепи, включающую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81-91, переменную область легкой цепи, включающую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 92-97, или переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи.

Переменная область тяжелой цепи антитела к BCMA или его антигенсвязывающего фрагмента может включать определяющую комплементарность область-H1 (CDR-H1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 10-13; CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 14-17; и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18-21. Термин "определяющая комплементарность область (CDR)" относится к сайту варибельной области антитела, который придает специфичность связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном.

Варибельная область легкой цепи антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента может включать определяющую комплементарность область-L1 (CDR-L1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22-25 и 54-62; и CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 26-28; и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 29-32, 63 и 64.

Антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть выбраны из группы, состоящей из:

(1) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-H1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10, CDR-H2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14, а также CDR-H3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18;

(2) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-H1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, CDR-H2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, а также CDR-H3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 19;

(3) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-H1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, CDR-H2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, а также CDR-H3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 20; и

(4) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-H1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR-H2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, а также CDR-H3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21.

Антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть выбраны из группы, состоящей из:

(1) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29;

(2) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, а также CDR-

характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 63;

(13) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 64;

(14) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 61, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 63;

(15) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 61, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 64;

(16) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 62, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 63; и

(17) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 62, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 64.

Антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5.

Антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-9 и 41-53.

Антиген созревания В-клеток (BCMA) может представлять собой полипептид ВСМА или его фрагмент. ВСМА может также называться представителем 17 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF17), BCM, CD269, TNFRSF13A или представителем 17 надсемейства рецепторов TNF. Полипептид ВСМА может включать аминокислотную последовательность под номером доступа в GenBank NP_001183 (человек) или аминокислотную последовательность под номером доступа в GenBank NP_035738 (мышь). Полипептид ВСМА может включать аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом под номером доступа в GenBank NM_001192 (человек) или под номером доступа в GenBank NM_011608 (мышь). Фрагмент может представлять собой полипептид, содержащий любую часть аминокислотной последовательности полипептида ВСМА.

Антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент могут характеризоваться

аффинностью к полипептиду ВСМА или его фрагменту, с обеспечением таким образом специфического связывания с ВСМА.

Антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент могут ингибировать связывание между белком ВСМА и веществом, специфически связывающимся с белком ВСМА. Вещества, которые специфически связываются с белком ВСМА, также могут называться лигандами, например фактор активации В-клеток, принадлежащий к семейству факторов некроза опухоли (BAFF), лиганд А, индуцирующий пролиферацию (APRIL) или их комбинация.

Антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент

Вариабельная область тяжелой цепи антитела к 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента может включать CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81-83; CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 84-86; и CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 87-91.

Вариабельная область легкой цепи антитела к 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента может включать CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 92 и 93; CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 94 и 95; и CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 96 и 97.

Антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть выбраны из группы, состоящей из:

(1) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-H1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 81, CDR-H2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84, а также CDR-H3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 87;

(2) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-H1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 81, CDR-H2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84, а также CDR-H3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 88;

(3) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-H1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 81, CDR-H2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84, а также CDR-H3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 89;

(4) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-H1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 82, CDR-H2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 85, а также CDR-H3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 90; и

(5) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-H1,

характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83, CDR-H2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 86, а также CDR-H3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 91.

Антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть выбраны из группы, состоящей из:

(1) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 94, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 96; и

(2) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 93, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 95, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 97.

Антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть выбраны из группы, состоящей из:

(1) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 94, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 96; и

(2) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 93, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 95, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 97.

Антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73-80.

4-1BB может представлять собой полипептид 4-1BB или его фрагмент. 4-1BB может также называться CD137, CDw137, ILA, представителем 9 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF9) или представителем 9 надсемейства рецепторов TNF. Полипептид 4-1BB может включать аминокислотную последовательность под номером доступа в GenBank NP_001552 (человек) или аминокислотную последовательность под номером доступа в GenBank NP_001070976, NP_001070977 или NP_035742 (мышь). Полипептид BCMA может включать аминокислотную последовательность, кодируемую полинуклеотидом под номером доступа в GenBank NM_001561 (человек) или под номером доступа в GenBank NM_001077508, NM_001077509 или NM_011612 (мышь). Фрагмент может представлять собой полипептид, содержащий любую часть аминокислотной последовательности полипептида 4-1BB.

Антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент могут характеризоваться аффинностью к полипептиду 4-1BB или его фрагменту, с обеспечением таким образом

специфического связывания с 4-1BB. Антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент способны усиливать иммунный ответ и/или обеспечивать лечение опухоли (рака) у млекопитающего. Антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуется локализацией и/или активацией только в микроокружении опухоли (ТМЕ) и/или значительным снижением гепатотоксичности по сравнению с ранее существовавшими антителами к 4-1BB при сохранении эффективности усиления иммунного ответа и/или обеспечения лечения опухоли.

Биспецифическое антитело к ВСМА/4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент

В биспецифическом антителе к ВСМА/4-1BB или его антигенсвязывающем фрагменте каждое из антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента и антитела к 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента независимо представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или человеческое антитело.

В биспецифическом антителе один из нацеливающегося на ВСМА фрагмента и нацеливающегося на 4-1BB фрагмента может представлять собой полноразмерное антитело, а другое может представлять собой антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), содержащий CDR тяжелой цепи, CDR легкой цепи или их комбинацию. Полноразмерное антитело, нацеливающееся на один из белков ВСМА и 4-1BB, и антигенсвязывающий фрагмент, нацеливающийся на другой белок, могут быть химически связаны (например, ковалентно связаны) непосредственно или посредством пептидного линкера. Антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) может быть связан непосредственно или посредством пептидного линкера с N-концом полноразмерного антитела (например, с N-концом легкой цепи или тяжелой цепи полноразмерного антитела), С-концом полноразмерного антитела (например, С-концом тяжелой цепи (или доменом Fc или CH3) полноразмерного антитела) или обоими этими концами (см. фиг. 1).

Биспецифическое антитело к ВСМА/4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент может дополнительно включать по меньшей мере один пептидный линкер. Термин "пептидный линкер" может включать любые аминокислоты от 1 до 100, в частности от 2 до 50, и любые типы аминокислот могут быть включены без каких-либо ограничений. Пептидный линкер может включать пептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело может содержать полноразмерное антитело к ВСМА, антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) антитела к 4-1BB и пептидный линкер между ними. В другом варианте осуществления биспецифическое антитело может содержать полноразмерное антитело к 4-1BB, антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) антитела к ВСМА и пептидный линкер между ними.

В биспецифическом антителе к ВСМА/4-1BB или его антигенсвязывающем фрагменте антитело может представлять собой IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. Антитело может быть

моноклональным антителом или поликлональным антителом. Антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой scFv, (scFv)₂, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или их комбинацию. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент модифицированы путем конъюгирования или связывания, гликозилирования, прикрепления метки или их комбинации.

В одном варианте осуществления scFv, содержащийся в биспецифическом антителе, может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи в любом порядке. Например, scFv, содержащийся в биспецифическом антителе, может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи в направлении от N-конца к C-концу и, необязательно, пептидный линкер между ними, или, в качестве альтернативы, scFv, содержащийся в биспецифическом антителе может содержать переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи в направлении от N-конца к C-концу и необязательно пептидный линкер между ними.

Биспецифическое антитело к BCMA/4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент могут быть представлены в форме IgG-scFv, триомаба, IgG с выступами во впадины (kih) с общей легкой цепью, кроссмаба, IgG с орто-Fab, иммуноглобулина с двойным переменным доменом (DVD-Ig), 2 в 1-IgG, scFv2-Fc, би-наноантитела, биспецифического активатора Т-клеток (BiTE), tandAb, антитела с двойной аффинностью (DART) с перенаправлением, DART-Fc, scFv-человеческий сывороточный альбумин (HSA)-scFv, (DNL)-Fab3 док-и-замок, минителя, scFv-Fc, scFv-молнии, scFv, Fab, Fab2 (биспецифический), Fab3 (триспецифический), scFab, Bis-scFv (биспецифический), sdAb (VH/VHH), тетратела, триатела, диатела, Ig верблюда, IgNAR, IgG, биспецифической конструкции, содержащей выступ во впадину, биспецифической конструкции, содержащей диатело, четырехвалентного мультиспецифического антитела, четырехвалентной конструкции, четырехвалентной конструкции с двойным переменным доменом (DVD), четырехвалентной конструкции IgGScv, четырехвалентной конструкции Mbatryn или составного антитела или их комбинации.

Биспецифическое антитело к BCMA/4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент может активировать передачу сигналов с участием 4-1BB в зависимости от экспрессии BCMA на поверхности клеток.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения заболевания, связанного с BCMA, 4-1BB или обоими из них, включает биспецифическое антитело к BCMA/4-1BB или антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из вышеописанных вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

BCMA, 4-1BB, биспецифическое антитело к BCMA/4-1BB и антигенсвязывающий фрагмент являются такими же, которые описаны выше.

Заболевание, связанное с BCMA, 4-1BB или обоими из них, может представлять собой рак. Рак может представлять собой солидный рак или несолидный рак. Виды солидного рака относятся к заболеваемости раковыми опухолями в солидных органах, таких как печень,

легкие, молочная железа или кожа, тогда как виды несолидного рака относятся к видам рака, поражающим кровь, и поэтому называются раком крови. Например, рак может быть выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака кожи, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака толстой кишки, колоректального рака, рака желудка, рака яичника, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака матки, рака печени, рака почки, светлоклеточной саркомы, меланомы, цереброспинальных опухолей, рака головного мозга, тимомы, мезотелиомы, рака пищевода, рака желчевыводящих путей, рака яичка, зародышевого рака, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака шейки матки, рака эндометрия, лимфомы, миелодиспластических синдромов (МДС), миелофиброзов, острого лейкоза, хронического лейкоза, множественной миеломы, болезни Ходжкина, эндокринного рака и саркомы.

Термин "предупреждение" относится к любому действию, которое подавляет или отсрочивает начало заболевания, связанного с ВСМА, 4-1ВВ или обоими из них, путем введения фармацевтической композиции. Термин "лечение" относится к любому действию, которое облегчает симптомы заболевания, связанного с ВСМА, 4-1ВВ или обоими из них, путем введения фармацевтической композиции.

Фармацевтическая композиция может включать фармацевтически приемлемый носитель. Носитель может пониматься как вспомогательное вещество, разбавитель или адъювант. Например, носитель может быть выбран из группы, состоящей из лактозы, декстрозы, сахарозы, сорбита, маннита, ксилита, эритрита, мальтита, крахмала, каучука акации, альгината, желатина, фосфата кальция, силиката кальция, целлюлозы, метилцеллюлозы, поливинилпирролидона, воды, физиологического раствора, буфера, как, например, фосфатно-солевого буфера (PBS), метилгидроксibenзоата, пропилгидроксibenзоата, талька, стеарата магния, глицина, гистидина, серина, полисорбата и минерального масла. Фармацевтическая композиция может включать наполнитель, антикоагулянт, смазывающее вещество, смачивающее средство, ароматизатор, эмульгатор, консервант или их комбинацию.

Фармацевтическая композиция может быть составлена в любой форме с использованием любого распространенного в уровне техники способа. Например, фармацевтическая композиция может быть составлена в виде дозированной формы для перорального введения (например, порошки, таблетки, капсулы, сиропы, пилюли или гранулы) или лекарственной формы для парентерального введения (например, для инъекций). Фармацевтическая композиция может быть получена в составе для системной доставки или в составе для местной доставки.

Фармацевтическая композиция может дополнительно включать противораковое лекарственное средство. Противораковое лекарственное средство может представлять собой цетуксимаб, панитумумаб, эрлотиниб, gefитиниб, трастузумаб, T-DM1, пертузумаб, лапатиниб, паклитаксел, тамоксифен, цисплатин, антитело к CTLA-4, антитело к PD-1, антитело к PD-L1, 5-фторурацил (5FU), гемцитабин или их комбинацию. Фармацевтическая

композиция может включать одну композицию или отдельные композиции. Например, биспецифическое антитело к ВСМА/4-1ВВ или его антигенсвязывающий фрагмент фармацевтической композиции может представлять собой композицию в лекарственной форме для парентерального введения, а противораковое лекарственное средство может представлять собой композицию в лекарственной форме для перорального введения.

Фармацевтическая композиция может включать эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, противораковое лекарственное средство или их комбинацию. Используемый в данном документе термин "эффективное количество" относится к количеству, достаточному для предупреждения или лечения заболевания, связанного с ВСМА, 4-1ВВ или обоими из них, при введении индивидууму, нуждающемуся в таком предупреждении или лечении. Эффективное количество может быть соответствующим образом выбрано специалистом в данной области в зависимости от выбранной клетки или индивидуума. Например, эффективное количество может быть определено в зависимости от тяжести заболевания, возраста пациента, массы тела, состояния здоровья, пола, чувствительности пациента к лекарственным средствам, продолжительности введения, пути введения, скорости выведения, продолжительности лечения и других факторов, в том числе применение лекарственного средства в комбинации с фармацевтической композицией или одновременно с ней, и другие факторы, известные в области медицины. Эффективное количество может составлять от приблизительно 0,5 мкг до приблизительно 2 г фармацевтической композиции.

Доза фармацевтической композиции может составлять, например, от приблизительно 0,001 мкг/кг до приблизительно 100 мкг/кг при введении взрослому человеку. Количество введений может составлять, например, от одного или нескольких раз в день, от одного раза в неделю до одного раза в четыре недели или от одного до двенадцати раз в год.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения способ предупреждения или лечения заболевания, связанного с ВСМА, 4-1ВВ или обоими из них, у индивидуума включает введение биспецифического антитела к ВСМА/4-1ВВ или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вышеописанных вариантов осуществления индивидууму.

ВСМА, 4-1ВВ, биспецифическое антитело к ВСМА/4-1ВВ, антигенсвязывающий фрагмент, предупреждение и лечение такие же, как описаны выше.

Индивидуум может представлять собой млекопитающее, например человека, обезьяну, корову, лошадь, свинью, собаку, овцу, козу или кошку. Индивидуум может представлять индивидуума, который страдает заболеванием, связанным с ВСМА, 4-1ВВ или обоими из них, или который восприимчив к заболеванию, которое может представлять собой рак.

Способ может дополнительно включать введение противоракового лекарственного средства индивидууму, нуждающемуся в этом. Противораковое лекарственное средство можно вводить одновременно, отдельно или последовательно с биспецифическим антителом к ВСМА/4-1ВВ или его антигенсвязывающим фрагментом в соответствии с любым из описанных выше примерных вариантов осуществления.

Например, биспецифическое антитело к ВСМА/4-1ВВ или его антигенсвязывающий фрагмент, противораковое лекарственное средство или их комбинация могут быть непосредственно введены индивидууму любым способом, например с помощью перорального, внутривенного, внутримышечного, чрескожного, слизистого, интраназального, внутритрахеального или подкожного введения. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, противораковое лекарственное средство или их комбинацию можно вводить системно или местно. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, противораковое лекарственное средство или их комбинацию можно вводить отдельно или вместе с фармацевтически активным соединением.

Доза биспецифического антитела к ВСМА/4-1ВВ или его антигенсвязывающего фрагмента, противоракового лекарственного средства или их комбинации может варьироваться в зависимости от состояния пациента, массы тела, тяжести заболевания, состава лекарственного средства, пути введения и продолжительности введения и могут быть надлежащим образом выбраны специалистом в данной области. Например, доза антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, противоракового лекарственного средства или их комбинации может составлять от приблизительно 0,001 мкг/кг до приблизительно 100 мкг/кг при введении взрослому человеку. Количество введений может составлять, например, от одного или нескольких раз в день, от одного раза в неделю до одного раза в четыре недели или от одного до двенадцати раз в год.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предусмотрено биспецифическое антитело к антигену созревания В-клеток (ВСМА)/4-1ВВ или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вышеописанных вариантов осуществления для применения в предупреждении или лечении заболевания, связанного с ВСМА, 4-1ВВ или обоими из них.

ВСМА, 4-1ВВ, биспецифическое антитело к ВСМА/4-1ВВ, антигенсвязывающий фрагмент, предупреждение, лечение и заболевание, связанное с ВСМА, 4-1ВВ или обоими из них являются такими же, как описаны выше.

【Благоприятные эффекты】

Как описано выше, согласно одному или нескольким иллюстративным вариантам осуществления предложено биспецифическое антитело к ВСМА/4-1ВВ или его антигенсвязывающий фрагмент, а также их применение. Биспецифическое антитело к ВСМА/4-1ВВ или его антигенсвязывающий фрагмент можно эффективно применять для предупреждения или лечения заболевания, связанного с ВСМА, 4-1ВВ или обоими из них.

【Описание графических материалов】

Эти и/или другие аспекты станут очевидными и более понятными из следующего описания примерных вариантов осуществления в сочетании с прилагаемыми графическими материалами, на которых представлено следующее.

На фиг. 1 представлена схематическая диаграмма биспецифического антитела согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 2a-2c представлены графики, демонстрирующие результаты теста на связывание с целевым белком с применением DACE, а на фиг. 2d-2f представлены графики, демонстрирующие результаты теста на связывание с клеточной поверхностью с применением системы FACS.

На фиг. 3a-3d представлены графики, демонстрирующие результаты репортерного биологического анализа 4-1BB.

На фиг. 4a-4c представлены графики, демонстрирующие результаты исследования с использованием PBMC.

На фиг. 5a представлены графики, демонстрирующие результаты теста на связывание с целевым белком с применением DACE (5D5 WT и мутанты 5D5), на фиг. 5b представлены графики, демонстрирующие результаты теста на связывание с целевым белком с применением DACE (5A6 WT и мутанты 5A6), на фиг. 5c представлен график, демонстрирующий результаты теста на связывание с целевым белком с применением DACE (WT и мутанты), а на фиг. 5d представлены графики, демонстрирующие результаты теста на связывание с клеточной поверхностью с применением системы FACS (WT и мутанты).

На фиг. 6a-6c представлены графики, демонстрирующие результаты теста активации 4-1BB *in vitro*.

На фиг. 7 представлен график, демонстрирующий результаты теста перекрестной реактивности на обезьянах с помощью DACE.

На фиг. 8a-8c представлены графики, демонстрирующие ингибирование роста опухоли посредством биспецифического антитела BCMAx4-1BB у гуманизированных мышей NOG, несущих H929.

На фиг. 9a представлены изображения, демонстрирующие инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), а на фиг. 9b представлены графики, демонстрирующие результаты анализа инфильтрирующих опухоль лимфоцитов. Также

на фиг. 10a и фиг. 10b представлены графики, демонстрирующие отдельные результаты ($n=3$) и результаты суммирования ($n=3$) фармакокинетики биспецифических антител к BCMA/4-1BB у яванского макака, соответственно.

На фиг. 11 представлены графики, демонстрирующие профиль роста опухоли при введении биспецифических антител к BCMA/4-1BB (* $P<0,05$; ** $P<0,01$).

【Принцип изобретения】

Один или несколько вариантов осуществления настоящего изобретения будут подробно описаны со ссылкой на следующие примеры. Однако эти примеры предназначены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема одного или нескольких вариантов осуществления настоящего изобретения.

Пример 1. Получение моноклональных антител к ВСМА

1-1. Получение антигена

Антигены для получения антител к ВСМА получали следующим образом. Полипептиды, содержащие аминокислотные остатки 5-54, 1-51, 1-54 и 4-48, соответственно, с N-конца аминокислотной последовательности ВСМА человека (номер доступа в GenBank NP_001183.2, SEQ ID NO: 1), использовали в качестве антигенов.

В частности, антиген, содержащий аминокислотные остатки 5-54 человеческого ВСМА (GENSCRIPT®, Z02731) ("человеческий ВСМА (5-54)"); антиген, содержащий аминокислотные остатки 1-51 человеческого ВСМА (полученный в собственной лаборатории, экспрессированный в клетках CHO), слитые с Fc-областью человеческого IgG1 ("человеческий ВСМА-Fc (1-51)"); антиген, содержащий аминокислотные остатки 1-54 человеческого ВСМА, слитые с Fc-областью, и His-метку на его C-конце (10620-H03H, Sino Biological Inc.) ("человеческий ВСМА-Fc/His (1-54)"); и антиген, содержащий аминокислотные остатки 4-48 человеческого ВСМА (полученный в собственной лаборатории, экспрессированный в клетках HEK293), слитые с Fc-областью ("человеческий ВСМА-Fc (4-48)").

Человеческий ВСМА-Fc (4-48) получали следующим образом. Полинуклеотиды, кодирующие аминокислотные остатки 4-48 ВСМА человека, клонировали в pAB1-Fc, который представляет собой вектор экспрессии клеток животных, включающий промотор CMV. Клонированный вектор трансформировали в клетки HEK293E, и человеческий ВСМА-Fc (4-48) очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А. Человеческий ВСМА-Fc (1-51) получали так же, как описано выше.

1-2. Получение фаговой библиотеки и сортировка фагового дисплея

Клетки фаговой библиотеки с одноцепочечными вариабельными фрагментами (ScFv) человеческого происхождения (Mol. Cells OT, 225-235, February 28, 2009), которые способны связываться с различными антигенами. Полученную фаговую библиотеку инфицировали фагом-хелпером, а затем индуцировали упаковку фагов. После этого продукт культивирования центрифугировали при 4500 об./мин. в течение 15 минут при 4°C, а затем в супернатант добавляли 4% (вес/объем) ПЭГ 6000 (Fluka, 81253) и 3% (вес/объем) NaCl (Sigma, S7653) и хорошо растворяли с последующей инкубацией на льду в течение 1 часа. Полученный продукт центрифугировали при 4°C при 8000 об./мин. в течение 20 минут, осадки суспендировали в PBS, а затем снова центрифугировали при 4°C при 12000 об./мин. в течение 10 минут для получения супернатанта, содержащего библиотечный фаг. Полученный библиотечный фаг перед использованием хранили при 4°C.

Сортировку выполняли в общей сложности три раза следующим образом для скрининга антител, которые реагируют с человеческим ВСМА или перекрестно реагируют с человеческим ВСМА и ВСМА обезьяны. 5 мкл антигена, полученного в соответствии с примером 1-1, добавляли в иммунопробирку (maxisorp 444202) и инкубировали при 4°C в

течение 16 часов для покрытия поверхности пробирки белком. Супернатант удаляли и добавляли бычий сывороточный альбумин (BSA) для блокирования неспецифического связывания.

10¹² КОЕ фаговой библиотеки, полученных в соответствии с примером 1-2, смешивали с 1,5% (масса/объем) BSA, и смесь добавляли в пробирку для иммунологического анализа, покрытую целевым белком, и подвергали реакции при 37°C в течение 1 часа, чтобы обеспечить связывание специфического в отношении ВСМА фага с целевым белком. Впоследствии, после многократного промывания раствором PBS-T (забуференный фосфатом солевой раствор, включающий 0,05% (об./об.) Tween 20), фаги, связанные с ВСМА, извлекали с использованием 100 мМ раствора триэтиламина. Восстановленные фаги нейтрализовали 1М трис-буфером (pH 7,4), затем их инфицировали K12 ER2738 *Escherichia coli*, и фаги снова выделяли. Этот цикл, включающий целевое связывание, элюирование, нейтрализацию, инфицирование и выделение, повторяли четыре раза. По мере прохождения раунда сортировки количество процессов промывки с использованием PBS-T увеличивали для амплификации и концентрации антигенспецифического фага.

1-3. Скрининг фаговых антител с одним клоном

Была проведена процедура скрининга одного клона фагового антитела для выбора из фагового пула моноклонального антитела, которое специфически связывается с ВСМА.

В частности, фаговый пул, полученный в соответствии с примерами 1-2, последовательно разбавляли и культивировали на твердой среде, содержащей LB-тетрациклин/кабенициллин, для получения одиночных колоний. Каждую колонию культивировали на 96-луночном планшете так, чтобы OD₆₀₀ составляла от 0,5 до 0,7. В каждую лунку добавляли 20 MOI вспомогательного фага и обеспечивали проведение реакции при 37°C в течение 1 часа. После этого в каждую лунку добавляли канамицин и инкубировали в течение ночи при 30°C. На следующий день культуру центрифугировали и собирали ее супернатант, а затем проводили ELISA для отбора специфических в отношении ВСМА фагов. Каждую лунку планшета для ELISA покрывали 100 нг рекомбинантного ВСМА, а затем инкубировали с PBS-B (3% BSA, содержащим PBS) для предупреждения неспецифического связывания. После этого планшет промывали с помощью PBS. Полученный одиночный клон фага добавляли в каждую лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 часа, после чего планшет трижды промывали PBS-T. Для обнаружения связанных фагов в каждую лунку добавляли антитело к гемагглюнину (HA), конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP). После стадии промывки с помощью PBS-T добавляли тетраметилбензидин (TMB, Sigma, T0440). Отбирали клоны, которые имеют поглощение 0,5 или более при длине волны 450 нм, а также поглощение по меньшей мере в 5 раз выше, чем у контроля с одним только HRP к HA. Были отобраны четыре клон антител (B58, 5B5, 5D5 и 5A6), которые специфически связываются с человеческим ВСМА.

Из нуклеотидных последовательностей, кодирующих выбранные антитела,

аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 2-5) и аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO: 6-9) анализировали и определяющие комплементарность области (CDR) определяли в соответствии с определением Kabat. Определенные аминокислотные последовательности CDR (N->C) тяжелых цепей и легких цепей показаны в таблицах 1 и 2, соответственно.

【Таблица 1】

Антитело	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
B58	NYDMS (SEQ ID NO: 10)	WIYPSDSSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 14)	RGPFANKYRQFDY (SEQ ID NO: 18)
5B5	GHYWS (SEQ ID NO: 11)	TVSGSGGDTFYADSVKG (SEQ ID NO: 15)	RGHSVMDV (SEQ ID NO: 19)
5D5	DYGLSE (SEQ ID NO: 12)	LIDSSGSSTFYADSVKG (SEQ ID NO: 16)	KEHGLFDS (SEQ ID NO: 20)
5A6	NYGVH (SEQ ID NO: 13)	YISYSGGTYYNPSLKS (SEQ ID NO: 17)	RDSDDFGFDY (SEQ ID NO: 21)

【Таблица 2】

Антитело	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
B58	SGSSSNIGSNSVS (SEQ ID NO: 22)	ADSKRPS (SEQ ID NO: 26)	GSWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 29)
5B5	RASQGIDSYVA (SEQ ID NO: 23)	DASLRAT (SEQ ID NO: 27)	QQYNSWPI (SEQ ID NO: 30)
5D5	KASQDIDDDIN (SEQ ID NO: 24)	DASLRAT (SEQ ID NO: 27)	QQSLRTPI (SEQ ID NO: 31)
5A6	QGDSLRSYYVN (SEQ ID NO: 25)	DHSKRPT (SEQ ID NO: 28)	QSYDSSTV (SEQ ID NO: 32)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие вариабельные области тяжелой цепи, и нуклеотидные последовательности, кодирующие вариабельные области легкой цепи, показаны в таблице 3 ниже.

【Таблица 3】

Антитело	Нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи	Нуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область легкой цепи
B58	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 37
5B5	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 38
5D5	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 39
5A6	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 40

1-4. Получение антител IgG к ВСМА из выбранных фагов к ВСМА

Синтезировали полинуклеотиды, имеющие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, выбранные согласно примерам 1-3. Полученные полинуклеотиды клонировали в векторы культуры клеток животных (вектор экспрессии тяжелой цепи: pAB1-НС и вектор экспрессии легкой цепи: pAB1-LC). Всего было получено 8 векторов, содержащих полинуклеотиды, кодирующие тяжелые и легкие цепи для каждого из четырех клонов антител (B58, 5A6, 5D5 и 5B5). Каждый из полученных векторов для pAB1-НС содержал последовательность типа IgG1.

Клетки CHO-S культивировали в среде CD-CHO (Gibco, 10743) и полученные векторы вводили в клетки CHO-S с использованием полиэтиленимина (PEI). Трансдуцированные клетки CHO-S культивировали в среде CD-CHO в течение приблизительно 7 дней при 8% CO₂, при 37°C при встряхивании (110 об./мин.).

После сбора культивированного супернатанта его пропускали через колонку MabSelect SuRe (GE Healthcare, 5 мл), уравновешенную уравновешивающим буфером (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl) для обеспечения связывания экспрессируемого антитела с колонкой. Антитело элюировали раствором 50 mM Na-цитрата (pH 3,4) и 100 mM NaCl, а затем нейтрализовали с помощью 1M Трис-HCl (pH 9,0) до получения конечного pH 7,2. Затем буфер заменяли PBS (pH 7,4), а антитела IgG к ВСМА B58, 5A6, 5D5 и 5B5 хранили при 4°C до использования.

1-5. Получение мутаций 5A6 и 5D5

Для повышения продуктивности выбранных антител 5A6 и 5D5 получали мутированные антитела в соответствии с последовательностями нуклеотидов в таблице 3 путем мутации одного или двух аминокислотных остатков в CDR легкой цепи антитела.

Аминокислотные последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 мутантных антител 5D5 и мутантных антител 5A6 показаны в таблице 4 и таблице 5, соответственно. В таблицах 4 и 5 выделенные подчеркиванием и жирным шрифтом аминокислотные остатки представляют собой мутантные компоненты (WT: дикий тип, LM: мутанты легкой цепи). Вариабельные области легкой цепи мутантных антител 5D5 и мутантных антител 5A6 имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 41-45 и SEQ ID NO: 46-53, соответственно.

【Таблица 4】

Антитело	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
5D5 WT	KASQDIDDDIN (SEQ ID NO: 24)	DASLRAT (SEQ ID NO: 27)	QQSLRTPI (SEQ ID NO: 31)
5D5 M1	KASQDIDNDIN (SEQ ID NO: 54)	DASLRAT (SEQ ID NO: 27)	QQSLRTPI (SEQ ID NO: 31)
5D5 M2	KASQDIDEDIN (SEQ ID NO: 55)	DASLRAT (SEQ ID NO: 27)	QQSLRTPI (SEQ ID NO: 31)
5D5 M3	KASQDIDADIN (SEQ ID NO: 56)	DASLRAT (SEQ ID NO: 27)	QQSLRTPI (SEQ ID NO: 31)
5D5 M4	KASQDIDDAIN (SEQ ID NO: 57)	DASLRAT (SEQ ID NO: 27)	QQSLRTPI (SEQ ID NO: 31)
5D5 M5	KASQDIDDEIN (SEQ ID NO: 58)	DASLRAT (SEQ ID NO: 27)	QQSLRTPI (SEQ ID NO: 31)

【Таблица 5】

Антитело	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
5A6 WT	QGDSLRSYYVN (SEQ ID NO: 25)	DHSKRPT (SEQ ID NO: 28)	QSYDSSTV (SEQ ID NO: 32)
5A6 M1	QGESLRSYYVN (SEQ ID NO: 59)	DHSKRPT (SEQ ID NO: 28)	QSYDSSTV (SEQ ID NO: 32)
5A6 M2	QGDALRSYYVN (SEQ ID NO: 60)	DHSKRPT (SEQ ID NO: 28)	QSYDSSTV (SEQ ID NO: 32)
5A6 M3	QGDSLRSYYVN (SEQ ID NO: 25)	DHSKRPT (SEQ ID NO: 28)	QSYESSTV (SEQ ID NO: 63)
5A6 M4	QGDSLRSYYVN (SEQ ID NO: 25)	DHSKRPT (SEQ ID NO: 28)	QSYDASTV (SEQ ID NO: 64)
5A6 M5	QGESLRSYYVN (SEQ ID NO: 61)	DHSKRPT (SEQ ID NO: 28)	QSYESSTV (SEQ ID NO: 63)
5A6 M6	QGESLRSYYVN (SEQ ID NO: 61)	DHSKRPT (SEQ ID NO: 28)	QSYDASTV (SEQ ID NO: 64)
5A6 M7	QGDALRSYYVN (SEQ ID NO: 62)	DHSKRPT (SEQ ID NO: 28)	QSYESSTV (SEQ ID NO: 63)
5A6 M8	QGDALRSYYVN (SEQ ID NO: 62)	DHSKRPT (SEQ ID NO: 28)	QSYDASTV (SEQ ID NO: 64)

Пример 2. Получение моноклональных антител к 4-1BB

2-1. Скрининг полных моноклональных антител человека к 4-1BB (сортировка

иммунопробирок фаговой библиотеки)

Для сортировки библиотеки в отношении целевых молекул было проведено в общей сложности четыре раунда сортировки с использованием иммунопробирок, покрытых 4-1BB.

Бактериальные колонии из 3^{то} цикла сортировки выращивали в среде SB, содержащей карбенициллин, в 96-луночной планшете до помутнения, после чего в каждую лунку добавляли 10¹¹ КОЕ вспомогательных фагов VCSM13. После 1-часового инфицирования при 37°C при осторожном встряхивании (80 об./мин.) добавляли 70 мкг/мл канамицина и клетки культивировали в течение ночи при 30°C при встряхивании при 200 об./мин.

На следующий день планшеты центрифугировали и супернатанты, содержащие фаги, добавляли в планшеты для ELISA, покрытые антигеном 4-1BB, заблокированные 3% (вес/объем) BSA в PBST. После 1-часовой инкубации при комнатной температуре планшеты трижды промывали с помощью PBST и добавляли антитело к M13. Планшеты инкубировали в течение 1 часа, трижды промывали с помощью PBST и измеряли активность связывания с использованием тетраметилбензидина (TMB).

Специфические в отношении 4-1BB антитела амплифицировали для секвенирования плазмидной ДНК. Области вариабельности тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL) анализировали для идентификации уникальных последовательностей и определения разнообразия последовательностей. Были отобраны три клона антител (41B01, 41B02 и AB41), которые специфически связываются с человеческим 4-1BB. Мутанты 41B01 M4, 41B01 M11, 41B01 M12, 41B01 M13 и 41B02 M1 получали из выбранных антител, как описано в примерах 1-5.

Из нуклеотидных последовательностей, кодирующих выбранные антитела, аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела (SEQ ID NO: 65-72) и аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO: 73-80) анализировали и определяли CDR в соответствии с определением Kabat. Определенные аминокислотные последовательности CDR (N->C) тяжелых цепей и легких цепей показаны в таблицах 6 и 7, соответственно.

【Таблица 6】

Антитело	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
41B01	SYDMS (SEQ ID NO: 81)	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 84)	DGQRNSMREFDY (SEQ ID NO: 87)
41B01 M4	SYDMS (SEQ ID NO: 81)	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 84)	DAQRNSMREFDY (SEQ ID NO: 88)
41B01 M11	SYDMS (SEQ ID NO: 81)	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 84)	DAQRQSMREFDY (SEQ ID NO: 89)
41B01 M12	SYDMS (SEQ ID NO: 81)	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 84)	DAQRNSMREFDY (SEQ ID NO: 88)

41B01 M13	SYDMS (SEQ ID NO: 81)	WISYSGGSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 84)	DAQRQSMREFDY (SEQ ID NO: 89)
41B02	GYDMS (SEQ ID NO: 82)	VIYPDDGNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 85)	HGGQEPTTESSSAYGMDG (SEQ ID NO: 90)
41B02 M1	GYDMS (SEQ ID NO: 82)	VIYPDDGNTYYADSVKG (SEQ ID NO: 85)	HGGQKPTTKSSSAYGMDG (SEQ ID NO: 90)
AB41	SYWMH (SEQ ID NO: 83)	EINPGNGIITNYNEKFKS (SEQ ID NO: 86)	SFTTARAFAY (SEQ ID NO: 91)

【Таблица 7】

Антитело	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
411501	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 92)	ADSHRPS (SEQ ID NO: 94)	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 96)
41B01 M4	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 92)	ADSHRPS (SEQ ID NO: 94)	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 96)
41B01 M11	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 92)	ADSHRPS (SEQ ID NO: 94)	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 96)
41B01 M12	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 92)	ADSHRPS (SEQ ID NO: 94)	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 96)
41B01 M13	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 92)	ADSHRPS (SEQ ID NO: 94)	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 96)
41B02	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 92)	ADSHRPS (SEQ ID NO: 94)	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 96)
41B02 M1	SGSSSNIGNNYVT (SEQ ID NO: 92)	ADSHRPS (SEQ ID NO: 94)	ATWDYSLSGYV (SEQ ID NO: 96)
AB41	RASQTISDYLH (SEQ ID NO: 93)	YASQSIG (SEQ ID NO: 95)	QDGHSPPT (SEQ ID NO: 97)

2-2. Антигенсвязывающие способности антител к 4-1BB в отношении человеческого 4-1BB

(1) Связывание антигена, измеренное с помощью ELISA

Для оценки антигенсвязывающей активности кандидатные антитела подвергали тесту ELISA. Вкратце, планшеты для микротитрования покрывали человеческим белком 4-1BB-Fc в концентрации 0,1 мкл/мл в PBS до 100 мкл/лунка при 4°C в течение ночи, затем блокировали 100 мкл/лунка 5% (вес/объем) BSA. В каждую лунку добавляли пятикратные разведения гуманизированных антител 41B01 и 41B02, начиная с 10 мкг/мл, и инкубировали в течение 1-2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали с помощью PBS/Tween и затем инкубировали с антителом козы к человеческому IgG, конъюгированным

с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки планшеты проявляли субстратом TMB и анализировали на спектрофотометре при OD 450-630 нм.

(2) Связывание клеток, измеренное с помощью FACS

Для оценки свойства связывания антигена кандидатные антитела анализировали в отношении их связывания с экспрессированным 4-1BB млекопитающих с помощью FACS. Вкратце, клетки 4-1BB-Jurkat инкубировали с антителами (41B01 и 41B02). После промывки буфером FACS (1% (мас./об.) BSA в PBS) в каждую лунку добавляли FITC-антитело к человеческому IgG и инкубировали при 4°C в течение 1 часа. MFI FITC оценивали с помощью FACS Caliber.

(3) Кинетика белка для 4-1BB

Чтобы исследовать кинетику связывания гуманизированного антитела, в этом примере выполняли ранжирование аффинности с использованием Octet Red 96. Как показано в таблице 8 ниже, 41B01 и 41B02.

【Таблица 8】

Антитело	KD (M)	кон. (1/мс)	kdis (1/с)	Chi	R2
41B01	1,80E-10	6,58E+05	1,19E-04	0,0392	0,9987
41B02	1,01E-09	5,95E+05	6,03E-04	0,0525	0,9973

Как показано в таблице 8, протестированные антитела к 4-1BB показали высокую аффинность связывания 4-1BB.

Пример 3. Характеристика биспецифических антител к ВСМА/4-1BB

3-1. Получение биспецифических антител к ВСМА/4-1BB

Различные кандидатные биспецифические антитела к ВСМА/4-1BB получали в формате полноразмерных IgG (антитело к ВСМА)-scFv(антитело к 4-1BB), которые представлены в таблице 9. Константная область антитела к ВСМА, содержащаяся в биспецифическом антителе, все же может быть модифицирована путем введения более чем одной мутации или изменения в человеческом IgG1. Например, была введена мутация NA (N297A).

【Таблица 9】

Биспецифическое антитело	Формат
B58(NA)x41B01	(NA)_(G4S)3_41B01 VH_(G4S)4_41B01 VL
B58(NA)x41B02	(NA)_(G4S)3_41B02 VL_(G4S)4_41B02 VH
B58(NA)xAB41	(NA)_(G4S)3_AB41 VL_(G4S)4_AB41 VH
5A6(NA)x41B01	(NA)_(G4S)3_41B01 VH_(G4S)4_41B01 VL
5A6(NA)x41R02	(NA)_(G4S)3_41B02 VL_(G4S)4_41B02 VH
5A6(NA)xAB41	(NA)_(G4S)3_AB41 VL_(G4S)4_AB41 VH
5D5(NA)x41B01	(NA)_(G4S)3_41B01 VH_(G4S)4_41B01 VL
5D5(NA)x41B02	(NA)_(G4S)3_41B02 VL_(G4S)4_41B02 VH
5D5(NA)xAB41	(NA)_(G4S)3_AB41 VL_(G4S)4_AB41 VH
5B5(NA)x41B01	(NA)_(G4S)3_41B01 VH_(G4S)4_41B01 VL
5B5(NA)x41B02	(NA)_(G4S)3_41B02 VL_(G4S)4_41B02 VH
5B5(NA)xAB41	(NA)_(G4S)3_AB41 VL_(G4S)4_AB41 VH
5D5(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH
5D5M1(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH
5D5M2(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH
5D5M3(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH
5D5M4(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH
5D5M5(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH
5A6(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH
5A6M1(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH
5A6M2(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH
5A6M3(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH
5A6M4(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH
5A6M5(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH
5A6M6(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH
5A6M7(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH
5A6M8(NA)x41B01 M12	(NA)_(GS)9_41B01 M12 VL_(G4S)4_41B01 M12 VH

Клоны IgG к BCMA и scFv к 4-1BB, полученные в примере 1 и примере 2, соответственно, были выбраны в качестве примера для получения биспецифических антител к BCMA/4-1BB в форме слияния IgG-scFv, в которых фрагмент антитела scFv одного антигена, слит с С-концом IgG другого антигена. Когда BCMA помещали в часть полного IgG, использовали IgG1 с ADCC, редуцированным мутантным остовом (мутация N297A; Cancer Cell, vol.19, issue 1, pp.101-113 и т. д.), а когда 4-1BB помещали в часть полного IgG, использовали IgG4. Аминокислотные последовательности IgG к BCMA и scFv к 41BB представлены в таблице 10 и таблице 11, соответственно.

【Таблица 10】

А нт ит ел о	Ко мп оне нт ы	Аминокислотная последовательность _HC : Fc(NA)
В 58	В С М А - т я ж е л а я ц е п ь	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMSWVRQAPGKGLEWVSWIYPSDSSI YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAYYYCARGPFANKYRQFDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPYTVSWNSGAITSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYTCNYNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMFSTRPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSWLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 100)
	В С М А - л е г к а я ц е п ь	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNSVSWYQQLPGTAPKLLIYADSRRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCGSIDYSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSYT LFPPSSEELQANKATLYCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 101)
5	В	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGHYWSWVRQAPGKGLEVVSTVSGSGGD

B 5	C	TFYADSYKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGHSVMDVWGQGTLVTV
	M	SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
	A	SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
	-	GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
Т	я	EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLGDKEYRCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
	ж	PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSWLYSKLT
е	л	VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 102)
	а	
я	ц	
	е	
п	б	
	Б	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQGIDSYVAWYQQKPGQAPRLLIYDASLRATGIPD
	C	RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYN SWPITFGQGTKLEIKRTVAAPSYFIFPPS
	M	DEQLKSGTASWCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
	A	TL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 103)
	-	
л	е	
	г	
к	а	
	я	
ц	е	
	п	
б	Б	EVQLLES GGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYGLSWVRQAPGKGLEWVSLIDSSGSSTF
	C	YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEHGLFDSWGQGTLVTVSSA
5	M	STKGPSWPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
	A	LYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
	-	SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
	Т	ASTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
я	ж	EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSPFLYSKLTVDK
	е	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 104)

Л а я ц е п ь	
В С М А - л е г к а я ц е п ь	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQDIDDDINWYQQKPGQAPRLLIYDASLRATGIPD RPSGSGSGTDPTLTISRLEPEDFAVYYCQQSLRTPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 105)
5 D 5 M M 1 т я ж е л а я ц е п ь	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGLSWVRQAPGKGLEWVSLIDSSGSSTF YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEHGLFDSWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSTWTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSWLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 104)

B C M A - л е г к а я ц е п ь	EIVLTQSPGTL SLSPGERATL SCKASQDIDNDINWYQQKPGQAPRLLIYDASLRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSLRTPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 106)
5 D 5 M M 2 - т я ж е л а я ц е п ь	EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSDYGLSWVRQAPGKGLEWVSLIDSSGSSTF YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEHGLFDSWGQGT LVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRWSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS SDGSWLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 104)
B C M A - л е г	EIVLTQSPGTL SLSPGERATL SCKASQDIDEDINWYQQKPGQAPRLLIYDASLRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSLRTPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 107)

	К а я ц е п ь	
5 D 5 M 3	B C M A - т я ж е л а я ц е п ь	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGLSWVRQAPGKGLEWVSLJDSSGSSTF YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEHGLFDSWGQGT LVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSVNSGALTSGVHTFPA YLQSSG LYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRWSVLT VLVHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSWLYSKLTVD KSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 104)
	B C M A - л е г к а я ц е п ь	EIVLTQSPGTL SLSPGERATL SCKASQDIDADINWYQQKPGQAPRL LIYDASLRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSLRTPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNF'YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 108)

5	B	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SDYGLSWVRQAPGKGLEWVSLIDSSGSSTF
D	C	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEHGLFDSWGQGT
5	M	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
M	A	IXSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK	KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
4	-	SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV	KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
	Т	ASTYRWSVLT	TVLHQDILNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
	я	EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	TPPVLDSDGSWLYSKLTVDKS
	ж	RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	(SEQ ID NO: 104)
	е		
	л		
	а		
	я		
	ц		
	е		
	п		
	ь		
	B	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATLSC
	C	RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAYYYCQQSLRTPITFGQGT	KLEIKRTVAAPSYFIFPPSD
	M	EQLKSGTASWCLLN	NFYPREAKYQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
	A	SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	(SEQ ID NO: 109)
	-		
	л		
	е		
	г		
	к		
	а		
	я		
	ц		
	е		
	п		
	ь		
5	B	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SDYGLSWVRQAPGKGLEWVSLIDSSGSSTF
D	C	YADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEHGLFDSWGQGT
5	M	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
M	A	LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK	KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
5	-	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEY	KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
	Т	YASTYRVVSVLT	TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
	я	REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	TPPVLDSDGSWLYSKLTV
	ж	KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	(SEQ ID NO: 104)

е л а я ц е п ь	
Б С М А - л е г к а я ц е п ь	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCASQDIDDEINWYQQKPGQAPRLLIYDASLRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSLRTPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASYVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 110)
5 А 6 А - т я ж е л а я ц е п ь	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGVHWVRQAPGKGLEWVSYISYSGGT YYNPSLKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSDDFGFDYWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKIHTCP PCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRWSVLT TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIERTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGPYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSWLYSKLTV DKSRWQQGNYPFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 111)

5 A 6 M 1	B	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCQGDSLRSYVNWYQQLPGTAPKLLIYDHSKRPTGVDP
	C	RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSTWFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP
	M	PSSEELQANKATLVCLISOFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYL
	A	SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECs (SEQ ID NO: 112)
	-	
	л	
	е	
	г	
	к	
	а	
5 A 6 M 1	B	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGVHWVRQAPGKGLEWVSYISYSGGT
	C	YYNPSLKSRTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAYYYCARSDDDFGFDYWGQGTILTV
	M	SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
	A	SSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNHNKPSNTKVD RKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
	-	GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFN VYVDGVEVHNAKTKPREE
	т	QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P
	я	PSREEMTKNQVSLTCLVKGPYPSPDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSWLYSKLT
	ж	VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 111)
	е	
	л	
5 A 6 M 1	B	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCQGESLRSYVNWYQQLPGTAPKLLIYDHSKRPTGVDP
	C	RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSTVVFSGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF
	M	PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSY
	A	LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECs (SEQ ID NO: 113)
	-	
	л	
	е	
	г	
	к	
	а	

	К а я ц е п ь	
5 A 6 M 2	B C M A - т я ж е л а я ц е п ь	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGVHWVRQAPGKGLEWVSYISYSGGT YYNPSLKSRTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSDDFGFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSWLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGR (SEQ ID NO: 111)
	B C M A - л е г к а я ц е п ь	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCQGDALRSYYVNWYQQLPGTAPKLLIYDHSKRPTGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSTVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO: 114)

5	B	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGVHWVRQAPGKGLEWVSYISYSGGT
A	C	YYNPSLKSRTISRDNNSKNILYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSDDFGFDYWGQGLTVTV
6	M	SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
M	A	SSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
3	-	GGPSVFLFPPRPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	Т	EQYASTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
	я	PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSWLYSKLT
	ж	VDKSRWWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGR (SEQ ID NO: 111)
	е	
	л	
	а	
	я	
	ц	
	е	
	п	
	ь	
	B	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCQGDSLRSYYVNWYQQLPGTAPKLLIYDHSKRPTGVPD
	C	RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYESSTWFGGGTKLTVLGQPRAAPSVTLFP
	M	PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYL
	A	SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO: 115)
	-	
	л	
	е	
	г	
	к	
	а	
	я	
	ц	
	е	
	п	
	ь	
5	B	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGVHWVRQAPGKGLEWVSYISYSGGT
A	C	YYNPSLKSRTISRDNNSKNLTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSDDFGFDYWGQGLTVTV
6	M	SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
M	A	SSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
4	-	GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	Т	EQYASTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
	я	PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSWLYSKLT
	ж	VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGR (SEQ ID NO: 111)

	е л а я ц е п ь	
	Б С М А - л е г к а я ц е п ь	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCQGDSLRSYYVNWYQQLPGTAPKLLIYDHSKRPTGVDPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDASTVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO: 116)
5 А 6 М М 5 т я ж е л а я ц е п ь	Б С М А - т я ж е л а я ц е п ь	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGVHWVRQAPGKGLEWVSYISYSGGT YYNPSLKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAYYYCARDSDDFGFDYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNYNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLT PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSWLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 111)

	B	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCQGESLRSYYVNWYQQLPGTAPKLLIYDHSKRPTGVPD
	C	RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYESSTVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF
	M	PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSY
	A	LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO: 117)
	-	
	л	
	е	
	г	
	к	
	а	
5	B	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGVHWVRQAPGKGLEWVSYISYSGGT
	C	YYNPSLKSRTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSDDFGFDYWGQGTTLVTV
	M	SSASTKGPSVPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYPPPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
	A	SSGLYSLSSWTPSSSLGTQTYICNYNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
	-	GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	т	EQYASTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLF
	я	PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSWLYSKLT
	ж	VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 111)
	е	
	л	
6	B	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCQGESLRSYYVNWYQQLPGTAPKLLIYDHSKRPTGVPD
	C	RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDASTVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF
	M	PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSY
	A	LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO: 118)
	-	
	л	
	е	
	г	

	К а я ц е п ь	
5 A 6 M 7	B C M A - т я ж е л а я ц е п ь	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGVHWYRQAPGKGLEWVSYISYSGGT YYNPSLKSRTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSDDFGFDYWGQGT SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNYNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRWSVLT PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPYLDSDGSWLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 111)
	B C M A - л е г к а я ц е п ь	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCQGDALRSYYVNWYQQLPGTAPKLLIYDHSKRPTGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYESSTVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSRQSNKYMSSYL SLTPEQWRSHRSYSCQVTHEGSTYEKTVAPAECS (SEQ ID NO: 119)

5	B	EYQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGVHWVRQAPGKGLEWYSYISYSGGT
A	C	YYNPSLKSRTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSDDFGFDYVGQGLVTV
6	M	SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
M	A	SSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNYNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
8	-	GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEYKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
	т	EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
	я	PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVUISDGSWLYSKLT
	ж	VDKSRWQQGNYFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 111)
	е	
	л	
	а	
	я	
	ц	
	е	
	п	
	ь	
	B	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCQGDALRSYYVNWYQQLPGTAPKLLIYDHSKRPTGVPD
	C	RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDASTVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF
	M	PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSY
	A	LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTYEKTVAPAEC (SEQ ID NO: 120)
	-	
	л	
	е	
	г	
	к	
	а	
	я	
	ц	
	е	
	п	
	ь	

【Таблица 11】

А	Аминокислотная последовательность (конструкции VL-L-VH)
н	
т	
и	
т	
е	

11 0	
s c F V 4 1 B 0 1	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLRSBDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWI SYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDY WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 121)
s c F V 4 1 B 0 1 M 4	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWI SYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDY WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 122)
s c F V 4 1 B 0 1 M 1 1	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWI SYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRQSMREFDY WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 123)
s c F V	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVPGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSIMSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYW

4	GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 124)
1	
B	
0	
1	
M	
1	
2	
s	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDR
c	FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGG
F	GGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWI
V	SYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD AQRQSMREFDY
4	WGQTLVTVSS (SEQ ID NO: 125)
1	
B	
0	
1	
M	
1	
3	
s	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDR
c	FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGG
F	GGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVI
V	YPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSS
4	AYGMDGWGQGT L VTVSS (SEQ ID NO: 126)
1	
B	
0	
2	
s	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDR
c	FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGG
F	GGSGGGGSEVQLLRSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWSVIY
V	PDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAY
4	GMDGWGQGT L VTVSS (SEQ ID NO: 127)
1	
B	
0	
2	

M	
l	
s	DIVMTQSPAFLSVTPGERVTITCRASQTISDYLHWYQQKPDQAPKLLIKYASQSIGIPSRFS
c	GSGSGTDFTFITSSLEAEDAATYYCQDGHSFPPTFGCGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSG
F	GGGSQYQLQQSGAEVIKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQCLEWIGEINPGN
V	GHTNYNEKFKSRATLTGDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARSFTTARAFAYWGQGLV
A	TVSS (SEQ ID NO: 128)
B	
4	
l	

Сегмент 1 ДНК, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела IgG биспецифического антитела к BCMA/4-1BB, встраивали в pcDNA 3.4 (Invitrogen, A14697; плазмида 1), а сегмент 2 ДНК, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь антитела IgG биспецифического антитела к BCMA/4-1BB, встраивали в pcDNA 3.4 (Invitrogen, A14697; плазмида 2). После этого сегмент 3 ДНК, кодирующий scFv, подвергали слиянию с частью сегмента 1 ДНК, соответствующей с-концу Fc-области антитела IgG, встроенной в плазмиду 1, с использованием сегмента 4 ДНК, кодирующего линкерный пептид, состоящий из 15 аминокислот в длину, состоящий из (GGGGS)4 (SEQ ID NO: 98) или с использованием сегмента 5 ДНК, кодирующего линкерный пептид длиной 18 аминокислот, состоящий из (GS)9 (SEQ ID NO: 99), для конструирования векторов для экспрессии биспецифических антител. Кроме того, чтобы стабилизировать scFv, как описано в примере 2, применяли дополнительную модификацию для создания дисульфидного мостика слияния VL103-VH44 (VL103: VL, имеющий мутацию G->C в положении 103; VH 44: VH, имеющий мутацию G->C в положении 44) к С-концу легкой цепи и С-концу тяжелой цепи соответственно.

Аминокислотные последовательности полученных биспецифических антител представлены в таблице 12.

【Таблица 12】

Б	Ко	Аминокислотная последовательность	Аминокислотная последовательность
и	мп		биспецифического антитела
с	он		
п	ен		
е	т		
ц			
и			
ф			
и			
ч			

нS		
к)		
е9		
р		
сV	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIG	
сH	NNYVTWYQQLPGIAPKLLIYADSHRPSG	
F4	VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY	
v1	YCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGG	
aB	SGGGGSGGGGSGGGGSEYQLLES GGGL	
н0	VQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVR	
т1	QAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVK	
иM	GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAY	
т1	YYCARDAQRNSMREFDYWGQGLVTV	
е2	SS (SEQ ID NO: 124)	
лV		
aL		
к-		
4(		
-G		
1G		
EG		
EG		
S		
)		
4		
-		
4		
1		
B		
0		
1		
M		
1		
2		
лJB	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCKASQDID	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCKASQDID
ееC	DAINWYQQKPGQAPRLLIYDASLRATGI	DAINWYQQKPGQAPRLLIYDASLRATGI
ггM	PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY	PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY
ккA	CQQSLRTPITFGQGTKLEIKRTYAAPSVFI	CQQSLRTPITFGQGTKLEIKRTYAAPSVFI
иa-	FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAR	FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAR

йял кше оег мпк пъа оая ннц ете нип тть е л а к Б С М А	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 109)	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 109)
5 А 6 М 6(Н А) х4 1 В 01 М 12 е т ни п т т е (л а к) Б	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSNYGVHWVRQAPGKGLEWVSYISYSG GTYYNPSLKSRTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARSDDDFGFDYWGQG TLYTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AAIGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSYVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDRT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPETCVVYDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRWSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGWSLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 111)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSNYGVHWVRQAPGKGLEWVSYISYSG GTYYNPSLKSRTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARSDDDFGFDYIGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDRTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYASTYRWSVLT LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSWLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GSGSGSGSGSGSGSGSGSQSVLTQPPSAS GTPGQRTVISCSSSSNIGNNYVTWYQQ LPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL SGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGG

C		GSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS
M		CAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWV
A		SWISYSGGSIYYADSVKGRPTISRDNSKN
Л		TLYIQMNSLRAEDTAVYYCARDQRNS
и		MREFI)YWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:
G	GSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:	130)
н	99)	
S		
к		
)		
е		
9		
p		
V		
H		
4		
1		
B		
0		
s		
1		
c		
M		
F		
1		
v		
2		
a	QSYLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIG	
V	NNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSG	
н	VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY	
L	YCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGG	
T	SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGL	
-	VQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVR	
и	QAPGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSYK	
(	GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV	
G	YYCARDQRNSMREFDYWGQGTTLVTV	
T	SS (SEQ ID NO: 124)	
e		
G		
л		
G		
a		
G		
к		
S		
4)		
-		
4		
1-		
E		
4		
E		
1		
B		
0		
1		
M		
1		
2		

3-2. Антигенсвязывающая способность антител к ВСМА/4-1BB (полноразмерная форма IgG) в отношении нацеливания белка

(1) Связывание антигена, измеренное с помощью DACE (ELISA с двойным захватом антигена)

Для оценки антигенсвязывающей активности кандидатные антитела подвергали тесту ELISA. Вкратце, планшеты для микротитрования покрывали человеческим белком ВСМА-Fc в концентрации 0,5 мкг/мл в PBS до 100 мкл/лунка при 4°C в течение ночи, а затем

блокировали 100 мкл/лунка 1% (вес/объем) BSA. В каждую лунку добавляли трехкратные разбавления биспецифических антител, начиная с 20 мкг/мл, и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Планшеты промывали PBS/Tween, а затем инкубировали с 1% (вес/объем) BSA, содержащим человеческий белок 4-1BB his, 0,8 мкг/мл, в течение 1 часа при 37°C. Планшеты промывали с помощью PBST (0,05% (об./об.) Tween 20 в PBS). Затем планшет проявляли с подложкой TMB и анализировали на спектрофотометре при OD 450-630 нм.

Как показано на фиг. 2а-2с, все биспецифические антитела могут одновременно связываться с человеческими белками BCMA и 4-1BB дозозависимым образом. Значения EC50 (нМ) суммированы в таблице 13.

【Таблица 13】

Антитело		EC50 (нМ)		
BCMA	4-1BB	41B01	41B02	AB41
	5A6 (NA)	0,359	2,22	0,763
	5D5 (NA)	0,392	1,27	0,475
	5B5 (NA)	0,683	5,57	0,636
	B58 (NA)	0,335	1,34	0,349

(2) Тест в отношении связывания с клеточной поверхностью с помощью проточной цитометрии

Для оценки свойства связывания антигена кандидатные антитела анализировали в отношении их связывания с клетками, экспрессирующими BCMA, с помощью FACS. Вкратце, клетки CHOK1, экспрессирующие BCMA человека (CHOK1-hBCMA), или клетки H929, экспрессирующие эндогенный BCMA, обрабатывали 100 нМ указанных антител при 4°C в течение 1 часа. Клетки CHOK1 применяли для BCMA-отрицательного контроля. После промывки буфером FACS (1% (мас./об.) BSA в PBS) клетки инкубировали с FITC-антителом к IgG человека при 4°C в течение 1 ч, а затем подвергали анализу FACS. Как показано на фиг. 2d-2f, антитела к BCMAx4-1BB связываются с экспрессирующими BCMA клеточными линиями CHOK1-hBCMA и H929, но не с отрицательными по BCMA клетками CHOK1. Этот результат означает, что биспецифические антитела к BCMA/4-1BB могут специфически связываться с антигеном, нацеленным на опухоль (BCMA). Результаты с фиг. 2d-2f количественно определены и обобщены в таблице 14.

【Таблица 14】

Антитела		Клеточная линия		
		H929	CHOK1	CHOK1-hBCMA
Только клетки		2,51	2,6	3,13
2ое контрольное Ab		3,24	2,66	3,65
5A6 (NA)	x41B01 (1A10)	43,8	3,06	652

5D5 (NA)		17,9	2,74	579
5B5 (NA)		17,6	3,37	493
B58 (NA)		45,8	3,45	662
5A6 (NA)	xAB41	39,9	3,23	636
5D5 (NA)		19,7	2,88	585
5B5 (NA)		14,1	3,38	477
B58 (NA)		49,8	3,71	652
5A6 (NA)	x41B02 (1A12)	40,3	3,07	646
5D5 (NA)		20,2	2,99	602
5B5 (NA)		14,9	3,19	484
B58 (NA)		41,6	6,01	644

3-3. Тест в отношении активации *in vitro* 4-1BB биспецифических антител к ВСМА/4-1BB (репортерный биологический анализ 4-1BB)

В этом анализе в качестве эффекторных клеток применяли клеточную линию GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat, генетически модифицированную для стабильной экспрессии человеческого 4-1BB и люциферазного нижеследующего элемента, а раковые клетки, экспрессирующие или не экспрессирующие ВСМА, применяли в качестве целевых клеток. Вкратце, планшет CHOK1-hBCMA (положительные по ВСМА, $2,5 \times 10^4$) или CHOK1 (отрицательные по ВСМА, $2,5 \times 10^4$) в белом 96-луночном планшете для анализа в 100 мкл культуральной среды каждый. Культивирование проводили в течение ночи при 37°C в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂. После культивирования в течение ночи удаляли 100 мкл культуральной среды и распределяли 25 мкл среды для анализа (RPMI1640, содержащая 1% (об./об.) FBS) на предварительно высеянные целевые клетки. В случае суспензионных клеток, планшет с H929 (положительная по ВСМА, $2,5 \times 10^5$) или Jurkat (отрицательная по ВСМА, $2,5 \times 10^5$) в белом 96-луночном планшете для анализа в 25 мкл среды для анализа. 25 мкл каждого биспецифического антитела (начиная с 50 нМ, разбавленные в 5 раз, или 200 нМ, разбавленные в 4 раза) добавляли в планшет. Клеточную линию GLORESPONSE™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat собирали и ресуспендировали в среде для анализа. Вносили 25 мкл клеточной линии GLORESPONSE™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat для получения $2,5 \times 10^4$ клеток на лунку планшета. Культивирование проводили в течение 6 ч при 37°C в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂. Во время инкубации реагент BIO-GLO™ восстанавливали в соответствии с инструкциями производителя. Через 6 ч. инкубации добавляли 75 мкл реагента BIO-GLO™ на лунку в планшет для анализа. Ожидали 5 минут и измеряли люминесценцию с помощью считывателя микропланшетов. Логистическую кривую с четырьмя параметрами оценивали с помощью программного обеспечения GraphPad. Экспериментальные результаты с использованием клеток CHOK1-hBCMA, CHOK1, H929 и Jurkat показаны на фиг. 3а-3д, соответственно.

Как показано на фиг. 3а-3d, протестированные биспецифические антитела ВСМАх4-1ВВ продемонстрировали более сильную активацию сигнала 4-1ВВ в присутствии опухолевого антигена (ВСМА) по сравнению с моноклональными антителами к 4-1ВВ в отдельности или нанесенными перекрестно связанными 4-1ВВ. А также BMUR, который представляет собой агонистическое моноклональное антитело к 4-1ВВ (эталонное антитело), характеризовался эффектом активации *in vitro* 4-1ВВ в отсутствие ВСМА (фиг. 3b и 3d).

Это означает, что антитела к ВСМА/4-1ВВ могут действовать специфически только в присутствии экспрессирующих ВСМА раковых клеток, но не агонистических антител к 4-1ВВ. Результаты с фиг. 3а-3d количественно определены и обобщены в таблицах 15 и 16 (таблица 15: СНОК1-hВСМА (EC50, нМ), таблица 16: H929 (EC50, нМ)).

【Таблица 15】

	xAB41	x41B01	x41B02	BMUR
5A6 (NA)	0,0397	0,0616	0,0413	0,1025
5D5 (NA)	0,0426	0,0691	0,0314	
5B5 (NA)	0,0741	0,0316	0,003	

【Таблица 16】

	x41B01	x41B02	BMUR
5A6(NA)	3.164	14.34	0.069
5D5(NA)	5.354	10.92	
5B5(NA)	5.756	12.11	

3-4. Тест в отношении активации *in vitro* 4-1ВВ биспецифических антител к ВСМА/4-1ВВ (тест с применением РВМС человека)

РВМС человека культивировали совместно с клеточной линией СНОК1 (не экспрессирующей человеческий ВСМА) или генетически модифицированной СНОК1-hВСМА (стабильно экспрессирующей человеческий ВСМА) в присутствии антитела к человеческому CD3 и антител для тестирования. Вкратце, РВМС высевали по 3×10^4 клеток на лунку, а либо СНОК1, либо СНОК1-hВСМА высевали совместно по 1×10^4 клеток на лунку. В лунки планшета добавляли биспецифические антитела (начиная с 20 нМ, разведенные в 4 раза) и моноклональные антитела (начиная с 26,67 нМ, разведенные в 4 раза). После культивирования концентрацию секретируемого IFN-гамма в супернатанте измеряли с помощью набора Human IFN-gamma Quantikine (система R&D, SIF50).

Как показано на фиг. 4а-4с антитела к ВСМА/4-1ВВ индуцировали большее высвобождение цитокинов, чем моноклональные антитела или BMUR (агонистическое моноклональное антитело к 4-1ВВ).

3-5. Сравнение активности связывания целевого белка (дикий тип по сравнению с мутантными)

Чтобы стабилизировать биспецифические антитела к BCMA/4-1BB, в CDR тяжелой цепи или легкой цепи антитела вносили одну или несколько точечных мутаций в аминокислотные последовательности, как показано в таблице 4. Для оценки антигенсвязывающей активности кандидатные антитела (клоны дикого типа и мутантные клоны) подвергали тесту DACE (ELISA с двойным захватом антигена), как выполнено в примере 3-2(1). Полученные результаты показаны на фиг. 5a-5b.

Как показано на фиг. 5a-5b, все биспецифические антитела могут одновременно связываться с человеческими белками BCMA и 4-1BB дозозависимым образом. Было обнаружено, что несколько мутантов улучшают связывание с целевым белком. Среди мутантов 5D5M4(NA)x41B01 M12 и 5A6M6(NA)x41B01 M12 проявляли превосходную антигенсвязывающую активность по сравнению с клоном дикого типа (фиг. 5c). Для оценки свойства связывания нативного антигена 5D5M4(NA)x41B01 M12 и 5A6M6(NA)x41B01 M12 анализировали в отношении их связывания с BCMA, экспрессируемым у млекопитающих, с помощью FACS, как выполнено в примере 2-2(2). Как показано на фиг. 5d, 5D5M4(NA)x41B01 M12 и 5A6M6(NA)x41B01 M12 проявляли повышенную активность связывания нативного антигена по сравнению с диким типом. Результаты теста на связывание с белками и теста на связывание с клетками количественно определены и обобщены в таблицах 17 и 18 (таблица 17: связывание с белками (EC50, нМ)).

【Таблица 17】

	Антитело	EC50 (нМ)
Фиг. 5a (слева)	5D5(NA)x41B01 M12 : WT	0,496
	5D5M1(NA)x41B01 M12	0,542
	5D5M2(NA)x41B01 M12	0,580
	5D5M3(NA)x41B01 M12	0,468
Фиг. 5a (справа)	5D5(NA)x41B01 M12 : WT	0,547
	5D5M4(NA)x41B01 M12	0,418
	5D5M5(NA)x41B01 M12	0,507
Фиг. 5b (слева)	5A6(NA)x41B01 M12 : WT	0,545
	5A6M1(NA)x41B01 M12	0,355
	5A6M2(NA)x41B01 M12	0,698
	5A6M3(NA)x41B01 M12	0,356
Фиг. 5b (средняя часть)	5A6(NA)x41B01 M12 : WT	0,397
	5A6M4(NA)x41B01 M12	0,356
	5A6M5(NA)x41B01 M12	0,249
	5A6M6(NA)x41B01 M12	0,291
Фиг. 5b (справа)	5A6(NA)x41B01 M12 : WT	0,334

	5A6M7(NA)x41B01 M12	0,325
	5A6M8(NA)x41B01 M12	0,304

【Таблица 18】

Антитело	MFI	MFI мутантной формы/MFI для WTx100
5D5M4(NA)x41B01 M12	64,8	172,8%
5A6M6(NA)x41B01 M12	102	101,0%

3-6. Аффинность связывания мутантных биспецифических антител с целевыми белками BCMA и 4-1BB (SPR)

В эксперименте SPR биспецифические антитела к BCMA/4-1BB, полученные в примерах 3-5, были отдельно захвачены проточными кюветами 2, 3 и 4, сохраняя проточную кювету 1 в качестве эталона на чипе с белком А, на котором путем связывания с амином было иммобилизовано биспецифическое антитело к BCMA/4-1BB (5D5M4(NA)X41B01 M12 или 5A6M6(NA)X41B01 M12). Рекомбинантный человеческий белок BCMA или человеческий белок 4-1BB пропускали через чип в диапазоне концентраций от 100 нМ до 6,25 нМ для человеческого BCMA или от 250 нМ до 15,625 нМ для человеческого 4-1BB и 0,78 нМ при 30 мкл/мин в течение 300 секунд с последующей фазой диссоциации 400 секунд. Регенерацию проводили с помощью 10 mM глицин-HCl (pH 2,0). Полученные результаты показаны в следующих таблицах 19 и 20. Как показано в таблицах 19 и 20, 5D5M4(NA)X41B01 M12 и 5A6M6(NA)X41B01 M12 проявляли высокую аффинность в отношении BCMA и 4-1BB (таблица 19: результат измерения аффинности для 5D5M4(NA)X41B01 M12, таблица 20: результат измерения аффинности для 5A6M6(NA)X41B01 M12).

【Таблица 19】

Мишень	Ka (x105, 1/мс)	Kd (x10-2, 1/с)	KD (x10-8, M)	Rmax (RU, мишень = 12,5 RU)
hBCMA	40,69	6,503	1,602	13,18
h4-1BB	2,361	9,461	4,009	53,78

【Таблица 20】

Мишень	Ka (x105, 1/мс)	Kd (x10-2, 1/с)	KD (x10-8, M)	Rmax (RU, мишень = 12,5 RU)
hBCMA	5,272	1,186	2,257	13,42
h4-1BB	2,379	9,732	4,102	52,61

3-7. Тест в отношении активации *in vitro* 4-1BB для мутантных биспецифических антител

Кандидатные антитела анализировали в отношении их активности 4-1BB *in vitro* с использованием системы набора Promega, как в примере 2-3.

Как показано на фиг. 6а-6с, мутантный формат биспецифических антител к ВСМА/4-1BB показал улучшенную эффективность по сравнению с форматом дикого типа в положительных по ВСМА раковых клетках, в то время как все клоны не активировали передачу сигнала с участием 4-1BB в отрицательные по ВСМА раковых клетках (Jurkat) (таблица 21: результат активации 4-1BB *in vitro* (EC₅₀, нМ)). Таким образом, 5D5M4(NA)X41B01 M12 и 5A6M6(NA)X41B01 M12 показали улучшенную опосредованную мишенью активацию 4-1BB.

【Таблица 21】

Название антитела	H929	MM1S
5D5WT(NA)x41B01 M12	0,629	2,66
5D5M4(NA)x41B01 M12	0,377	2,41
5A6WT(NA)x41B01 M12	0,459	2,26
5A6M6(NA)x41B01 M12	0,165	1,98

3-8. Тест перекрестной реактивности в отношении мутантных биспецифических антител у обезьян

Для оценки перекрестной реактивности кандидатные антитела (5D5M4(NA)X41B01 M12 и 5A6M6(NA)X41B01 M12) подвергали тесту ELISA. Вкратце, планшеты для микротитрования покрывали белком Rhesus BCMA-Fc (50 нг/лунка) при 4°C в течение ночи, затем блокировали 200 мкл/лунка PBSB (1% (мас./об.) BSA в PBS). В каждую лунку добавляли трехкратные разведения 5D5M4(NA)X41B01 M12 и 5A6M6(NA)X41B01 M12, начиная со 100 нМ, и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Планшеты промывали PBST (0,05% (об./об.) Tween20 в PBS) и затем инкубировали в течение 1 часа при 37°C с белком Rhesus 4-1BB-His (80 нг/лунку). Планшеты промывали PBST (0,05% (об./об.) Tween20 в PBS) и затем инкубировали с HRP (пероксидазой хрена), конъюгированными антителами к his, в течение 1 часа при 37°C. После промывки планшеты проявляли субстратом TMB и анализировали на спектрофотометре при 450-630 нм. Как показано на фиг. 7, 5D5M4(NA)X41B01 M12 и 5A6M6(NA)X41B01 M12 связываются с ВСМА и 4-1BB Rhesus одновременно дозозависимым образом (таблица 22: связывание с белками (EC₅₀, нМ)).

【Таблица 22】

Антитело	EC ₅₀ (нМ)
5D5M4(NA)x41B01 M12	0,926
5A6M6(NA)x41B01 M12	1,66

3-9. Ингибирование роста опухоли мутантными биспецифическими антителами у гуманизированных мышей NOG, несущих H929

Противоопухолевый эффект антитела к BCMA/4-1BB тестировали на гуманизированных мышах NOG, которым вводили клетки H929. Вкратце, клетки H929 вводили путем подкожной инъекции клеток NCI-H929 (5×10^6) в правый бок 74 необлученных самок животных. На день 11 очищенные Т-клетки (10×10^6) от трех доноров вводили внутривенно мышам. Когда опухоли достигали среднего объема 154 мм^3 (на день 12), животных рандомизировали на четыре группы по 14 мышей в каждой. Мышам внутривенно вводили Q3D пять раз (пятикратная инъекция антитела каждые три дня) следующие антитела: контрольный тип IgG человека (7,5 мг/кг без инъекций Т-клеток: изотипический контроль_7,5 мг/кг_без PBMC), контрольный тип IgG человека (7,5 мг/кг: изотипический контроль_7,5 мг/кг), биспецифическое антитело к BCMA/к 4-1BB (5D5M4(NA)X41B01 M12, 10 мг/кг) и биспецифическое антитело к BCMA/4-1BB (5A6M6(NA)X41B01 M12, 10 мг/кг). Объемы опухоли контролировали с помощью штангенциркуля дважды в неделю в течение всего эксперимента, и полученные результаты показаны на фиг. 8а-8с. Как показано на фиг. 8а и 8б, 5D5M4(NA)X41B01 M12 и 5A6M6(NA)X41B01 M12 показали значительный противоопухолевый эффект. Степень ингибирования роста опухоли (TGI %) составила 44,8% для 5D5M4(NA)X41B01 M12, 49,4% для 5A6M6(NA)X41B01 M12. Таким образом, эффективность двух биспецифических антител была одинаковой.

3-10. Анализ опухолеинфильтрирующих лимфоцитов (TIL)

Для оценки TIL, фиксированные формалином, залитые парафином срезы опухолевой ткани от мышей H929, несущих трансплантат hPBMC, подвергали иммуноокрашиванию антителом к CD45 (маркер лейкоцитов человека) и антителом к CD8 (маркер цитотоксических Т-лимфоцитов человека). Иммуногистохимическую методику выполняли с применением набора для обнаружения авидин-биотинола. Полученный результат показан на фиг. 9а и 9б. Как показано на фиг. 9а и 9б, биспецифические антитела к BCMA/4-1BB эффективно усиливали инфильтрацию иммунных клеток, включая клетки CD45+ и Т-клетки CD8+, в опухолевые ткани по сравнению с перитуморальными. Из этих результатов видно, что количество клеток CD45+ и CD8+ увеличивается в группе обработки биспецифическим антителом к BCMA/4-1BB, в частности в компартменте опухоли.

3-11. Фармакокинетика биспецифических антител к BCMA/4-1BB у яванского макака

10 мг/кг биспецифических антител к BCMA/4-1BB (5D5M4(NA)X41B01 M12 и 5A6M6(NA)X41B01 M12) инъектировали через подкожную вену яванским макакам. Образцы крови брали у каждого животного через бедренную вену перед введением дозы и через запланированные интервалы от 0,05 до 504 часов после введения дозы. Образцы крови центрифугировали для получения сыворотки крови. Концентрации

5D5M4(NA)X41B01 M12 и 5A6M6(NA)X41B01 M12 в сыворотке крови яванского макака измеряли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). 96-луночные планшеты покрывали белком BCMA-Fc человека, затем блокировали блокирующим буфером. После этого планшеты промывали и добавляли в них стандарты, образцы для контроля качества и образцы для исследования, а затем инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Затем планшеты снова промывали и инкубировали с белком 4-1BB-his человека. После промывки связанные молекулы обнаруживали с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена меченого антитела к His. Планшеты проявляли субстратом TMB и анализировали на спектрофотометре при оптической плотности 450-650 нм. Концентрации в образцах сыворотки определяли по стандартной кривой, построенной с использованием известных количеств 5D5M4(NA)X41B01 M12 и 5A6M6(NA)X41B01 M12 в соответствующей сыворотке яванского макака с использованием 4-параметрического алгоритма. Диапазон стандартной кривой для 5D5M4(NA)X41B01 M12 и 5A6M6(NA)X41B01 M12 составлял от 46 до 300000 нг/мл, а нижний предел количественного определения (LLOQ) был определен как 300 нг/мл. Фармакокинетические параметры оценивали по некомпартментной модели с использованием программного обеспечения WinNonlin (Phoenix WinNonlin 8.0). Полученный результат показан на фиг. 10a и 10b. Результаты на фиг. 10a и 10b количественно определены и обобщены в таблицах 23 и 24, соответственно (настройка WinNonlin, NCA, линейная трапецевидная линейная интерполяция, IV болюсная доза, время расчета периода полувыведения: от 24 ч. до 240 ч.). Из результатов видно, что 5D5M4(NA)X41B01 M12 имеет даже более высокие фармакокинетические свойства, чем 5A6M6(NA)X41B01 M12.

【Таблица 23】

Субъект	Кол-во образцов	Период полужизни (ч)	Период полужизни (дни)	Tmax (ч)	Cmax (мкг/мл)	CO (мкг/мл)	AUClast (ч*мкг/мл)	AUCINF_obs (ч*мкг/мл)	Cl_obs (мл/ч/кг)	Vss_obs (мл/кг)
№ 1	9	161,6	6,7	0,1	357,6	365,6	23750,4	35845,5	0,28	62,24
№ 2	9	150,8	6,3	0,1	270,1	273,4	22235,0	33335,5	0,30	64,33
№ 3	9	102,7	4,3	0,1	318,3	323,3	22978,7	27517,8	0,36	50,03
Среднее значение		138,4	5,8	0,1	315,3	320,8	22988,0	32232,9	0,31	58,87
SD		31.4	1.3	0.0	43.8	46.1	757.7	4271.9	0.04	7.73

【Таблица 24】

Субъект	Кол-во образцов	Период полужизни (ч)	Период полужизни (дни)	Tmax (ч)	Cmax (мкг/мл)	CO (мкг/мл)	AUClast (ч*мкг/мл)	AUCINF_obs (ч*мкг/мл)	Cl_obs (мл/ч/кг)	Vss_obs (мл/кг)
---------	--------------------	----------------------------	------------------------------	-------------	------------------	----------------	-----------------------	--------------------------	---------------------	--------------------

№ 4	9	82,3	3,4	0,1	254,0	255,6	18066,2	20446,6	0,49	54,39
№ 5	9	86,8	3,6	0,1	224,9	227,3	15369,3	17515,9	0,57	66,52
№ 6	9	46,4	1,9	0,1	234,6	237,6	15671,0	15877,5	0,63	49,92
Среднее значение		71,8	3,0	0,1	237,8	240,1	16368,8	17946,7	0,56	56,94
SD		22,1	0,9	0,0	14,8	14,3	1477,7	2314,8	0,07	8,59

3-12. Ингибирование роста опухоли биспецифическим антителом к BCMA/4-1BB у мышей с нокаутом 4-1BB, несущих сверхэкспрессированный BCMA MC38

In vivo противоопухолевую эффективность биспецифического антитела к BCMA/4-1BB оценивали с помощью системы с использованием мышей со сверхэкспрессией BCMA MC38, несущих нокаут 4-1BB человека (CRO: Biocytogen). Вкратце, клетки MC38-hBCMA (5×10^6) инокулировали путем подкожной инъекции в правый бок необлученных самок животных. На день 7, когда средний объем опухоли достигал 110 мкл, мышей рандомизировали на три группы (n=8/группа). Затем 7,5 мг/кг изотипического контрольного антитела (hIgG1) и 2 или 0,4 мг/кг биспецифического антитела к BCMA/4-1BB (5D5M4(NA)x41B01 M12) соответственно внутривенно вводили восемь раз с графиком дозирования Q3D (один раз в три дня). Чтобы получить результаты роста опухоли, объемы опухоли контролировали с помощью штангенциркуля дважды в неделю.

Полученные результаты показаны на фиг. 11 и в таблице 25. В таблице 25 представлены сводные результаты ингибирования роста опухоли для 5D5M4(NA)x41B01 M12 у мышей, несущих MC38-hBCMA с нокаутом 4-1BB (*P<0,05; **P<0,01). В таблице 25 Q3D относится к частоте дозирования один раз в три дня.

【Таблица 25】

Группа	Дозы	Частота и время введения доз	Объем опухоли (мм3) а		TGI (%)	Pb
			До обработки	24 день после обработки		
hIgG1	7,5 мг/кг	Q3D,8	106+3	2288+964	-	-
5D5M4(NA)x41B01 M12	0,4 мг/кг	Q3D,8	106+3	1253+737	47,4	*0,012
	2 мг/кг	Q3D,8	106+2	834+378	62,2	**0,0001

Как показано на фиг. 11 и в таблице 25, 5D5M4(NA)x41B01 M12 показал противоопухолевую эффективность. Скорость ингибирования роста опухоли (TGI%) составила около 62,2% для G2 (5D5M4(NA)x41B01 M12, 2 мг/кг) и около 47,4% для G3 (5D5M4(NA)x41B01 M12, 0,4 мг/кг). В целом биспецифические антитела к BCMA/4-1BB продемонстрировали превосходную противоопухолевую эффективность в отношении опухоли человека BCMA/MC38.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

【Пункт 1】

Биспецифическое антитело к антигену созреваения В-клеток (BCMA)/4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент и

антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент,

где антитело к BCMA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, включающую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10-21, переменную область легкой цепи, включающую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22-32 и 54-64, или переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи,

где антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, включающую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81-91, переменную область легкой цепи, включающую по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 92-97, или переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи.

【Пункт 2】

Биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где переменная область тяжелой цепи антитела к BCMA или его антигенсвязывающего фрагмента содержит:

определяющую комплементарность область-H1 (CDR-H1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10-13;

CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 14-17, и

CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18-21.

【Пункт 3】

Биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где переменная область легкой цепи антитела к BCMA или его антигенсвязывающего фрагмента содержит:

определяющую комплементарность область-L1 (CDR-L1), включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22-25 и 54-62,

CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 26-28, и

CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 29-32, 63 и 64.

【Пункт 4】

L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 64;

(16) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 62, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 63; и

(17) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 62, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 64.

【Пункт 6】

Биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1,

где антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5.

【Пункт 7】

Биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1,

где антитело к ВСМА или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-9 и 41-53.

【Пункт 8】

Биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где переменная область тяжелой цепи антитела к 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента содержит:

CDR-H1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81-83;

CDR-H2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 84-86, и

CDR-H3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 87-91.

【Пункт 9】

Биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где переменная область легкой цепи антитела к 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента содержит:

CDR-L1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 92 и 93;

CDR-L2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 94 и 95, а также

CDR-L3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 96 и 97.

【Пункт 10】

Биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из:

(1) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-H1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 81, CDR-H2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84, а также CDR-H3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 87;

(2) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-H1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 81, CDR-H2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84, а также CDR-H3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 88;

(3) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-H1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 81, CDR-H2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84, а также CDR-H3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 89;

(4) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-H1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 82, CDR-H2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 85, а также CDR-H3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 90; и

(5) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-H1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83, CDR-H2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 86, а также CDR-H3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 91.

【Пункт 11】

Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из:

(1) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 94, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 96; и

(2) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего CDR-L1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 93, CDR-L2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 95, а также CDR-L3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 97.

【Пункт 12】

Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1,

где антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 65-72.

【Пункт 13】

Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1,

где антитело к 4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из

группы, состоящей из SEQ ID NO: 73-80.

【Пункт 14】

Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, дополнительно содержащий по меньшей мере один пептидный линкер.

【Пункт 15】

Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 14, где пептидный линкер содержит пептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99.

【Пункт 16】

Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1,

где антитело представляет собой IgA, IgD, IgE, IgG или IgM;

где антитело представляет собой моноклональное антитело или поликлональное антитело;

где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv, (scFv)₂, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или их комбинацию, или

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент модифицированы путем конъюгирования или связывания, гликозилирования, прикрепления метки или их комбинации.

【Пункт 17】

Биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1,

где каждое из антитела к ВСМА или его антигенсвязывающего фрагмента и антитела к 4-1BB или его антигенсвязывающего фрагмента независимо представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или человеческое антитело.

【Пункт 18】

Биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1,

где биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент представлены в форме IgG-scFv, триомаба, IgG с выступами во впадины (kih) с общими легкими цепями, кроссмаба, IgG с орто-Fab, иммуноглобулина с двойным варибельным доменом (DVD-Ig), 2 в 1-IgG, scFv₂-Fc, би-наноантитела, биспецифического активатора Т-клеток (BiTE), tandAb, антитела с двойной аффинностью с перенаправлением (DART), DART-Fc, scFv-человеческий сывороточный альбумин (HSA)-scFv, (DNL)-Fab3 док-и-замок, минитела, scFv-Fc, scFv-молнии, scFv, Fab, Fab2 (биспецифический), Fab3 (триспецифический), scFab, Bis-scFv (биспецифический), sdAb (VH/VHH), тетратела, триатела, диатела, Ig верблюда, IgNAR, IgG, биспецифической конструкции, содержащей выступ во впадину, биспецифической конструкции, содержащей диатело, четырехвалентного мультиспецифического антитела, четырехвалентной конструкции, четырехвалентной конструкции с двойным варибельным доменом (DVD), четырехвалентной конструкции IgGScv, четырехвалентной конструкции Mbatryn или составного антитела или их комбинации.

【Пункт 19】

Фармацевтическая композиция для предупреждения или лечения заболевания, связанного с ВСМА, 4-1ВВ или обоими из них, содержащая биспецифическое антитело к ВСМА/4-1ВВ или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-18 и фармацевтически приемлемый носитель.

【Пункт 20】

Фармацевтическая композиция по п. 19, где заболевание, связанное с ВСМА, 4-1ВВ или обоими из них, представляет собой рак.

【Пункт 21】

Фармацевтическая композиция по п. 20, где рак представляет собой множественную миелому.

【Пункт 22】

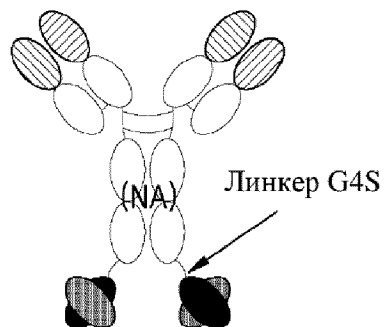
Способ предупреждения или лечения заболевания, связанного с ВСМА, 4-1ВВ или обоими из них, у индивидуума, причем способ включает введение биспецифического антитела к ВСМА/4-1ВВ или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-18 индивидууму.

【Пункт 23】

Биспецифическое антитело к антигену созревания В-клеток (ВСМА)/4-1ВВ или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-18 для применения в предупреждении или лечении заболевания, связанного с ВСМА, 4-1ВВ или обоими из них.

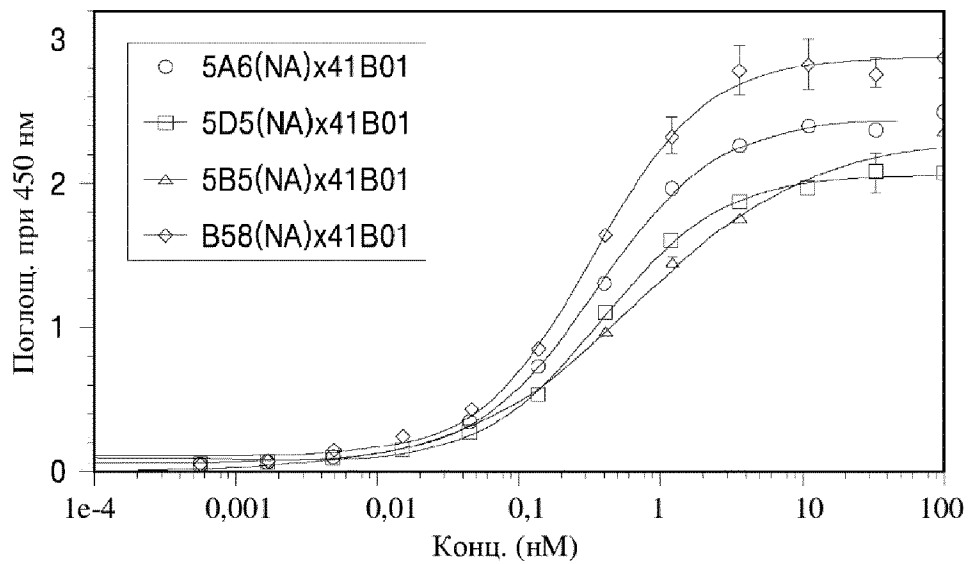
[Фиг. 1]

WT BCMA Ab
B58, 5A6, 5D5 и 5B5

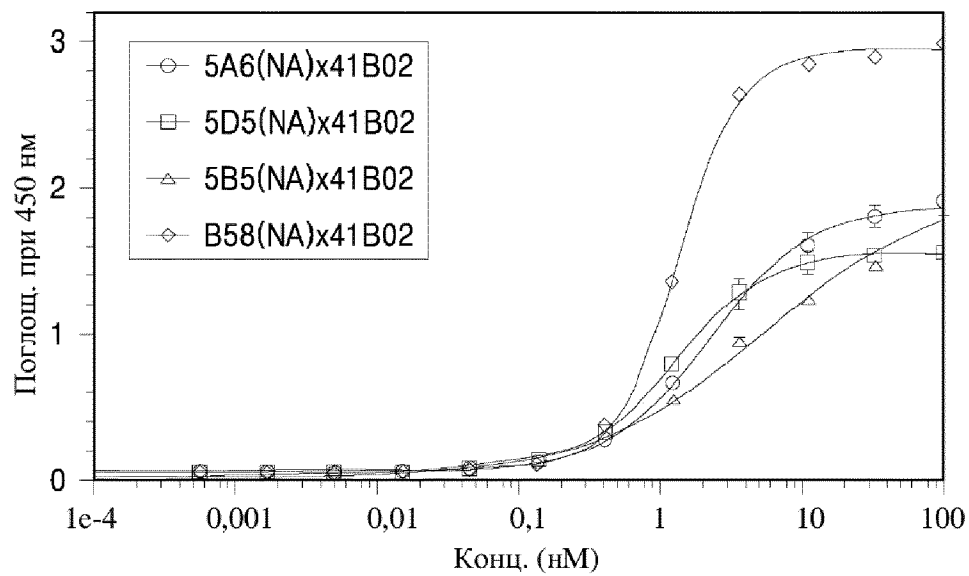


4-1BB Ab
41B01, 41B02, и AB41

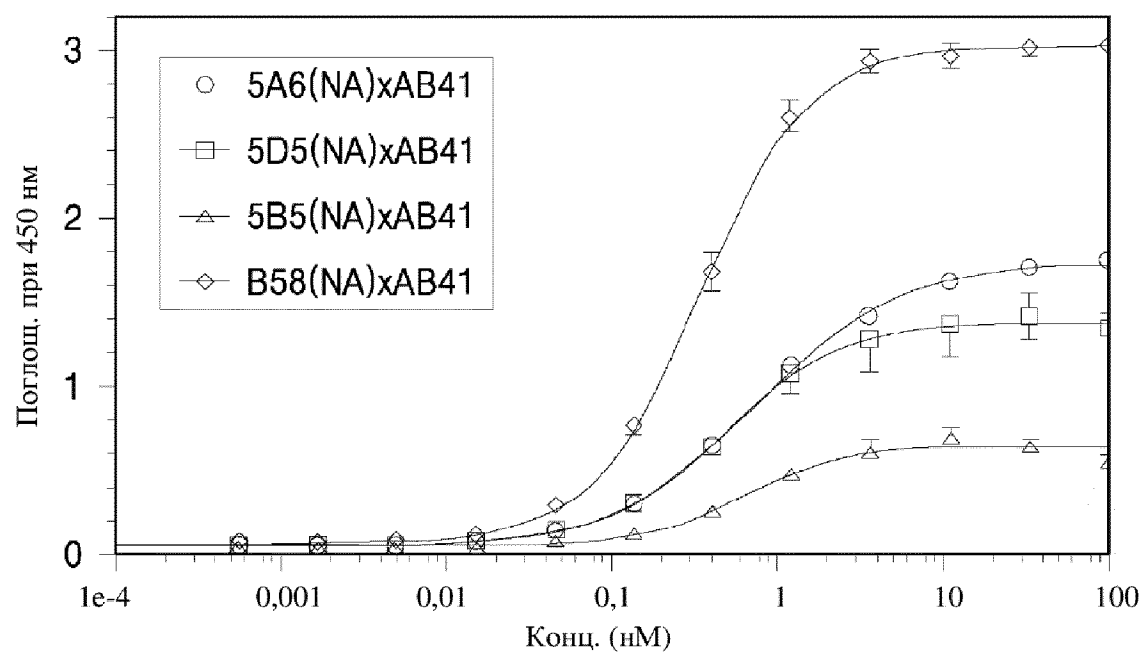
[Фиг. 2a]



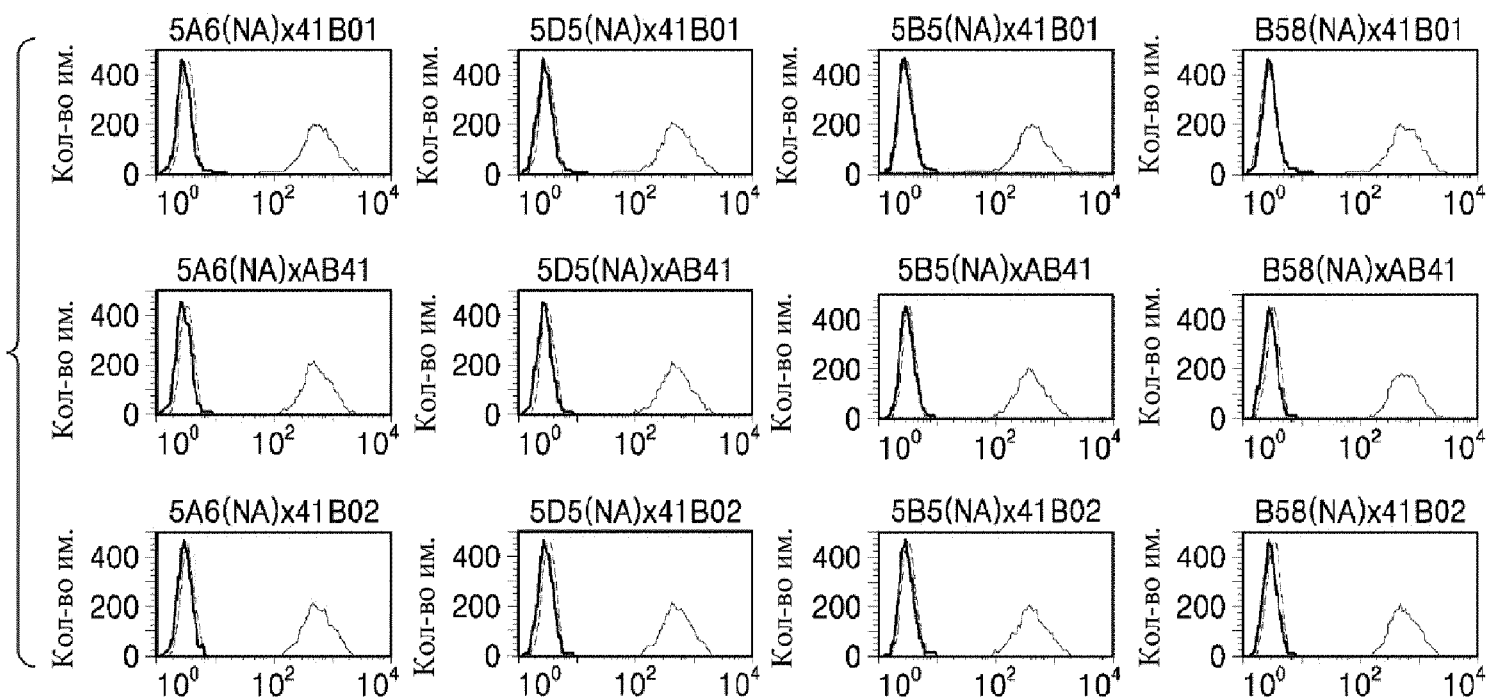
[Фиг. 2b]



[Фиг. 2с]

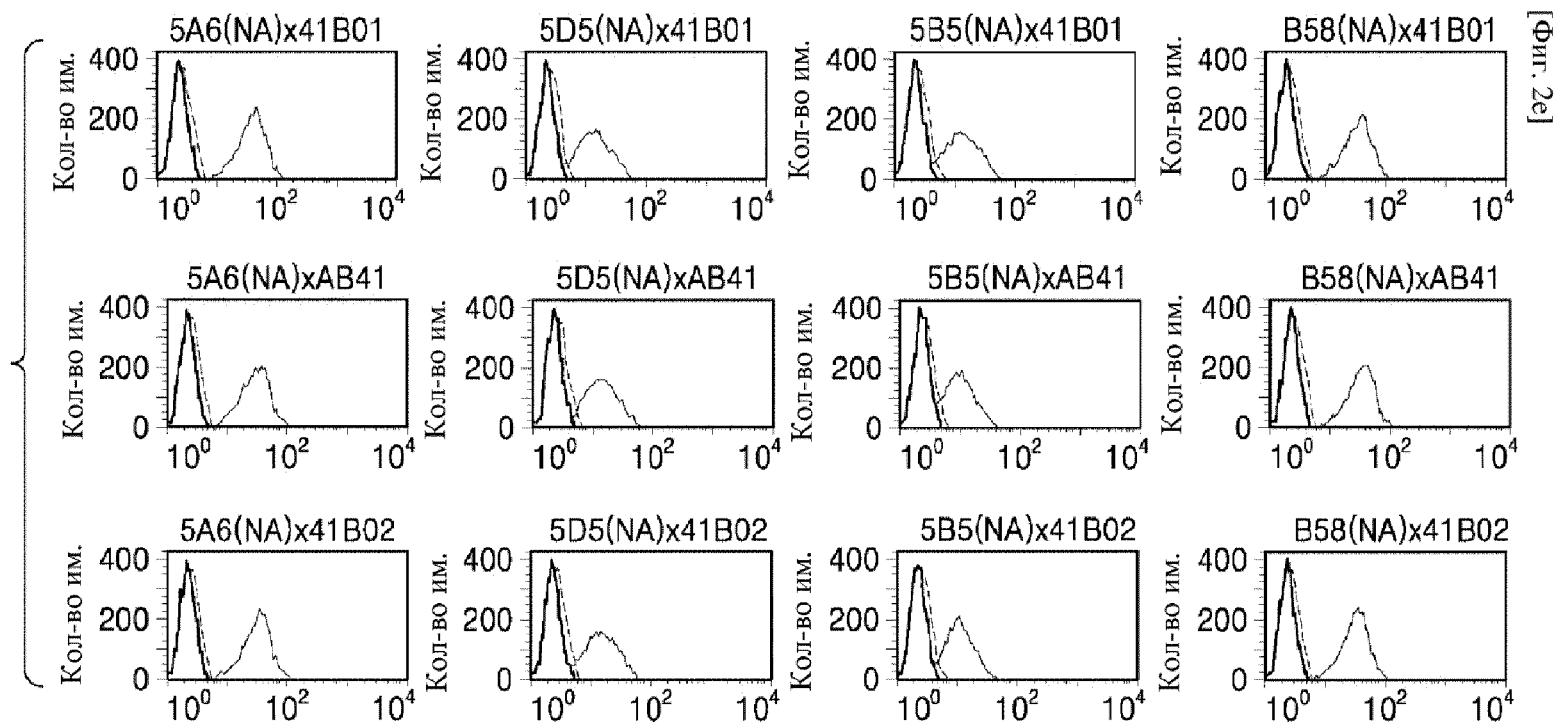


СНОК1-нВСМА
(высокий уровень)

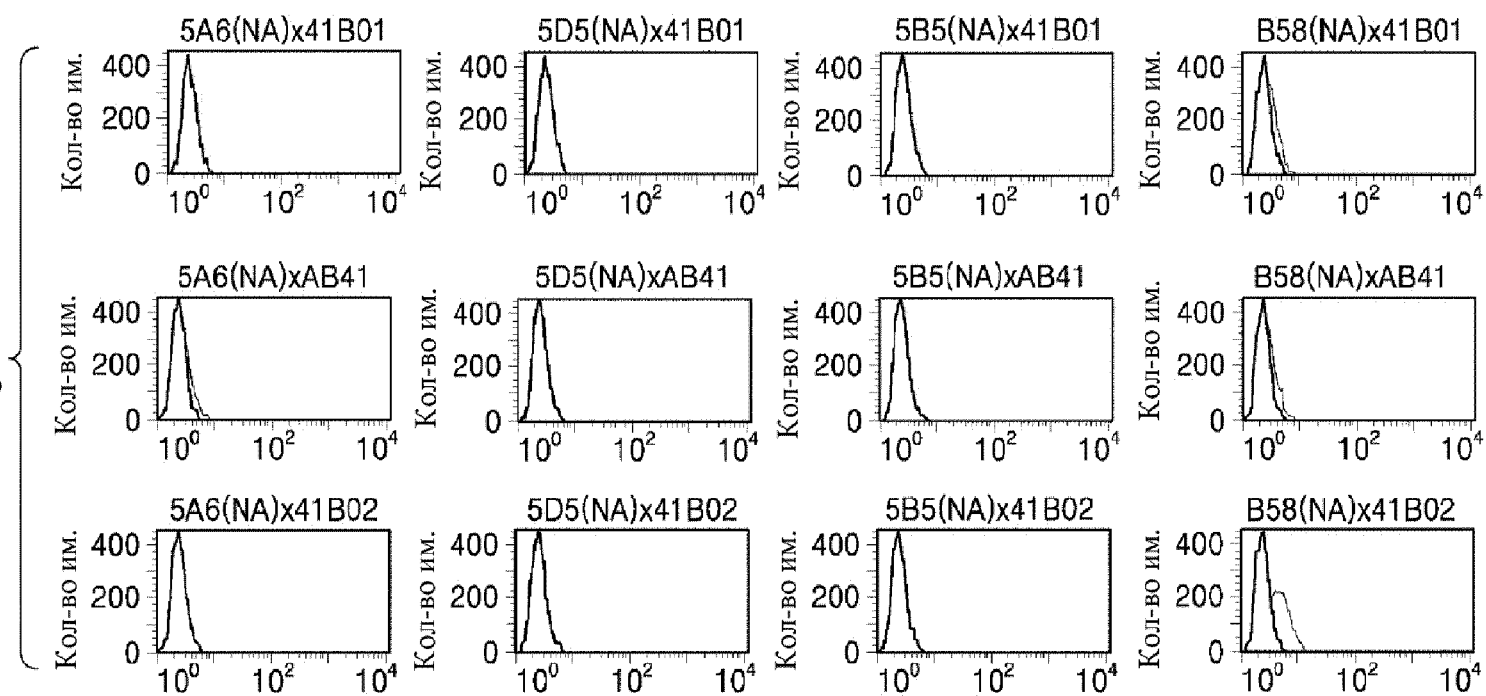


[Фиг. 2d]

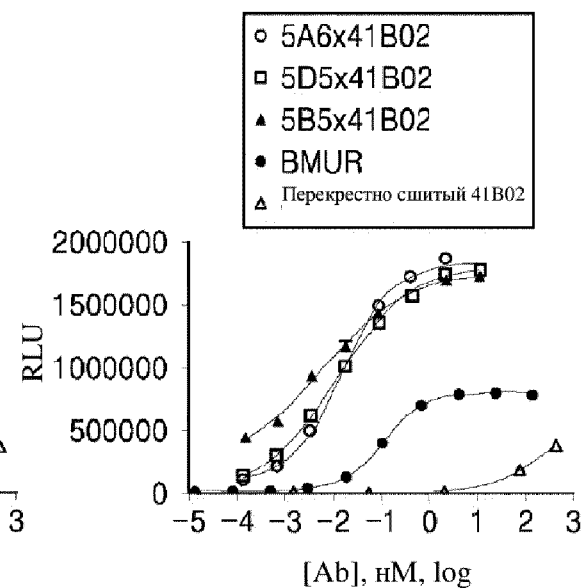
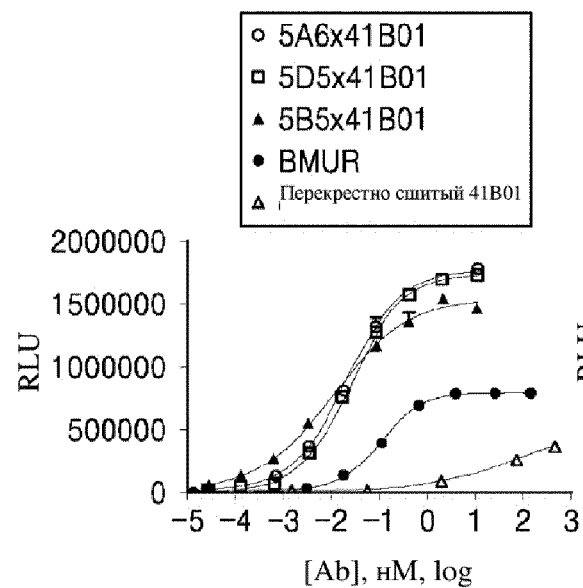
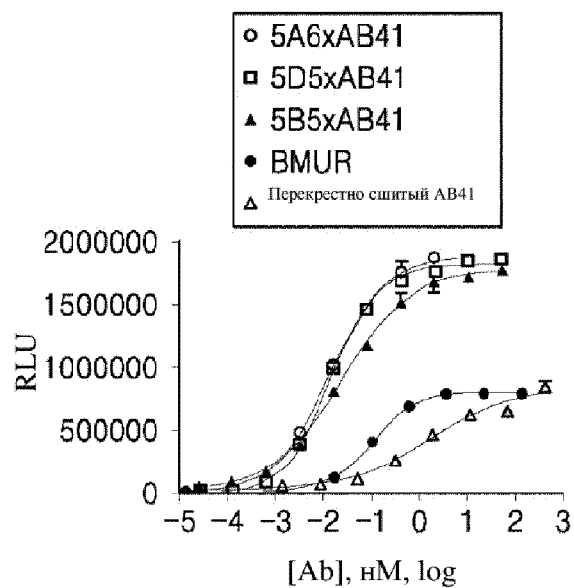
Н929 (средний
уровень ВСМА)



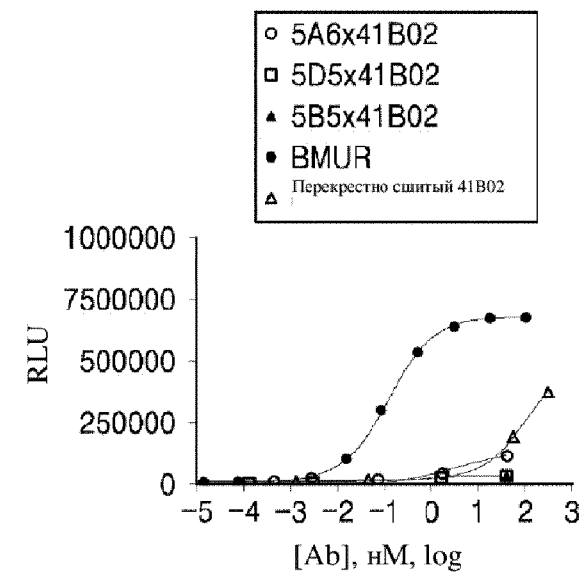
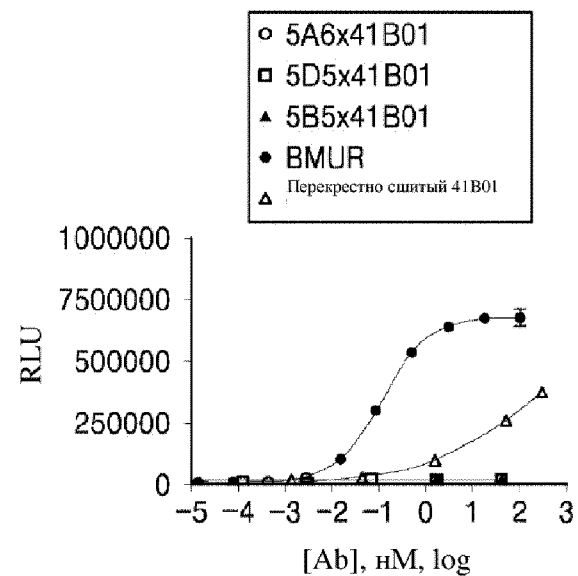
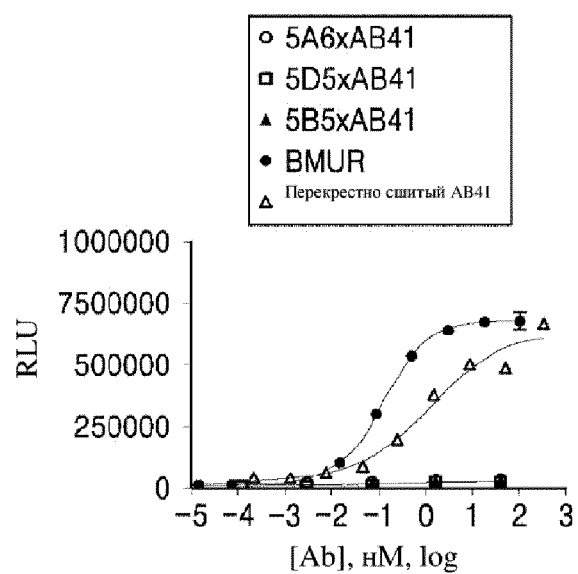
СНОК1
(отрицательная по
ВСМА)



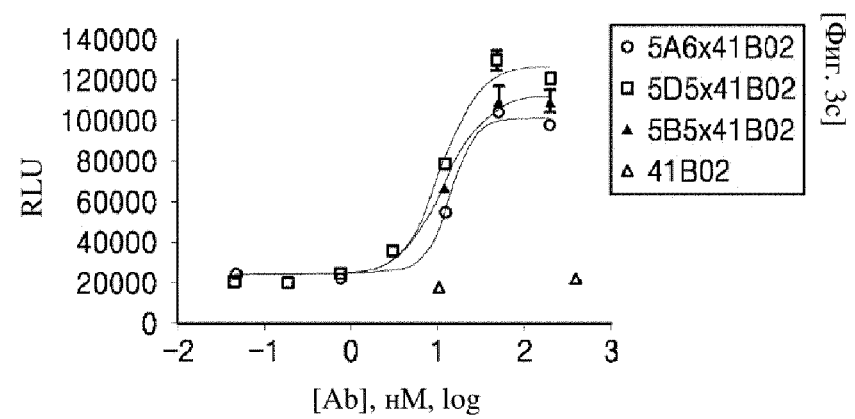
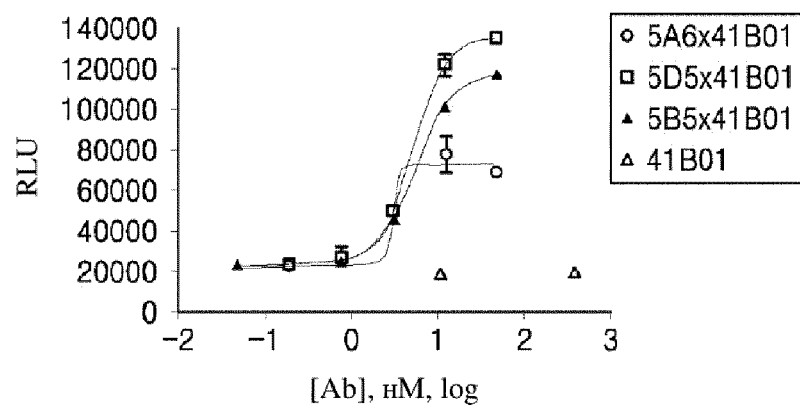
[Фиг. 2f]

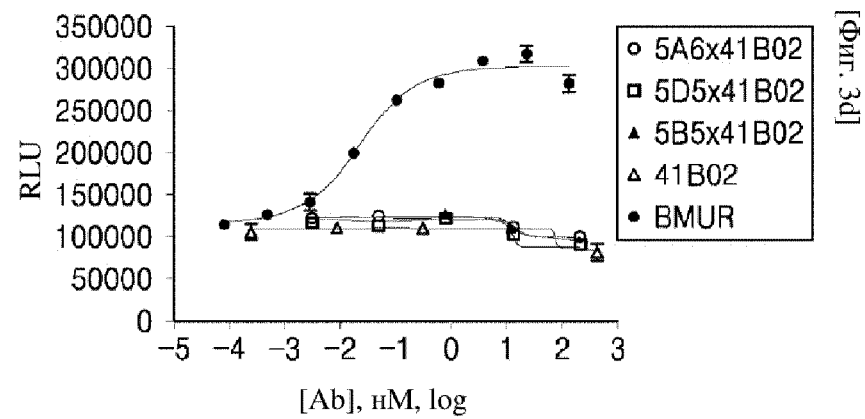
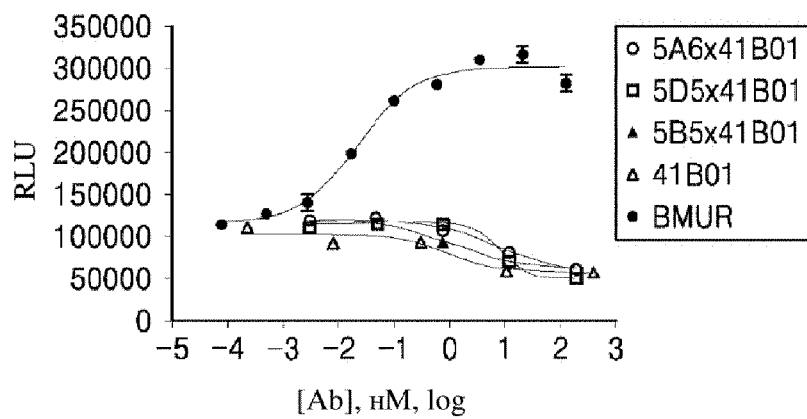


[Фиг. 3a]

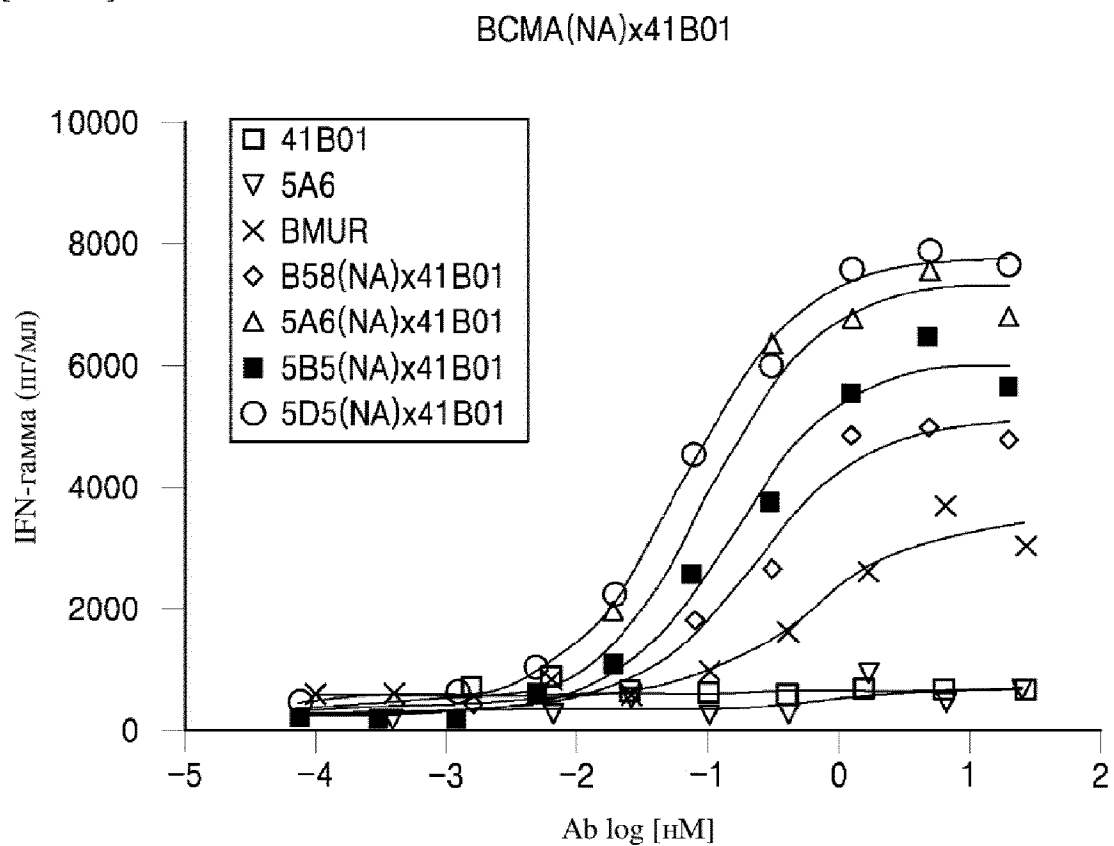


[Фиг. 3b]

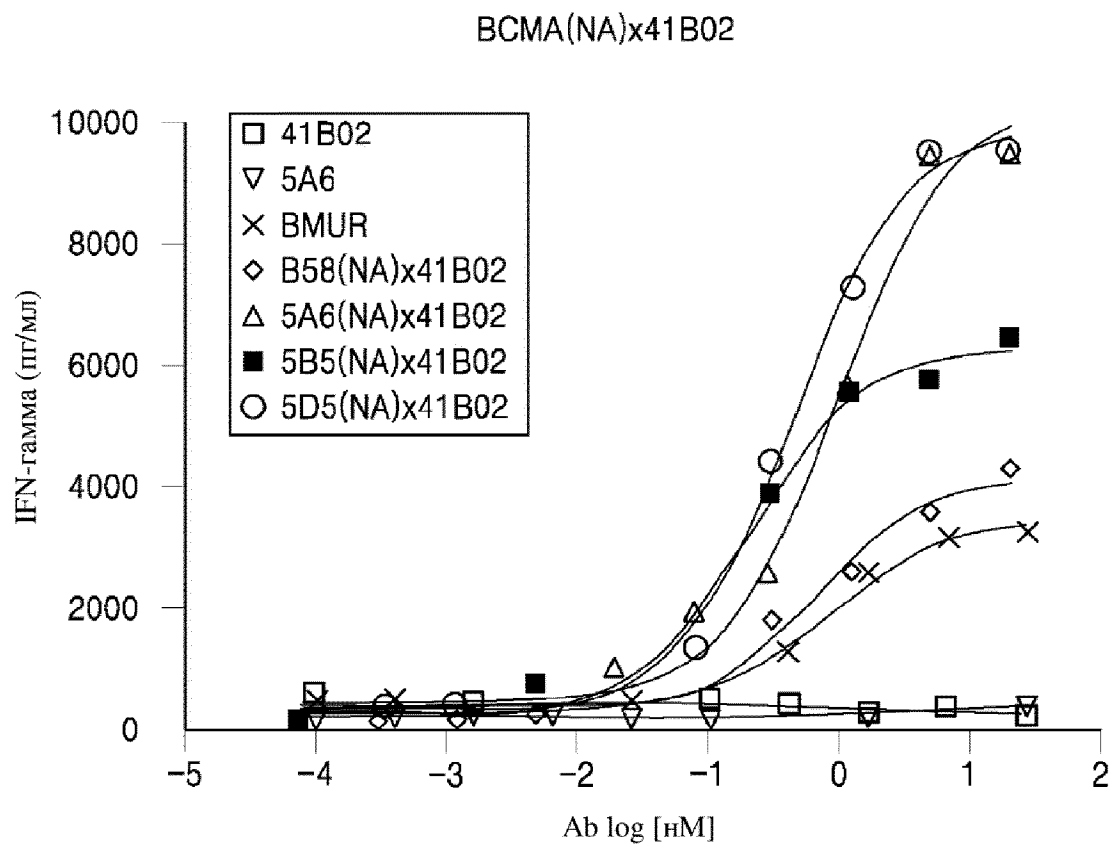




[Фиг. 4а]

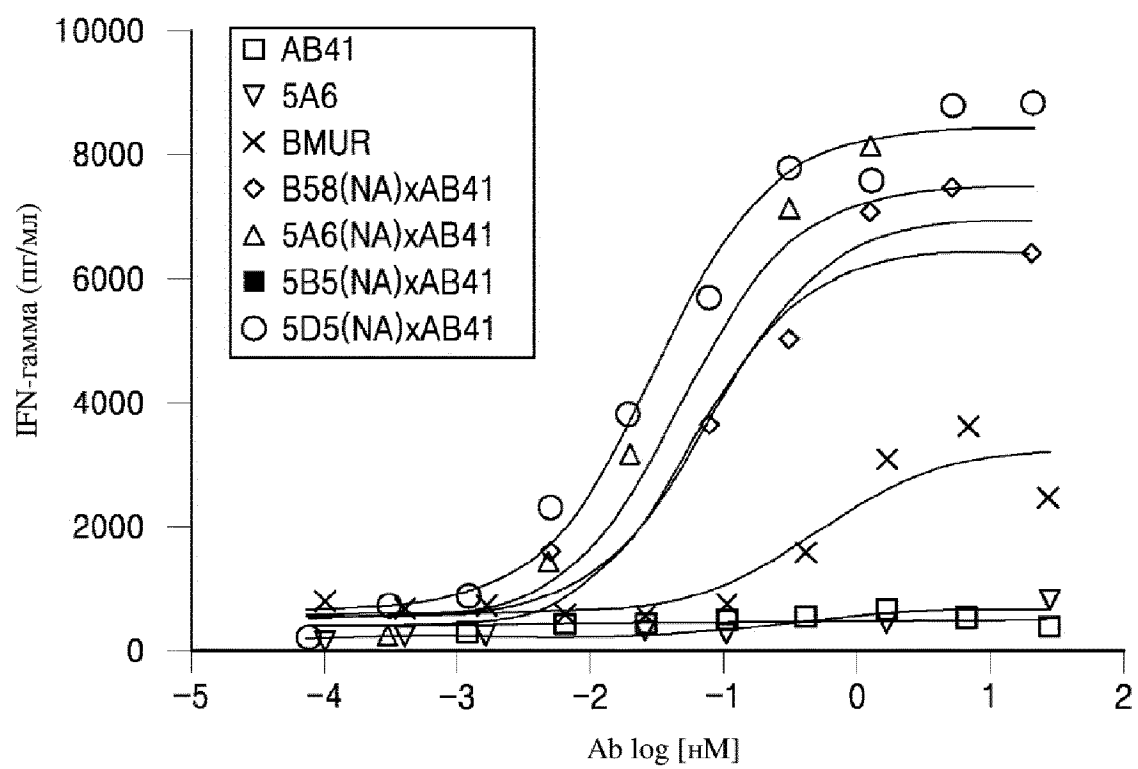


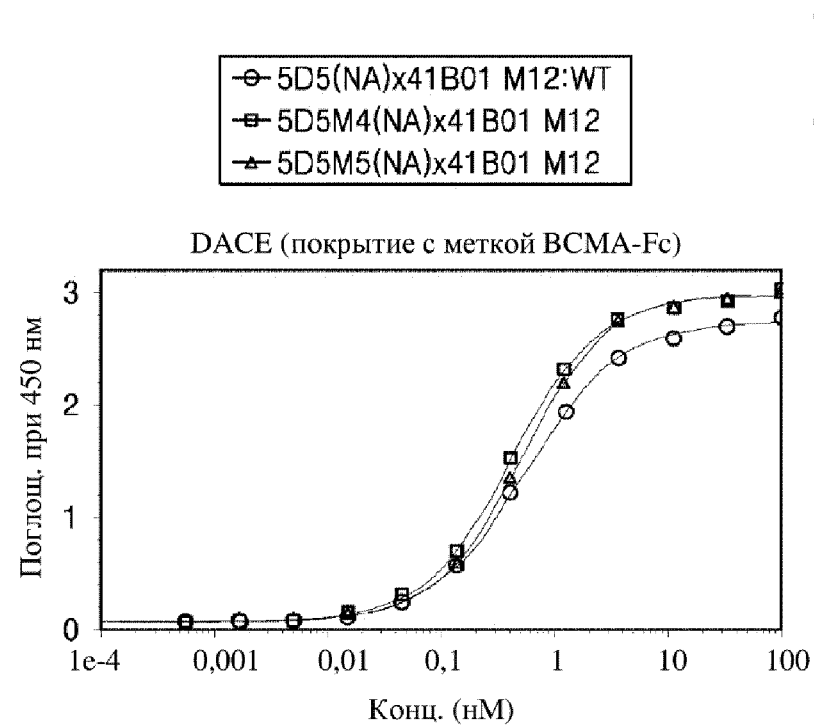
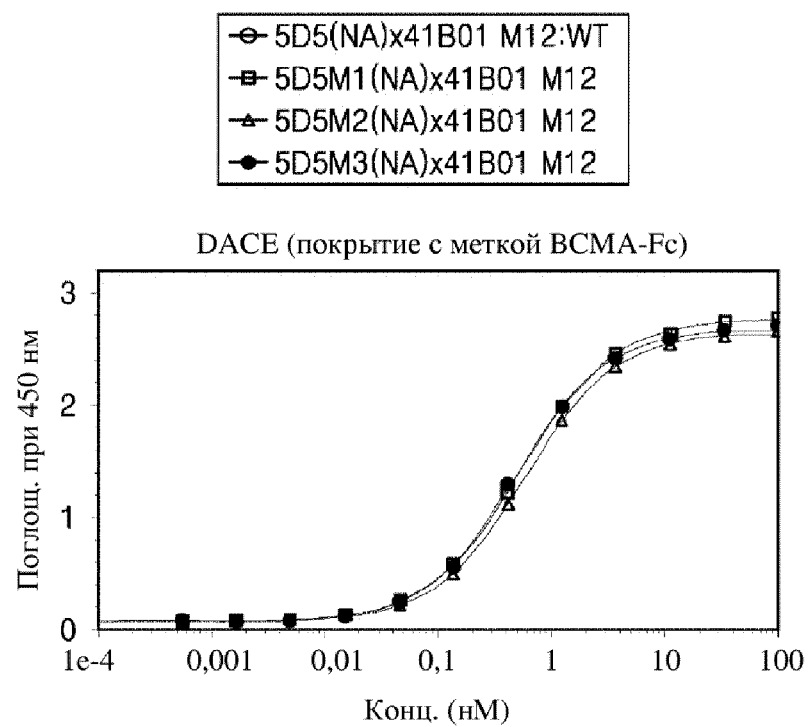
[Фиг. 4b]



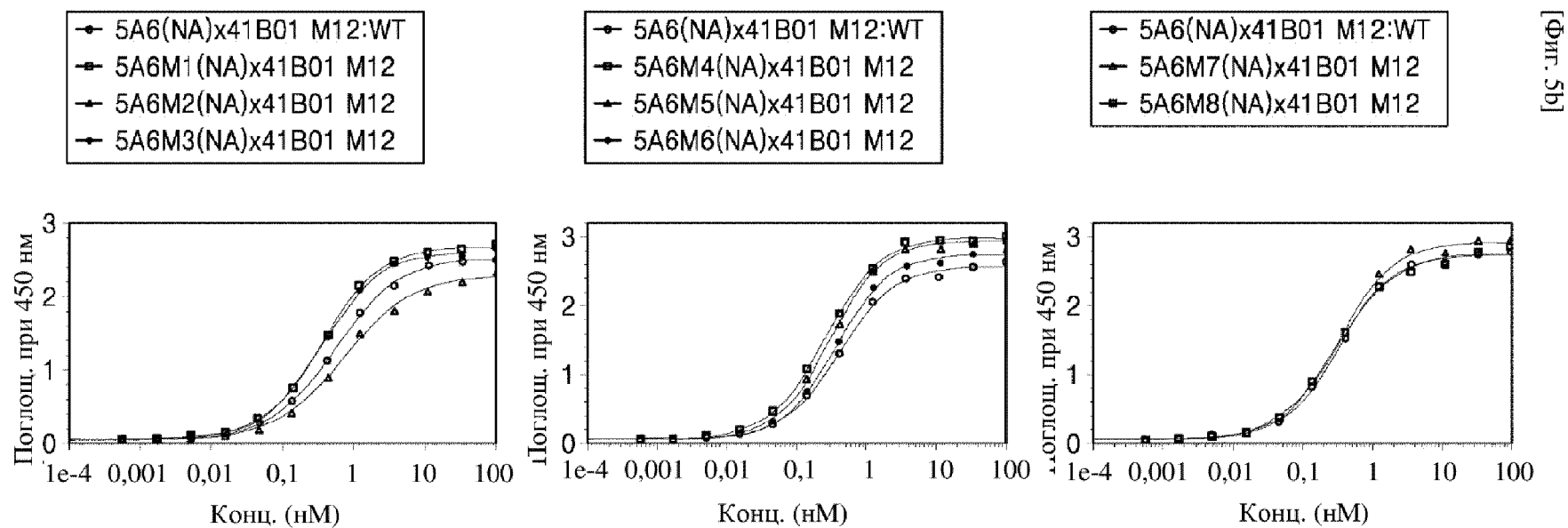
[Фиг. 4с]

BCMA(NA)xAB41

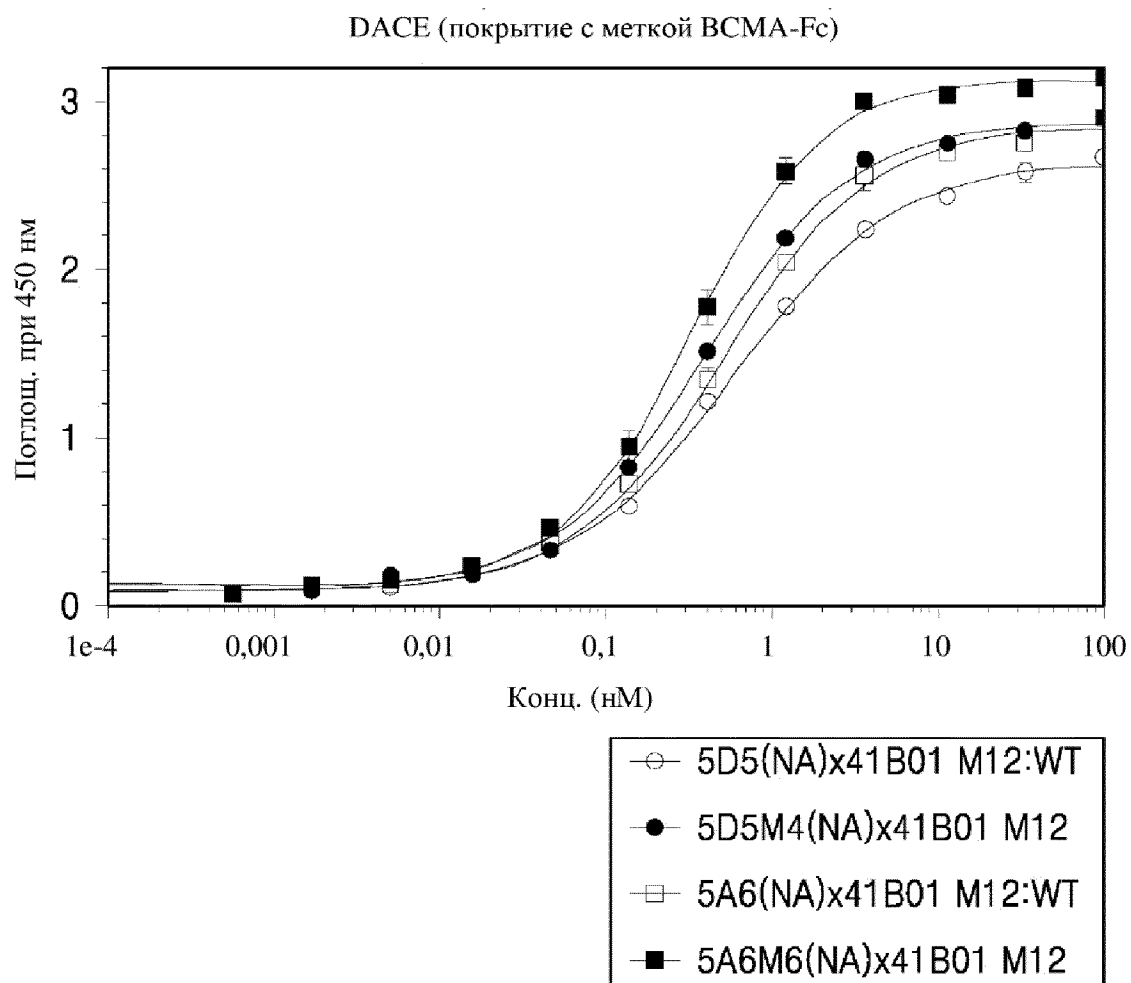


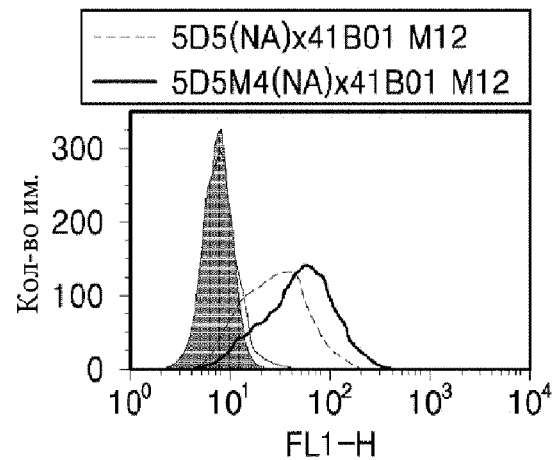


[Фиг. 5а]

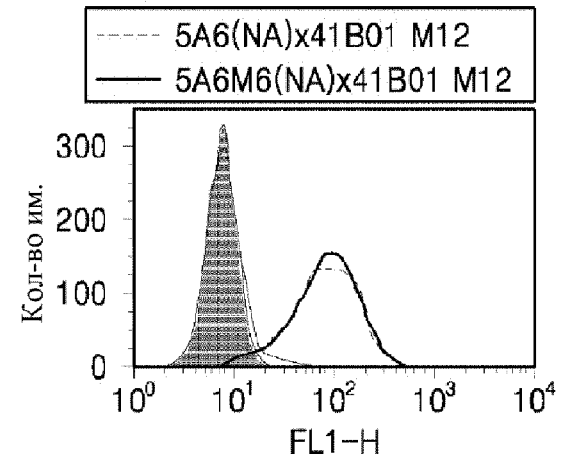


[Фиг. 5с]





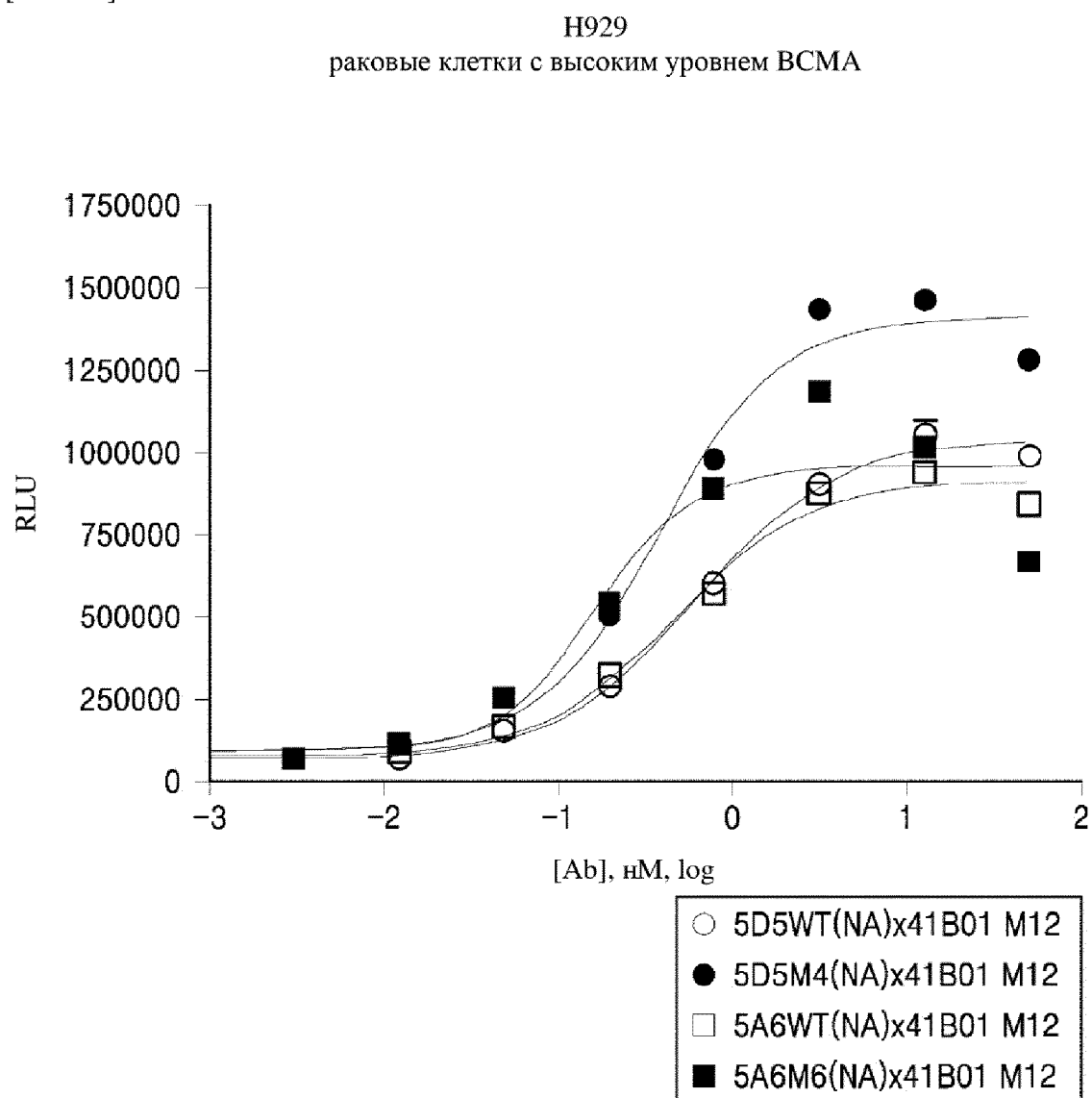
	Название образца	Среднее значение: FL1-H
☐	5D5M4(NA)x41B01 M12.004	64,8
☐	5D5(NA)x41B01 M12.003	37,5
☐	2-ое контрольное Ab.002	9,31
☒	ТОЛЬКО КЛЕТКИ.001	7,89



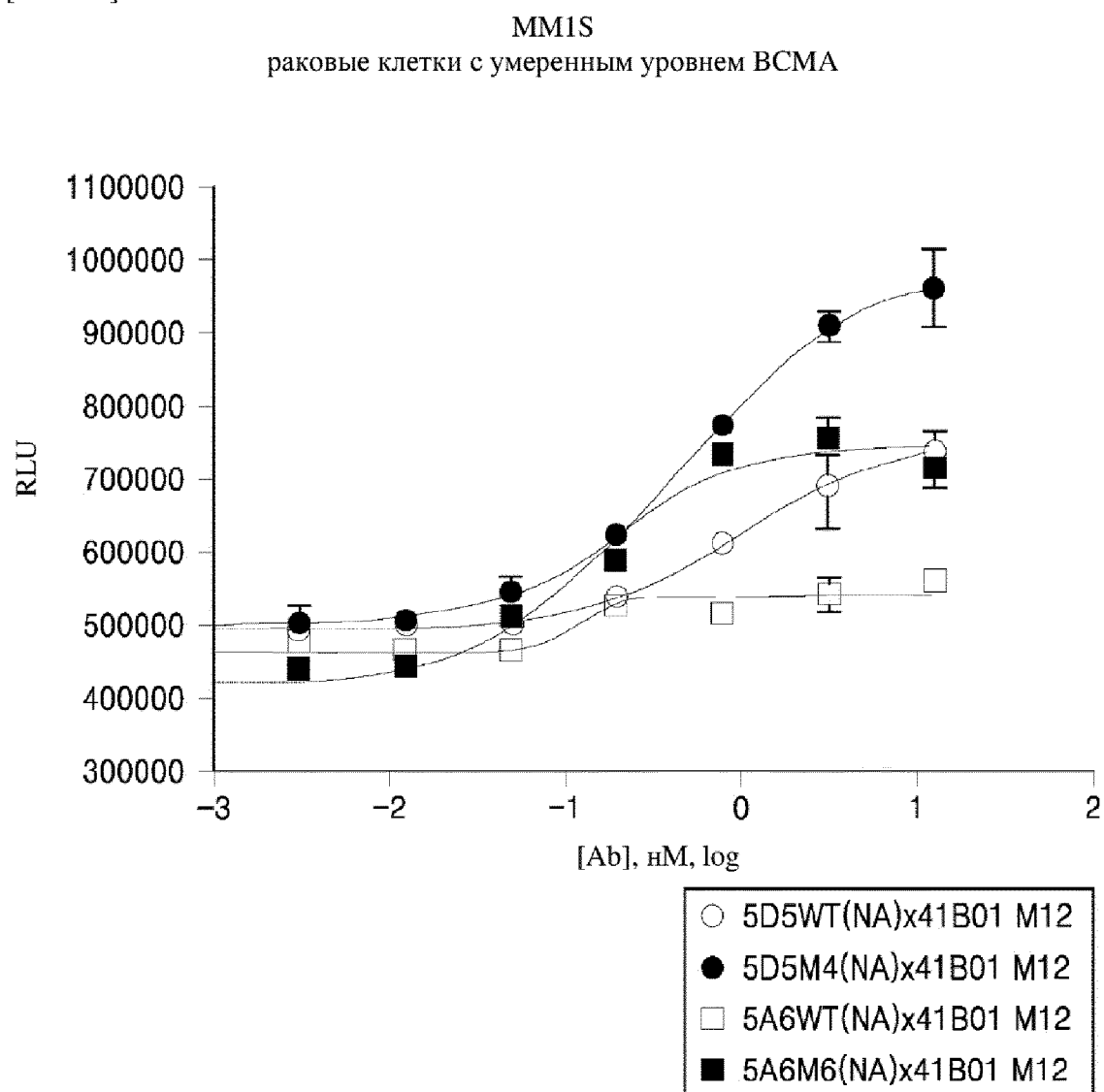
	Название образца	Среднее значение: FL1-H
☐	5A6M6(NA)x41B01 M12.007	102
☐	5A6(NA)x41B01 M12.005	101
☐	2-ое контрольное Ab.002	9,31
☒	ТОЛЬКО КЛЕТКИ.001	7,89

[Фиг. 5d]

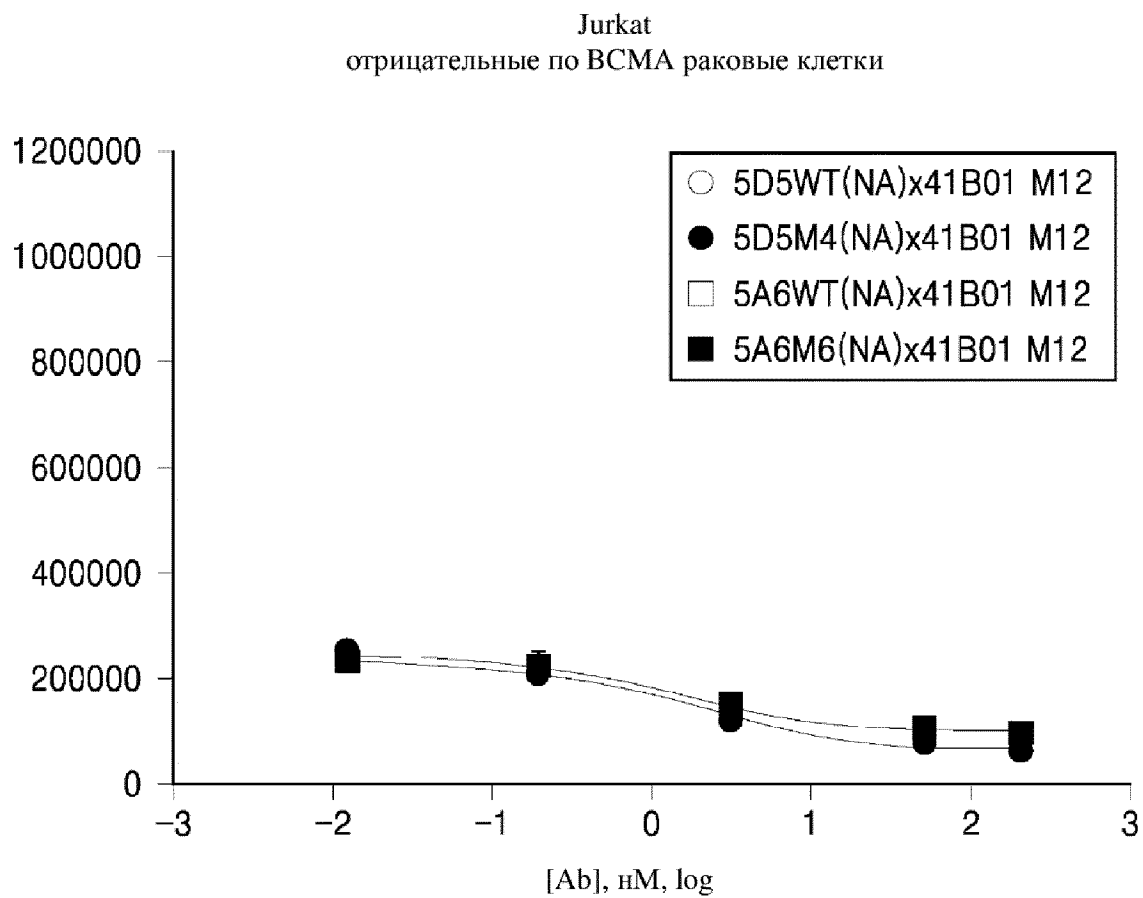
[Фиг. 6a]



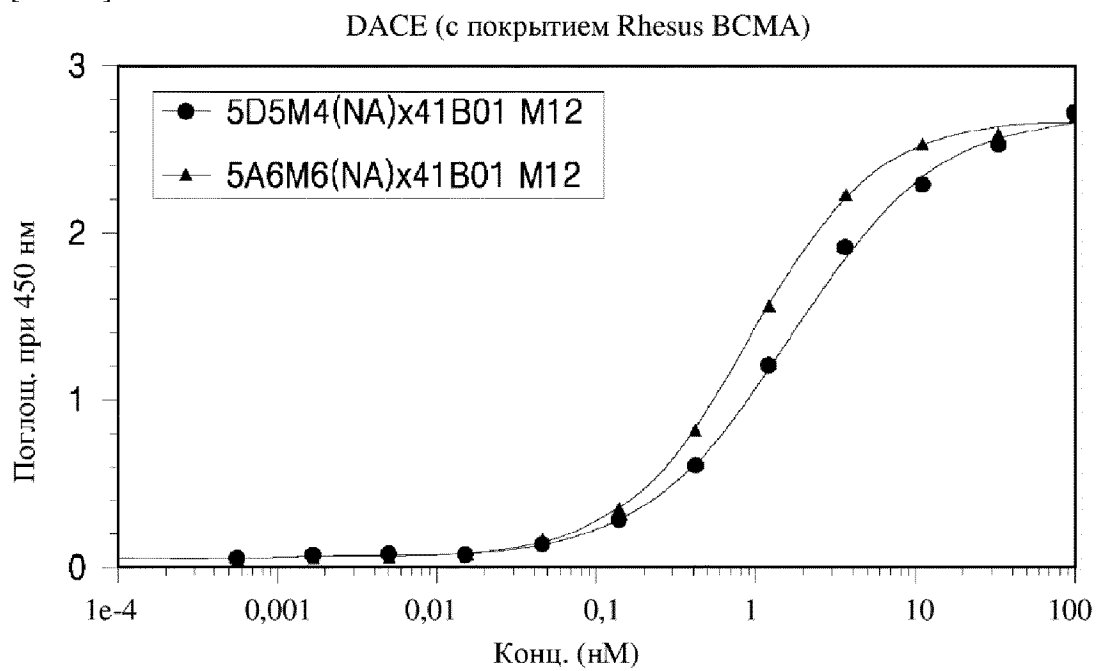
[Фиг. 6b]



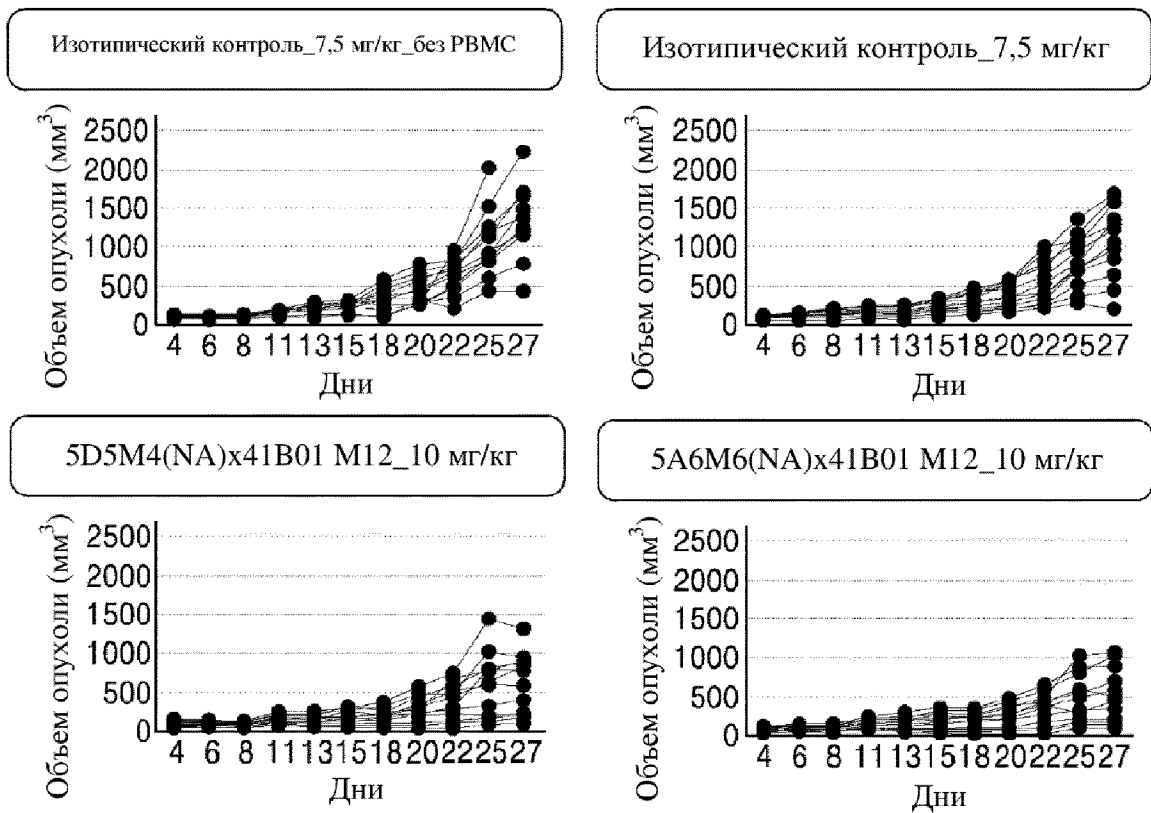
[Фиг. 6с]



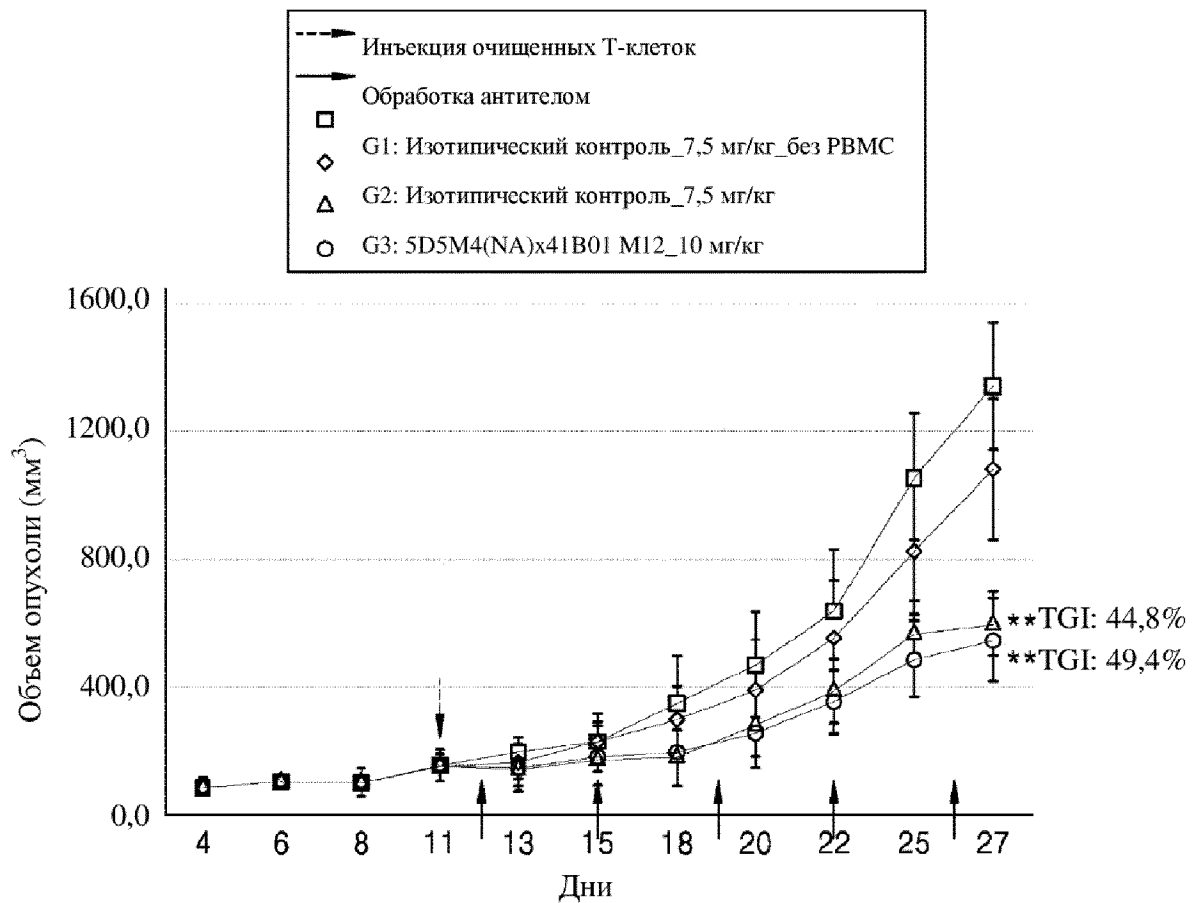
[Фиг. 7]



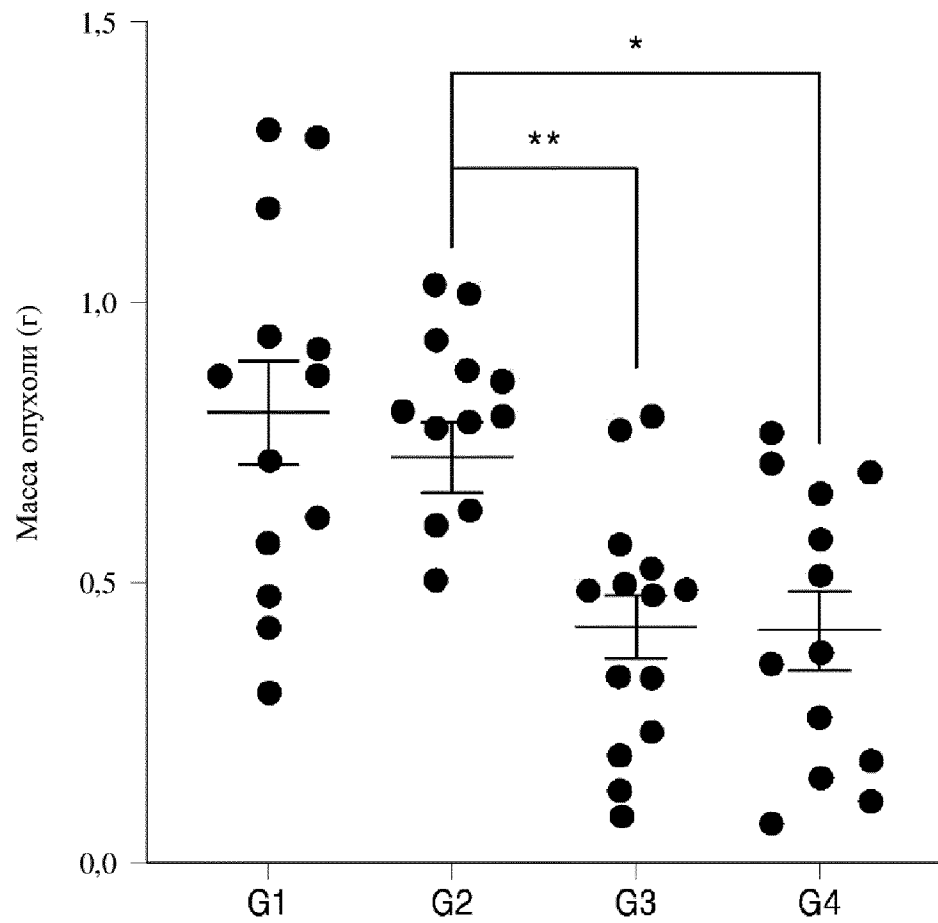
[Фиг. 8a]



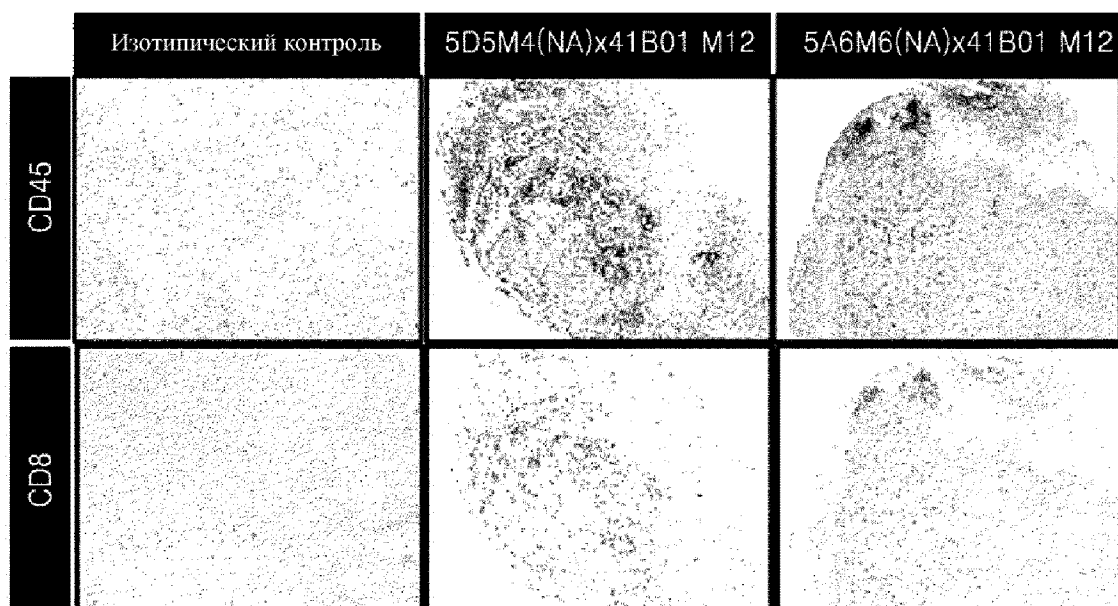
[Фиг. 8b]



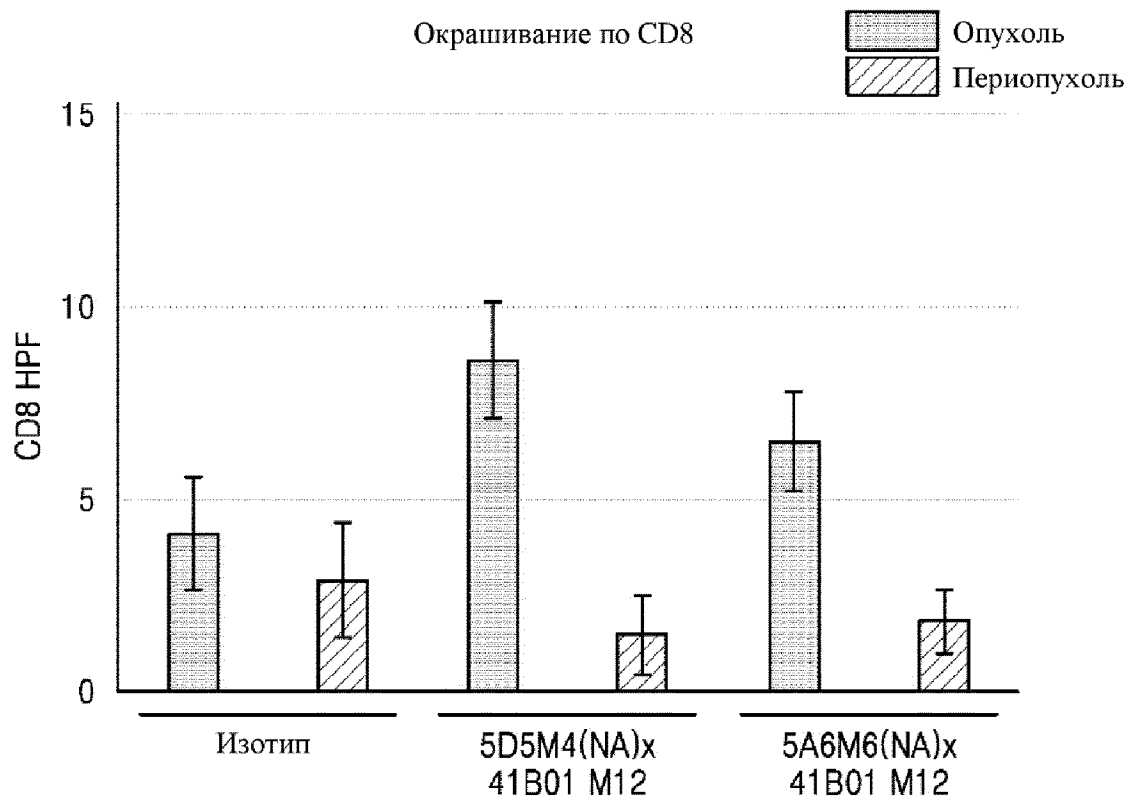
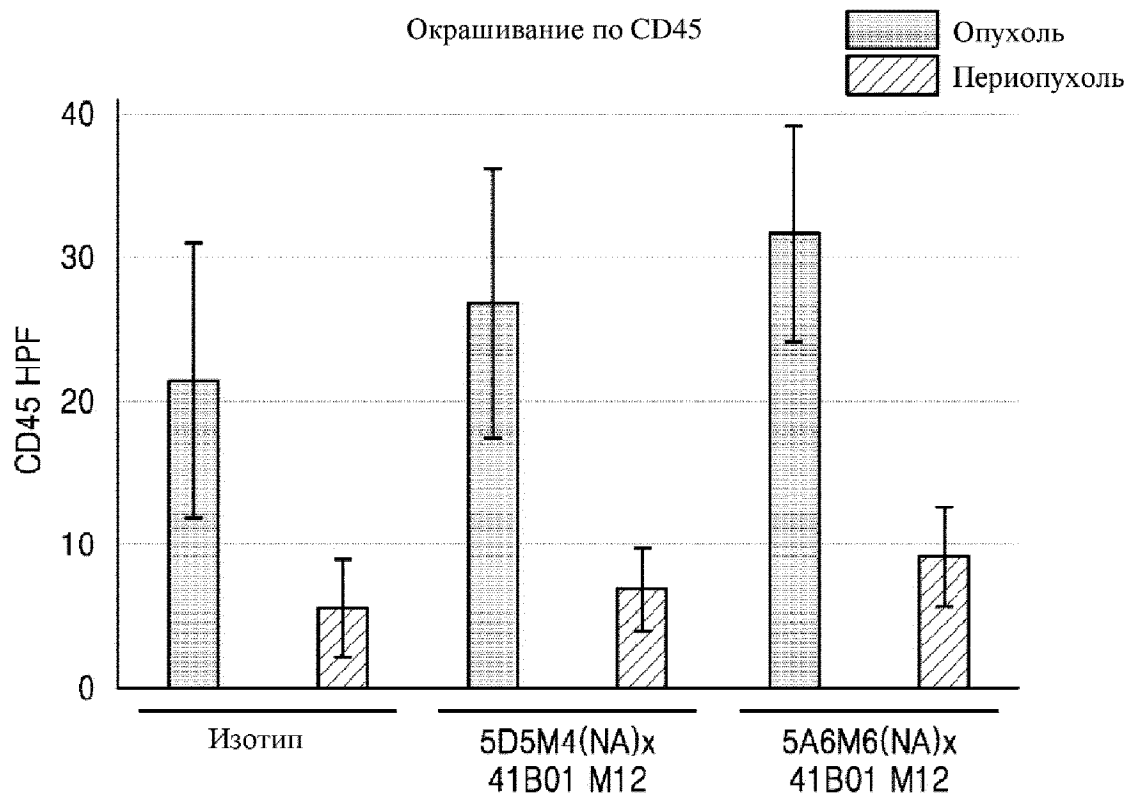
[Фиг. 8с]



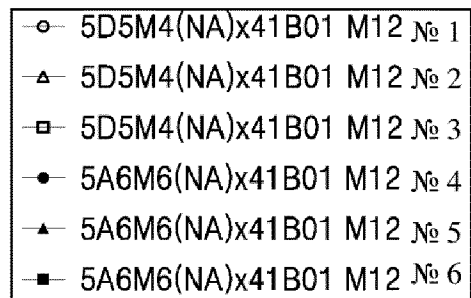
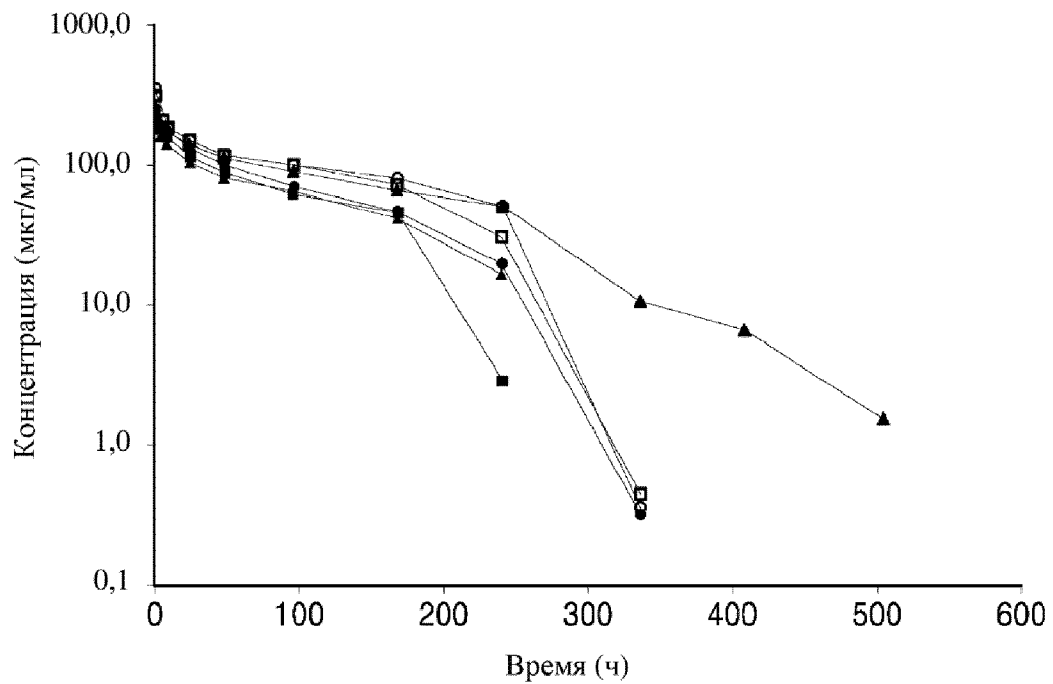
[Фиг. 9а]



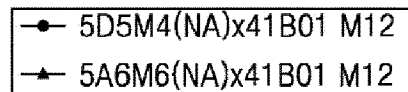
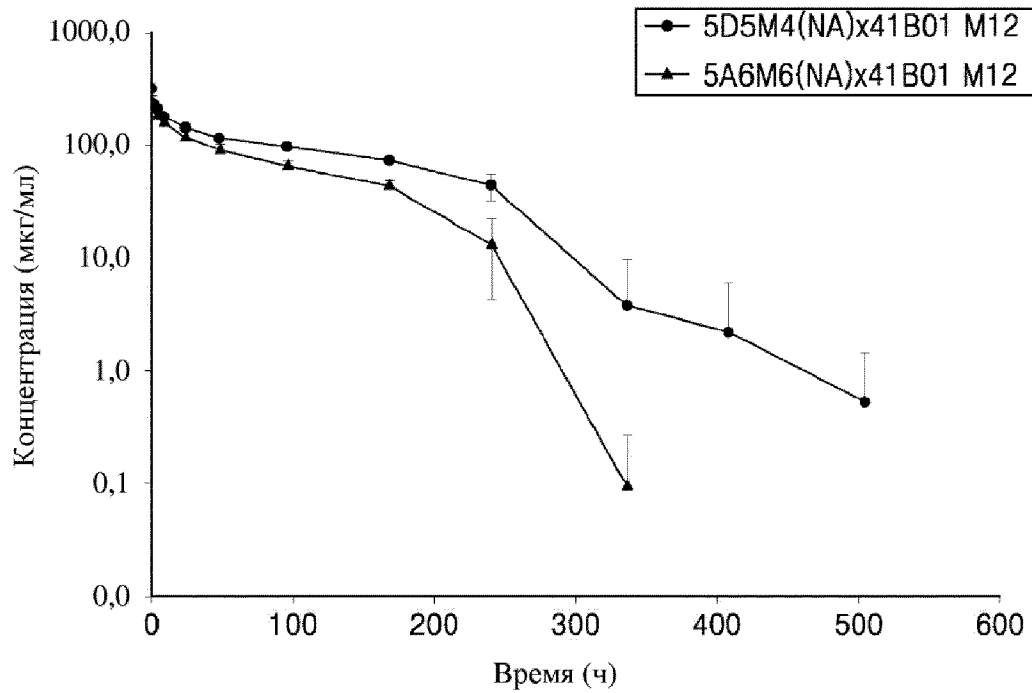
[Фиг. 9b]

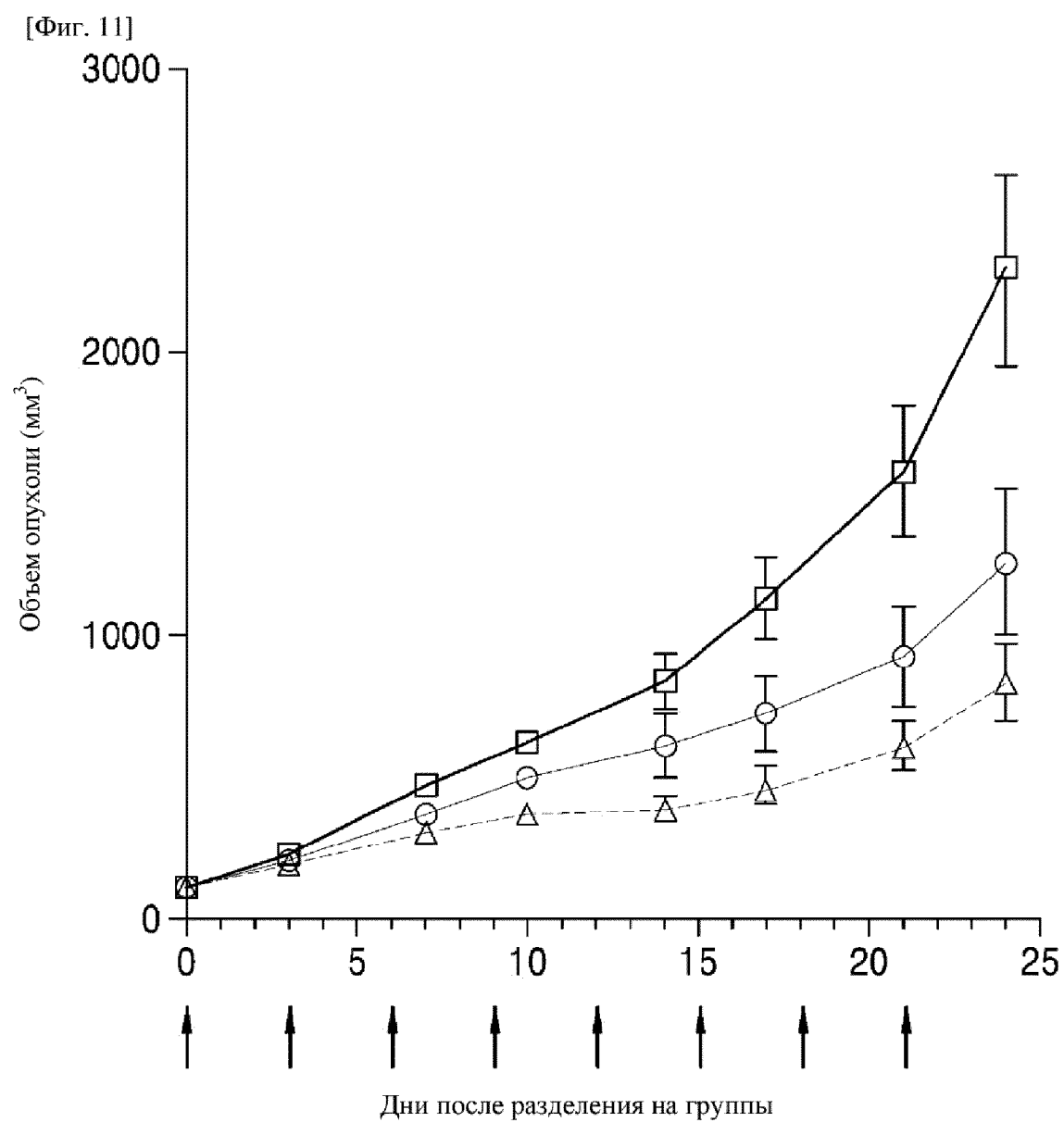


[Фиг. 10a]



[Фиг. 10b]





—□— G1: Изотипический контроль_7,5 мг/кг
 ---△--- G2: 5D5M4(NA) x 41B01 M12_2 мг/кг
 —○— G3: 5D5M4(NA) x 41B01 M12_0.4 мг/кг