

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291707** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.07

(51) Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.03

**(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА С АЛЬТЕРНАТИВНО СПАРЕННЫМИ
МЕЖЦЕПОЧНЫМИ ЦИСТЕИНАМИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 62/948,953; 62/952,747; 62/988,144;
63/007,996; 62/704,973; 62/706,511

(32) 2019.12.17; 2019.12.23; 2020.03.11;
2020.04.10; 2020.06.05; 2020.08.21

(33) US

(86) PCT/US2020/063066

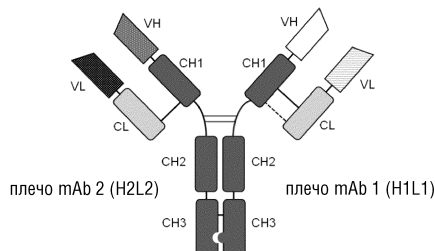
(87) WO 2021/126538 2021.06.24

(71) Заявитель:
ФЕЙНЗ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Ли Джек Чунян, Ван Минхань, Цзоу
Хой, Цзя Хайцюнь (US)**

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

(57) Описаны сконструированные биспецифические антитела со сдвинутой межцепочечной дисульфидной связью на одном плече при сохранении нативной межцепочечной дисульфидной связи на втором плече. Также описаны биспецифические анти-CD47/FR α антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. Также описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, композиции, содержащие антитела, и способы получения антител и применения антител для лечения или профилактики заболеваний, таких как рак и/или связанные с ними осложнения.



A1

202291707

202291707

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574358EA/032

БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА С АЛЬТЕРНАТИВНО СПАРЕННЫМИ МЕЖЦЕПОЧНЫМИ ЦИСТЕИНАМИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По этой заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/948,953, поданной 17 декабря 2019 г.; предварительной заявки США № 62/952,747, поданной 23 декабря 2019 г.; предварительной заявки США № 62/988,144, поданной 11 марта 2020 г.; предварительной заявки США № 63/007,996, поданной 10 апреля 2020 г.; предварительной заявки США № 62/704,973, поданной 5 июня 2020 г.; и предварительной заявки США № 62/706,511, поданной 21 августа 2020 г. Каждое описание полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Этот изобретение относится к сконструированным биспецифическим антителам со сдвинутой межцепочечной дисульфидной связью на одном плече при сохранении нативной межцепочечной дисульфидной связи на втором плече. Эти биспецифические антитела могут иметь преимущества в отношении стабильности и продуцирования и могут использоваться в терапевтических целях. Изобретение относится к биспецифическим антителам, нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и композициям, содержащим антитела. Также предложены способы получения антител и способы применения антител для лечения заболеваний, включая рак и/или связанные с ними осложнения.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Эта заявка содержит список последовательностей, который подается в электронном виде через EFS-Web в виде списка последовательностей в формате ASCII с именем файла «065799.30WO1 Sequence Listing» и датой создания 24 ноября 2020 г. и размером 36 кб. Перечень последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью спецификации и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Антитела (иммуноглобулины) представляют собой встречающиеся в природе белки, которые играют важную роль в функции иммунной системы по защите организма от инородных объектов, таких как бактерии и вирусы. Антитела в своей нативной структуре существуют в виде Y-образного белка, состоящего из двух плеч, каждое из которых содержит идентичную тяжелую цепь (HC) и идентичную легкую цепь (LC). Тяжелая цепь содержит одну переменную область (VH) и 3 константные области (CH1, CH2 и CH3, соответственно), которые расположены в порядке VH, CH1, CH2 и CH3 от N-конца к С-концу, и легкая цепь содержит одну переменную область (VL) и одну константную область (CL), которые расположены в порядке VL и CL от N-конца к С-концу. Ассоциация

тяжелой цепи и легкой цепи в каждом плече обычно называется «спариванием», которое включает VH, CH1, VL и CL. VH и VL физически взаимодействуют друг с другом, образуя связывающий домен антитела против его антигена, так что Y-образное антитело имеет два идентичных связывающих домена, по одному на каждом плече против одного и того же антигена, и, следовательно, является двухвалентным и моноспецифическим, что является типовой характеристикой моноклонального антитела.

Как часть структуры антитела, CH1 и CL также физически взаимодействуют друг с другом, что включает физические контакты, а также межцепочечную дисульфидную связь (также называемую «дисульфидным мостиком»), образованную свободными тиоловыми группами двух нативных цистеинов на CH1 и CL, соответственно. Межцепочечная дисульфидная связь помогает стабилизировать общую структуру, образованную тяжелой цепью и легкой цепью на каждом плече. Кроме того, внутрицепочечные дисульфидные связи также образуются как часть нативной структуры антитела. С-концы тяжелых цепей (CH2 и CH3) образуют плотную структуру, что важно для двухвалентности нативного антитела.

Моноклональные антитела (mAb) являются превосходной платформой для белковой терапии благодаря их высокой аффинности к антигенам, длительному периоду полужизни *in vivo*, природной стабильной структуре, способности активировать иммунную систему против мишеней лекарственных средств и многим другим аспектам. Однако, когда терапевтические стратегии требуют таргетирования двух отдельных антигенов, таких как два опухолеспецифических антигена на одной и той же раковой клетке, с помощью одного антитела, mAb не могут служить этой цели. При таких обстоятельствах создается биспецифическое антитело для таргетирования двух разных антигенов в одной и той же клетке, при этом одно плечо связывается с первым антигеном, и другое плечо связывается со вторым антигеном. Хотя для каждого связывания антигена существует одновалентность, связывание с обоими антигенами на одной и той же клетке может компенсировать потерю авидности из-за потери двухвалентности по отношению к каждому антигену. Биспецифические антитела обеспечивают повышенную селективность по сравнению с mAb, поскольку они имеют более высокое связывание с клетками, экспрессирующими оба антигена, чем с клетками, экспрессирующими только один из антигенов. Это особенно важно для уменьшения опасений по поводу безопасности, когда нормальные клетки или ткани экспрессируют один из двух антигенов. Биспецифические антитела могут воздействовать на два пути одновременно, когда они связываются с двумя разными антигенами клеточной поверхности или растворимыми лигандами/белками, что является еще одним преимуществом перед mAb.

Если биспецифическое антитело получено из двух mAb, продукт будет содержать два разных плеча из двух mAb, соответственно, где каждое плечо имеет уникальную тяжелую цепь и уникальную легкую цепь. Экспрессия биспецифического антитела в клетках-продуцентах в процессе производства требует экспрессии 4 разных белков: двух разных тяжелых цепей и двух разных легких цепей. Хотя цель состоит в том, чтобы иметь

каждую пару НС с соответствующей LC на каждом плече биспецифического антитела во время производства, ошибочное спаривание (LC одного плеча спаривается с НС другого плеча) обычно происходит и приводит к образованию нежелательных продуктов, что затрудняет продуцирование и выделение желаемого продукта биспецифического антитела. Было использовано несколько подходов для улучшения производственного аспекта биспецифических антител. Одним из примеров является идентификация общей легкой цепи с помощью конструирования белков. Однако обмен доменами и многие мутации могут значительно изменить структуру нативного антитела, что может увеличить риск агрегации и/или снизить стабильность.

Экспрессия FR α повышена в некоторых солидных опухолях, таких как рак яичников, легких и молочной железы (Toffoli et al., *Int J Cancer* 1997; 74:193-198 and Boogerd et al., *Oncotarget* 2016; 7:17442-17454), но его экспрессия находится на низких уровнях в ограниченных нормальных тканях человека (Weitman, et al., *Cancer Res* 1992; 52:3396-3401). В соответствии с этим наблюдением, клинические испытания фазы 1, проведенные на настоящий момент времени, с малыми и большими молекулами, таргетирующими FR α , показали хорошую переносимость лекарственного средства (Cheung et al., *Oncotarget* 2016; 7:52553-52574). Таким образом, FR α является идеальной мишенью для лечения рака. Кроме того, CD47, который опосредует сигнал «не ешь меня», сверхэкспрессирован во многих опухолях. Биспецифическое антитело, одно плечо которого связывается с CD47, и другое плечо связывается с FR α (называемое биспецифическим анти-CD47/FR α антителом), можно использовать для селективного таргетирования клетки, которая экспрессирует оба антигена. Связывание биспецифического антитела с обоими антигенами на одной и той же клетке может привести к повышенной аффинности по сравнению с любым плечом из-за avidности. Ожидается, что биспецифическое антитело будет иметь более слабую активность в отношении клеток, которые экспрессируют только CD47 (но не FR α), из-за отсутствия avidности по сравнению с двухвалентным анти-CD47mAb, что потенциально может повысить пределы безопасности и/или переносимости. Биспецифическое анти-CD47/FR α антитело может селективно блокировать взаимодействие CD47/SIRP α на клетке, которая экспрессирует как CD47, так и FR α , и активировать врожденную иммунную систему против клетки, такой как раковая клетка. Таким образом, биспецифическое анти-CD47/FR α антитело может быть эффективным средством для лечения рака яичников и других опухолей, которые экспрессируют значительные уровни как CD47, так и FR α на клеточной поверхности.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном общем аспекте, изобретение относится к выделенным биспецифическим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим:

- а. первую тяжелую цепь, H1;
- б. вторую тяжелую цепь, H2;
- с. первую легкую цепь, L1; и

d. вторую легкую цепь, L2;

где H1 и L1 образуют первое плечо, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает первый антиген, предпочтительно, первый антиген, происходящий от человека, и

где H2 и L2 образуют второе плечо, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген, предпочтительно, второй антиген происходящий от человека, где

(a) H1 содержит CH1 область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека; и

(b) L1 содержит CL область легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека;

где CH1 и CL области содержат аминокислотные замены или нативную аминокислоту в аминокислотном остатке, соответствующем положению аминокислоты SEQ ID NO: 15, 21, 22 или 23 для CH1 и SEQ ID NO: 19 или 24 для CL;

где аминокислотные замены или нативную аминокислоту в областях CH1 и CL выбраны из:

- (1) K133C и C220X в CH1 и F209C и C214X в CL;
- (2) S131C и C220X в CH1 и P119C и C214X в CL;
- (3) K133C и C220X в CH1 и K207C и C214X в CL;
- (4) F170C и C220X в CH1 и S176C и C214X в CL;
- (5) P171C и C220X в CH1 и S162C и C214X в CL;
- (6) V173C и C220X в CH1 и Q160C и C214X в CL;
- (7) F170C и C131X в CH1 и S176C и C214X в CL;
- (8) P171C и C131X в CH1 и S162C и C214X в CL;
- (9) V173C и C131X в CH1 и Q160C и C214X в CL;
- (10) A129C и C220X в CH1 и S121C и C214X в CL;
- (11) K133C и C220X в CH1 и I117C и C214X в CL;
- (12) C131 в CH1 и P119C и C214X в CL;
- (13) A129C и C131X в CH1 и S121C и C214X в CL;
- (14) R133C и C131X в CH1 и K207C и C214X в CL;
- (15) R133C и C131X в CH1 и I117C и C214X в CL;
- (16) R133C и C131X в CH1 и L117C и C214X в CL;
- (17) K133C и C220X в CH1 и L117C и C214X в CL;
- (18) R133C и C131X в CH1 и F209C и C214X в CL;
- (19) R133C и C131X в CH1 и V209C и C214X в CL; или
- (20) K133C и C220X в CH1 и V209C и C214X в CL;

где X выбран из S, A или G.

В другом общем аспекте, изобретение относится к выделенным биспецифическим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим:

a. первую тяжелую цепь, H1;

b. вторую тяжелую цепь, H2;

c. первую легкую цепь, L1; и

d. вторую легкую цепь, L2;

где H1 и L1 образуют первое плечо, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает первый антиген, предпочтительно, первый антиген, происходящий от человека, и

где H2 и L2 образуют второе плечо, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген, предпочтительно, второй антиген происходящий от человека, где

(a) H1 содержит CH1 область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека и вариабельную область тяжелой цепи (VH область); и

(b) L1 содержит CL область легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека и вариабельную область легкой цепи (VL область);

где CH1 область, VH область, CL область и VL область содержат аминокислотные замены в аминокислотном остатке, соответствующем положению аминокислоты SEQ ID NO: 15, 21, 22 или 23 для CH1; SEQ ID NO: 13 для VH; SEQ ID NO: 19 или 24 для CL; и SEQ ID NO: 17 для VL;

где аминокислотные замены в CH1 области, VL области, CL области и VL области выбраны из:

(1) C220X в CH1, G44C в VH, C214X в CL и G101C в VL; или

(2) C131X в CH1, G44C в VH, C214X в CL и G101C в VL;

где X выбран из S, A или G.

В некоторых вариантах осуществления, первый антигенсвязывающий домен представляет собой CD47 связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления, VH область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CH1 область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, VL область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и CL область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления, второе плечо, содержащее H2 и L2, не содержит аминокислотные замены первого плеча, содержащего H1 и L1. В некоторых вариантах осуществления, каждая из двух тяжелых цепей H1 и H2 содержит VH область, CH1 область и Fc область (содержащую CH2 и CH3 области), где VL области имеют разные аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах осуществления, каждая из двух тяжелых цепей H1 и H2 содержит VH область, CH1 область и Fc область (содержащую CH2 и CH3 области), где CH1 области имеют разные аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах осуществления, каждая из двух тяжелых цепей H1 и H2 содержит VH область, CH1 область и Fc область (содержащую CH2 и CH3 области), где Fc области имеют разные аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах осуществления, каждая из двух легких цепей L1 и L2 содержит VL область и CL область, где VL области имеют разные аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах осуществления, каждая из двух легких цепей L1 и L2 содержит VL область и CL

область, где CL области имеют разные аминокислотные последовательности.

В некоторых вариантах осуществления, H1 и H2 образуют гетеродимер.

В некоторых вариантах осуществления, выделенное гуманизированное биспецифическое анти-CD47/анти-FR α антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны блокировать связывание сигнального регуляторного белка альфа (SIRP α) с CD47 на раковых клетках, которые экспрессируют как FR α , так и CD47.

В некоторых вариантах осуществления, выделенное гуманизированное биспецифическое анти-CD47/анти-FR α антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны индуцировать опосредованный макрофагами фагоцитоз раковых клеток, которые экспрессируют как FR α , так и CD47.

В некоторых вариантах осуществления, выделенное гуманизированное биспецифическое анти-CD47/анти-FR α антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно связывать раковые клетки, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, с минимальным или неопределяемым связыванием с эритроцитами человека (RBC).

Также предложены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие выделенные биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, описанные в настоящем документе.

Также предложены векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, описанные в настоящем документе.

Также предложены клетки-хозяева, содержащие векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенные биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Также предложены способы таргетирования FR α и CD47, оба которые экспрессируются на поверхности раковых клеток у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту фармацевтических композиций, содержащих выделенные биспецифические анти-CD47/анти-FR α антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Также предложены способы блокирования связывания SIRP α с CD47 на раковых клетках, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту фармацевтических композиций, содержащих выделенные биспецифические антитела анти-CD47/анти-FR α или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Также предложены способы индукции опосредованного макрофагами фагоцитоза раковых клеток, экспрессирующих как FR α , так и CD47, у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту фармацевтических композиций, содержащих

выделенные биспецифические анти-CD47/анти-FR α антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Также предложены способы связывания раковых клеток, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, с помощью биспецифического анти-CD47/анти-FR α антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с минимальным или неопределяемым связыванием с эритроцитами человека (RBC) у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтических композиций, содержащих выделенные биспецифические анти-CD47/анти-FR α антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Также предложены способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению. Рак может представлять собой любой гемобластоз или солидный рак, например, он может быть выбран из, но не ограничен ими, рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

Также предложены способы получения выделенного биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающие культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающих продуцирование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Также предложены способы получения фармацевтической композиции, содержащей выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающие объединение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Приведенная выше сущность и последующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки будут лучше понятны при прочтении вместе с приложенными чертежами. Однако следует понимать, что применение не ограничивается точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На ФИГ. 1А и 1В схематично показана структура биспецифического антитела с правым плечом против одного антигена (такого как CD47) и левым плечом против второго антигена (такого как FR α). Оба плеча имеют разные VL области тяжелой цепи и VL легкой цепи; тяжелые цепи (HC) и легкие цепи (LC) биспецифического антитела находятся в

каркасе IgG1 и каппа, соответственно, с целью представления примера. Мутации «выпуклость во впадине» (KiH) вводятся в области CH3 обоих HC, чтобы способствовать образованию гетеродимера. Кроме того, цистеиновый остаток был введен в каждую из двух областей CH3, соответственно, чтобы способствовать образованию межцепочечной дисульфидной связи для стабилизации гетеродимера. На ФИГ. 1А нативная межцепочечная дисульфидная связь между CH1 и CL (отмечена пунктирной линией) устраняется путем превращения нативных цистеинов, образующих дисульфидную связь, в серины; два нативных не цистеиновых остатка на CH1 и CL, соответственно, были преобразованы в цистеины с образованием новой межцепочечной дисульфидной связи между CH1 и CL. Аналогичная стратегия используется на ФИГ. 1В, за исключением того, что вновь образованная межцепочечная дисульфидная связь между HC и LC правого плеча находится между областями VH и VL. H1 и L1 представляют собой тяжелую цепь и легкую цепь плеча mAb 1, соответственно, и H2 и L2 представляют собой тяжелую цепь и легкую цепь плеча mAb 2, соответственно.

На ФИГ. 2А-2F показаны последовательности различных компонентов антител. На ФИГ. 2А-2D показаны последовательности VH (ФИГ. 2А), CH1 (ФИГ. 2В), VL (ФИГ. 2С) и CL (ФИГ. 2D) mAb 1 (на тяжелой цепи и легкой каппа-цепи IgG1 человека) и mAb 2 (на тяжелой цепи и легкой каппа-цепи IgG1 человека), соответственно (VH для mAb 1 (SEQ ID NO: 13); VH для mAb 2 (SEQ ID NO: 14); CH1 для mAb 1 (SEQ ID NO: 15); CH1 для mAb 2 (SEQ ID NO: 16); VL для mAb 1 (SEQ ID NO: 17); VL для mAb 2 (SEQ ID NO: 18); CL для mAb 1 (SEQ ID NO: 19); CL для mAb 2 (SEQ ID NO: 20)). Области CDR, определенные способом Kabat, выделены. Также выделены остатки цистеина, участвующие в образовании межцепочечной дисульфидной связи между тяжелой цепью и легкой цепью каждого плеча. На ФИГ. 2Е показано выравнивание областей CH1 IgG2 (SEQ ID NO: 21), IgG3 (SEQ ID NO: 22) и IgG4 (SEQ ID NO: 23) человека. На ФИГ. 2F показана CL область легкой цепи лямбда человека (SEQ ID NO: 24). * представляет сайты известных аллельных вариаций.

На ФИГ. 3А-3L показано трехмерное моделирование Fab области (содержащей VH, CH1, VL и CL) в плече mAb 1 для определения потенциальных сайтов для цистеиновых нокинов для образования новой межцепочечной дисульфидной связи между HC и LC. Пунктирная линия представляет собой нативную межцепочечную дисульфидную связь между HC и LC (нативная межцепочечная дисульфидная область не была включена в модели для bsAb 9, 10, 11 и 12, и поэтому в моделях эти 4 bsAb пунктирная линия отсутствует); сплошная линия представляет собой потенциальную новую межцепочечную дисульфидную связь, образованную новыми нокинами цистеина. ФИГ. 3А, трехмерная модель bsAb 1; ФИГ. 3В, 3-D модель bsAb 2; ФИГ. 3С, 3-D модель bsAb 3; ФИГ. 3D, 3-D модель bsAb 4; ФИГ. 3Е, 3-D модель bsAb 5; ФИГ. 3F, 3-D модель bsAb 6; ФИГ. 3G, 3-D модель bsAb 7; ФИГ. 3H, 3-D модель bsAb 8; ФИГ. 3I, 3-D модель bsAb 9; ФИГ. 3J, 3-D модель bsAb 10; ФИГ. 3K, 3-D модель bsAb 11; ФИГ. 3L, 3-D модель bsAb 12.

На ФИГ. 4А-4Н показаны профили ОФ-ВЭЖХ мутантных mAb, содержащих

различные сдвинутые межцепочечные дисульфидные связи в восстанавливающих или не восстанавливающих условиях; На ФИГ. 4I-4J показано связывание мутантных mAb, содержащих различные сдвинутые межцепочечные дисульфидные связи, с CD47 в анализе ELISA.

На ФИГ. 5A-5G показаны профили SEC (эксклюзионной хроматографии) мутантных mAb, содержащих различные сдвинутые межцепочечные дисульфидные связи, в исследовании термостабильности, в котором образцы инкубируют при разных температурах в течение 5 минут. Показана хроматограмма, соответствующая каждой температуре. Таблица на каждой ФИГ. показывает % AUC (площадь под кривыми) различных пиков для каждой заданной температуры. ФИГ. 5A, мутант mAb с конструкцией M1; ФИГ. 5B, мутант mAb с конструкцией M2; ФИГ. 5C, мутант mAb с конструкцией Z1; ФИГ. 5D, мутант mAb с конструкцией Z2; ФИГ. 5E, мутант mAb с конструкцией bsAb 10; ФИГ. 5F, мутант mAb с конструкцией bsAb 11; ФИГ. 5G, мутант mAb с конструкцией bsAb 12. HMW, высокомолекулярные соединения; MMW, средномолекулярные соединения (мутантные mAb); LMW, низкомолекулярные соединения.

На ФИГ. 6A-6H показаны профили SEC (эксклюзионной хроматографии) мутантных mAb, содержащих различные сдвинутые межцепочечные дисульфидные связи, в исследовании стабильности pH, в котором образцы инкубируют при pH 3,0 в течение различных периодов времени при комнатной температуре. Показана хроматограмма, соответствующая каждому периоду инкубации (0, 1, 3, 5 и 7 часов); 0-часовая хроматограмма представляет образец, который не подвергают инкубации при pH 3,0. В таблице на каждой ФИГ. показаны % AUC (площадь под кривыми) различных пиков для каждого заданного инкубационного периода. ФИГ. 6A, мутант mAb с конструкцией M1; ФИГ. 6B, мутант mAb с конструкцией M2; ФИГ. 6C, мутант mAb с конструкцией Z1; ФИГ. 6D, мутант mAb с конструкцией Z2; ФИГ. 6E, мутант mAb с конструкцией bsAb 5; ФИГ. 6F, мутант mAb с конструкцией bsAb 10; ФИГ. 6G, мутант mAb с конструкцией bsAb 11; ФИГ. 6H, мутант mAb с конструкцией bsAb 12. HMW, высокомолекулярные соединения; MMW, средномолекулярные соединения (мутантные mAb); LMW, низкомолекулярные соединения.

На ФИГ. 7A-7D показаны изображения SDS-PAGE биспецифических антител, очищенных с использованием хроматографии с белком А. На ФИГ. 7C, SDS-PAGE проводят в не восстанавливающих условиях; на ФИГ. 7D, SDS-PAGE проводят в восстанавливающих условиях.

На ФИГ. 8A-8J показаны графики, демонстрирующие результаты связывания очищенных от белка А биспецифических антител с обоими антигенами (т.е. CD47 и FR α) в мостиковом анализе ELISA.

На ФИГ. 9A-9N показаны профили эксклюзионной хроматографии (SEC) биспецифических антител, очищенных с использованием хроматографии с белком А (ФИГ. 9A-9E) или биспецифических антител, очищенных с использованием хроматографии с

белком А с последующей хроматографией гидрофобного взаимодействия (НІС) (ФИГ. 9F-9H). ФИГ. 9А, профиль SEC bsAb 1; ФИГ. 9В, профиль SEC bsAb 5; ФИГ. 9С, профиль SEC bsAb 6; ФИГ. 9D, профиль SEC bsAb 7; ФИГ. 9Е, профиль SEC bsAb 8; ФИГ. 9F, профиль SEC bsAb 5b (Е/К); ФИГ. 9G, профиль SEC bsAb 10 (Е/К); ФИГ. 9H, профиль SEC bsAb 12 (Е/К); ФИГ. 9I, профиль SEC bsAb 5b (К/Е); ФИГ. 9J, профиль SEC bsAb 10 (К/Е); ФИГ. 9K, профиль SEC bsAb 12 (К/Е); ФИГ. 9L, профиль SEC bsAb 5b; ФИГ. 9M, профиль SEC bsAb 10; ФИГ. 9N, профиль SEC bsAb 12.

На ФИГ. 10А-10L показаны профили ОФ-ВЭЖХ очищенных НІС биспецифических антител в не восстанавливающих условиях. ФИГ. 10А, профиль ОФ-ВЭЖХ bsAb 6; ФИГ. 10В, профиль ОФ-ВЭЖХ bsAb 7; ФИГ. 10С, профиль ОФ-ВЭЖХ bsAb 8; ФИГ. 10D, профиль ОФ-ВЭЖХ bsAb 5b (Е/К); ФИГ. 10Е, профиль ОФ-ВЭЖХ bsAb 10 (Е/К); ФИГ. 10F, профиль ОФ-ВЭЖХ bsAb 12 (Е/К); ФИГ. 10G, профиль ОФ-ВЭЖХ bsAb 5b (К/Е); ФИГ. 10H, профиль ОФ-ВЭЖХ bsAb 10 (К/Е); ФИГ. 10I, профиль ОФ-ВЭЖХ bsAb 12 (К/Е); ФИГ. 10J, профиль ОФ-ВЭЖХ bsAb 5b; ФИГ. 10K, профиль ОФ-ВЭЖХ bsAb 10; ФИГ. 10L, профиль ОФ-ВЭЖХ bsAb 12.

На ФИГ. 11А-11N показаны профили ОФ-ВЭЖХ очищенных НІС биспецифических антител в восстанавливающих условиях. ФИГ. 11А, профиль ОФ-ВЭЖХ контрольного антитела № 1, собранного с Н1, Н2 и L1 bsAb 7 и очищенного с помощью хроматографии с белком А; ФИГ. 11В, профиль ОФ-ВЭЖХ контрольного антитела № 2, собранного с Н1, Н2 и L2 bsAb 7 и очищенного с помощью хроматографии с белком А; ФИГ. 11С, профиль RP-HPLC очищенного НІС bsAb 6; ФИГ. 11D, профиль RP-HPLC очищенного НІС bsAb 7; ФИГ. 11Е, профиль RP-HPLC очищенного НІС bsAb 8; ФИГ. 11F, профиль RP-HPLC очищенного НІС bsAb 5b (Е/К); ФИГ. 11G, профиль RP-HPLC очищенного НІС bsAb 10 (Е/К); ФИГ. 11H, профиль RP-HPLC очищенного НІС bsAb 12 (Е/К); ФИГ. 11I, профиль RP-HPLC очищенного НІС bsAb 5b (К/Е); ФИГ. 11J, профиль RP-HPLC очищенного НІС bsAb 10 (К/Е); ФИГ. 11K, профиль RP-HPLC очищенного НІС bsAb 12 (К/Е); ФИГ. 11L, профиль ОФ-ВЭЖХ очищенного НІС bsAb 5b; ФИГ. 11M, профиль RP-HPLC очищенного НІС bsAb 10; ФИГ. 11N, профиль RP-HPLC очищенного НІС bsAb 12. Н1 и L1 представляют, соответственно, НС и LC плеча mAb 1 (анти-CD47); Н2 и L2 представляют, соответственно, НС и LC плеча mAb 2 (анти-FR α) (ФИГ. 11А-11Е) или плеча mAb 2b (анти-FR α) (ФИГ. 11F-11N). % ожидаемой площади представляет собой соотношение AUC, рассчитанное на основе аминокислотной последовательности каждой цепи; % площади представляет собой соотношение AUC, рассчитанное с использованием AUC всех 4 пиков каждого биспецифического антитела при ОФ-ВЭЖХ в условиях восстановления.

На ФИГ. 12А-12F показаны графики, демонстрирующие результаты связывания очищенных НІС биспецифических антител с обоими антигенами (т.е. CD47 и FR α) в мостиковом анализе ELISA. ФИГ. 12А, данные мостикового ELISA для bsAb 6, bsAb 7 и bsAb 8; ФИГ. 12В, данные мостикового ELISA для bsAb 5b (Е/К), bsAb 10 (Е/К) и bsAb 12 (Е/К); ФИГ. 12С, данные мостикового ELISA для bsAb 5b (К/Е); ФИГ. 12D, данные

мостикового ELISA для bsAb 10 (К/Е); ФИГ. 12Е, данные мостикового ELISA для bsAb 12 (К/Е); ФИГ. 12F, данные мостикового ELISA для bsAb 5b, bsAb 10 и bsAb 12.

На ФИГ. 13А-13С показано связывание очищенных НИС биспецифических антител с клетками SK-OV-3, которые, как известно, экспрессируют как CD47, так и FR α .

На ФИГ. 14А -14С показаны профили масс-спектрометрии (МС) переваренных папаином образцов биспецифических антител, очищенных НИС. Идентифицируют Fab фрагменты, полученные из обоих плеч (плеча mAb 1 и плеча mAb 2) каждого биспецифического антитела. ФИГ. 14А, МС профиль bsAb 6, переваренного папаином; ФИГ. 14В, МС профиль bsAb 7, переваренного папаином; ФИГ. 14С, МС профиль bsAb 8, переваренного папаином.

На ФИГ. 15А-15F показаны МС профили переваренных трипсином образцов биспецифических антител, очищенных НИС. Идентифицируют перекрестно-сшитый дисульфидом пептидный фрагмент, полученный из плеча mAb 1 каждого биспецифического антитела. Цистеины, образующие дисульфидную связь, выделены жирным шрифтом. ФИГ. 15А, МС профиль перекрестно-сшитого дисульфидом пептидного фрагмента, полученного из переваренного трипсином mAb 1 плеча bsAb 6; ФИГ. 15В, МС профиль перекрестно-сшитого дисульфидом пептидного фрагмента, полученного из переваренного трипсином моноклонального антитела 1 плеча bsAb 7; ФИГ. 15С, МС профиль перекрестно-сшитого дисульфидом пептидного фрагмента, полученного из переваренного трипсином mAb 1 плеча bsAb 8; ФИГ. 15D, МС профиль перекрестно-сшитого дисульфидом пептидного фрагмента, полученного из переваренного трипсином mAb 1 плеча bsAb 5b; ФИГ. 15Е, МС профиль перекрестно-сшитого дисульфидом пептидного фрагмента, полученного из переваренного трипсином mAb 1 плеча bsAb 10; ФИГ. 15F, МС профиль перекрестно-сшитого дисульфидом пептидного фрагмента, полученного из переваренного трипсином mAb 1 плеча bsAb 12.

На ФИГ. 16А-16С показаны МС профили переваренных протеазой IdeZ образцов биспецифических антител, очищенных с помощью НИС. Был идентифицирован (Fab')₂, полученный из каждого из биспецифических антител. ФИГ. 16А, МС профиль bsAb 6 (Fab')₂; ФИГ. 16В, МС профиль bsAb 7 (Fab')₂; ФИГ. 16С, МС профиль bsAb 8 (Fab')₂.

На ФИГ. 17А-17С показано ингибирование связывания антитела с клетками SK-OV-3 с помощью F(ab')₂, полученного из исходного анти-CD47 или анти-FR α mAb в анализе FACS. ФИГ. 17А, bsAb 5b; ФИГ. 17В, bsAb 10; ФИГ. 17С, bsAb 12. Исходное анти-FR α mAb, mAb, из которого анти-FR α плечо используют для конструирования биспецифических антител bsAb 5b, bsAb 10 и bsAb 12; исходное анти-CD47 mAb, mAb, из которого анти-CD47 плечо используют для конструирования биспецифических антител bsAb 5b, bsAb 10 и bsAb 12; АТ, антитело. Концентрации Ab, использованные в анализе, указаны под каждым графиком; 5000 нМ F(ab')₂ используют для оценки ингибирующего эффекта.

На ФИГ. 18А-18В показано последовательное связывание двух антигенов (CD47 и FR α) с биспецифическим антителом bsAb 12 на Biacore.

На ФИГ. 19А-19С показаны МС профили Fab фрагментов из переваренных папаином образцов биспецифических антител, очищенных белком А. ФИГ. 19А, биспецифическое антитело WT, очищенное белком А; ФИГ. 19В, bsAb 10, очищенное белком А; ФИГ. 19С, bsAb 12, очищенное белком А. Биспецифическое антитело дикого типа, биспецифическое антитело, полученное путем совместной экспрессии плеча mAb1 и плеча mAb 2b без введения мутаций (нативные межцепочечные дисульфидные связи присутствуют на обоих плечах); H1 и L1 представляют собой тяжелую цепь и легкую цепь плеча mAb 1, соответственно, и H2 и L2 представляют собой тяжелую цепь и легкую цепь плеча mAb 2b, соответственно; H1/L2 Fab и H2/L1 Fab представляют Fab фрагменты видов с ошибочно спаренными тяжелой/легкой цепями. ND, не обнаружено.

На ФИГ. 20. МС профиль Fab фрагментов переваренного папаином bsAb 12, очищенного белком А с последующей очисткой НИС. Виды с ошибочным спариванием не обнаружены.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описываются в разделе известного уровня техники и по всему описанию; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей и подобных, которые были включены в настоящее описание, проводится с целью обеспечения контекста изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все эти вопросы составляют часть известного уровня техники в отношении любых описанных или заявленных изобретений.

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. В остальном, некоторые используемые в настоящем документе термины имеют значения, указанные в описании.

Следует отметить, что используемые в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа «а», «an» и «the» включают ссылку на множественное число, если контекст явно не указывает иное.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как измененные во всех случаях термином «примерно». Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом, диапазон концентраций от 1% до 10% (масс./об.) включает от 0,9% (масс./об.) до 11% (масс./об.). Используемый в настоящем документе термин «числовой диапазон» явно включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в таких диапазонах и доли значений, если в контексте явно не указано иное.

Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду. Специалисты в данной области техники поймут или смогут установить, используя не более чем рутинные

эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются изобретением.

Используемые в настоящем документе термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий» или любой другой их вариант следует понимать как подразумевающий включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел, и предполагается, что они не являются исключительными или открытыми. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которые содержат список элементов, не обязательно ограничены только этими элементами, но могут включать другие элементы, не указанные явно или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если прямо не указано иное, «или» относится к включающему или, а не к исключаящему или. Например, условие А или В удовлетворяется любым из следующих условий: А истинно (или присутствует) и В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует) и В истинно (или присутствует), и оба А и В истинны (или присутствуют).

Используемый в настоящем документе соединительный термин «и/или» между несколькими указанными элементами понимается как охватывающий как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, когда два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к совместному применению первого и второго элементов. Подразумевается, что любой из этих вариантов подпадает под это значение и, следовательно, удовлетворяет требованию термина «и/или», используемого в настоящем документе. Одновременное применение более чем одного из вариантов также понимается как подпадающее под это значение и, следовательно, удовлетворяющее требованию термина «и/или».

Используемый в настоящем документе термин «состоит из» или варианты, такие как «состоит из» или «состоящий из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, но что никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не может быть добавлена к указанному способу, структуре или композиции.

Используемый в настоящем документе термин «состоит по существу из» или варианты, такие как «по существу состоит из» или «состоящий по существу из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, и необязательное включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

Используемый в настоящем документе термин «субъект» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека. Термин

«млекопитающее», используемый в данном документе, охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но не ограничены ими, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т.д., более предпочтительно человека.

Слова «правый», «левый», «нижний» и «верхний» обозначают направления на чертежах, на которые делается ссылка.

Также следует понимать, что термины «примерно», «приблизительно», «в целом», «по существу» и подобные им термины, используемые в настоящем документе применительно к размеру или характеристике компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанный размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительных вариаций от них, которые являются одинаковыми или подобными по функциональности, как это будет понятно специалистам в данной области техники. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовой параметр, должны включать варианты, которые с использованием математических и промышленных принципов, принятых в данной области техники (например, округления, измерения или других систематических ошибок, производственных допусков и т. д.), не изменят наименьшую значащую цифру.

Используемые в настоящем документе термины «разные тяжелые цепи» или «разные легкие цепи», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на то, что тяжелые цепи или легкие цепи имеют последовательности, которые не идентичны друг другу.

Термины «идентичный» или «доля идентичности» в контексте двух или нескольких последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов (например, биспецифических антител, анти-FR α антител, анти-CD47-антител, анти-CD47/анти-FR α биспецифических антител, FR α полипептидов и полинуклеотидов, которые их кодируют, и полипептидов CD47 и полинуклеотидов, которые их кодируют), относятся к двум или нескольким последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенную долю одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, измеренного с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или при визуальном осмотре.

Для сравнения последовательностей, обычно, одна последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравниваются тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, в компьютер вводят тестируемую и эталонную последовательности, при необходимости назначают координаты подпоследовательностей и назначают параметры программы алгоритма последовательности. Алгоритм сравнения последовательностей затем вычисляет долю идентичности последовательности для тестируемой последовательности(ей) по отношению к эталонной последовательности, основываясь на назначенных параметрах программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно провести, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), с помощью алгоритма гомологического выравнивания Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), поиска сходства способом Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или путем визуального осмотра (см. как правило, *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, подходящих для определения доли идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает в себя сначала идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) путем определения коротких слов длины W в последовательности запроса, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при сопоставлении со словом той же длины в последовательности базы данных. T упоминается как порог показателя сходства соседних слов (Altschul et al., выше). Эти начальные совпадения соседних слов действуют как исходные данные для инициирования поиска, чтобы найти более длинные HSP, содержащие их. Затем совпадения слов расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько может быть увеличена суммарная оценка выравнивания.

Суммарные оценки рассчитываются с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров M (поощрительный балл за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за ошибочно спаренные остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей используется матрица оценок для расчета суммарной оценки. Расширение совпадений слов в каждом направлении останавливается, когда: суммарная оценка выравнивания снижается на величину X от максимально достигнутого значения; суммарная оценка становится равной нулю или ниже из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательной оценкой; или достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST, W , T и X , определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину слова (W), равную 11, ожидание (E), равное 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей, программа BLASTP использует по умолчанию длину слова (W), равную 3, ожидание (E), равное 10, и матрицу оценок BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

В дополнение к вычислению доли идентичности последовательности, алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Одной из мер сходства, предоставленной алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая указывает вероятность того, что совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями произойдет случайно. Например, нуклеиновая кислота считается сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее примерно 0,1, более предпочтительно, менее примерно 0,01, и наиболее предпочтительно, менее примерно 0,001.

Дополнительным признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот или полипептидов по существу идентичны, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, является иммунологически перекрестно реактивным с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно по существу идентичен второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот по существу идентичны, является то, что две молекулы гибридизуются друг с другом в жестких условиях.

Используемый в настоящем документе термин «полинуклеотид», синонимично обозначаемый как «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты», относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. «Полинуклеотиды» включают, без ограничения, одно- и двухцепочечную ДНК, ДНК, представляющую собой смесь одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечную РНК и РНК, представляющую собой смесь одно- и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, что более часто, двухцепочечными или смесью одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, «полинуклеотид» относится к трехцепочечным областям, содержащим РНК или ДНК, или и РНК, и ДНК. Термин «полинуклеотид» также включает ДНК или РНК, содержащие одно или несколько модифицированных оснований, и ДНК или РНК с остовами, модифицированными для стабильности или по другим причинам. «Модифицированные» основания включают, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; таким образом, «полинуклеотид» включает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, которые обычно встречаются в природе, и химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. «Полинуклеотид» также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

Используемый в данном документе термин «вектор» представляет собой репликон,

в который может быть функционально вставлен другой сегмент нуклеиновой кислоты, чтобы вызвать репликацию или экспрессию сегмента.

Используемый в настоящем документе термин «клетка-хозяин» относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению. «Клетка-хозяин» может представлять собой клетку любого типа, например, первичную клетку, клетку в культуре или клетку из клеточной линии. В одном варианте осуществления, «клетка-хозяин» представляет собой клетку, трансфицированную молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению. В другом варианте осуществления, «клетка-хозяин» представляет собой потомство или потенциальное потомство такой трансфицированной клетки. Потомство клетки может быть или не быть идентичным родительской клетке, например, из-за мутаций или воздействий окружающей среды, которые могут происходить в последующих поколениях, или из-за интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

Используемый в настоящем документе термин «экспрессия» относится к биосинтезу генного продукта. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или несколько полипептидов и, кроме того, охватывает все встречающиеся в природе посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Экспрессированное биспецифическое антитело может находиться в цитоплазме клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как среда для роста клеточной культуры, или может быть закреплено на клеточной мембране.

Используемые в настоящем документе термины «пептид», «полипептид» или «белок» могут относиться к молекуле, состоящей из аминокислот, и могут быть распознаны специалистами в данной области техники как белок. В настоящем документе используется обычный однобуквенный или трехбуквенный код аминокислотных остатков. Термины «пептид», «полипептид» и «белок» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может быть прерван не аминокислотами. Эти термины также охватывают полимер аминокислоты, который был модифицирован естественным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацетилированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такими как конъюгация с метящим компонентом. Также в определение включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислоты (включая, например, аминокислоты не природного происхождения и т. д.), и другие модификации, известные в данной области техники.

Описанные в настоящем документе пептидные последовательности записываются в соответствии с обычным соглашением, согласно которому N-концевая область пептида находится слева, и C-концевая область находится справа. Хотя известны изомерные формы аминокислот, представлена L-форма аминокислоты, если не указано иное.

Биспецифические антитела

Изобретение в целом относится к выделенным биспецифическим антителам, в которых нативные цистеиновые остатки для межцепочечной дисульфидной связи между СН1 областью тяжелой цепи и СL областью легкой цепи одного плеча, удаляются путем превращения нативных цистеиновых остатков в не цистеиновые остатки (например, от нативных цистеиновых остатков до сериновых остатков); одновременно или последовательно два нативных не цистеиновых остатка в областях СН1 и СL или в областях VH и VL одного и того же плеча превращаются в цистеины, так что между тяжелой цепью и легкой цепью образуется новая дисульфидная связь между цепями. Два нативных не цистеиновых остатка, по одному в СН1 области и СL области или по одному в VL области и VL области, идентифицируют с помощью структурного моделирования на предмет их близости и способности образовывать межцепочечную дисульфидную связь после превращения в цистеины. Аминокислотные замены приводят к наименьшему нарушению общей структуры антигенсвязывающего домена. Общий эффект изобретения заключается в том, что нативная межцепочечная дисульфидная связь между областями СН1 и СL в одном плече биспецифического антитела смещается в другой сайт с рекомбинантно введенными цистеинами, и нативная межцепочечная дисульфидная связь во втором плече остается неизменной.

Изобретение, как правило, также относится к выделенным биспецифическим антителам, в которых одно плечо имеет сдвинутую межцепочечную дисульфидную связь, как описано выше, и другое плечо имеет нативную межцепочечную дисульфидную связь, образующим гетеродимер, где одно плечо содержит смещенную межцепочечную дисульфидную связь, и второе плечо содержит нативную межцепочечную дисульфидную связь. Биспецифическое антитело способно связываться с двумя антигенами. Биспецифические антитела, образованные двумя разными тяжелыми цепями (HC) и легкими цепями (LC), трудно получить из-за склонности к ошибочному спариванию двух тяжелых цепей и двух легких цепей, что приводит к образованию нежелательных продуктов, которые трудно исключить в процессе производства; даже когда нежелательные продукты ошибочного спаривания могут быть удалены во время очистки, ошибочное спаривание снижает эффективность продуцирования предполагаемого продукта биспецифического антитела. Были предприняты различные стратегии для уменьшения или устранения ошибочного спаривания HC и LC, но многие из них включают конструирование белков, включая замену домена и мутагенез, что приводит к повышенному риску агрегации и иммуногенности. Путем введения «смещенной межцепочечной дисульфидной связи» в одном плече при сохранении нативной межцепочечной дисульфидной связи во втором плече и одновременного введения выпуклости во впадину и мутаций цистеина, образующих дисульфидную связь, в Fc областях можно продуцировать гетеродимерное биспецифическое антитело с улучшенной эффективностью. Продуцирование таких биспецифических антител, включая, но не ограничиваясь ими, биспецифические анти-CD47/анти-FRα антитела, можно

осуществлять путем совместной экспрессии двух тяжелых цепей и двух легких цепей.

Антитела

Изобретение в общем относится к выделенным биспецифическим антителам со смещенной межцепочечной дисульфидной связью на одном плече при сохранении нативной межцепочечной дисульфидной связи на втором плече. В частности, изобретение в общем относится к биспецифическим анти-CD47/анти-FR α антителам, нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и композициям, содержащим антитела. Также предложены способы получения антител и способы применения антител для лечения заболеваний, включая рак. Антитела по настоящему изобретению обладают одним или несколькими желательными функциональными свойствами, включая, помимо прочего, высокоаффинное связывание с FR α и CD47, высокую специфичность к FR α и CD47, способность индуцировать эффекторно-опосредованный лизис опухолевых клеток, способность стимулировать комплементзависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимый фагоцитоз (ADPC) и/или антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) в отношении клеток, экспрессирующих FR α и/или CD47, способность опосредовать рекрутирование конъюгированных лекарственных средств и способность ингибировать рост опухоли у субъектов и животных моделей при введении отдельно или в комбинации с другими противораковыми терапиями.

Используемый в настоящем документе термин «антитело» используется в широком смысле и включает иммуноглобулины или молекулы антител, включая человеческие, гуманизированные, составные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. Как правило, антитела представляют собой белки или пептидные цепи, обладающие специфичностью связывания с конкретным антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины могут быть отнесены к пяти основным классам (т.е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоформы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела по изобретению могут относиться к любому из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно, антитела по изобретению представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител позвоночных видов могут быть отнесены к одному из двух четко различающихся типов, а именно каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Соответственно, антитела по изобретению могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитела по изобретению включают константные области тяжелой и/или легкой цепи антител крысы или человека. В дополнение к константным доменам тяжелой и легкой цепи, антитела содержат антигенсвязывающую область, состоящую из вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т.е. определяющие комплементарность области 1-3; CDR1, CDR2 и CDR3).

Домены переменной области легкой цепи альтернативно обозначаются как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и домены переменной области тяжелой цепи альтернативно обозначаются как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

Несколько систем используют для нумерации аминокислотных остатков в антителах. Способ нумерации Kabat представляет собой схему, основанную на переменных участках антител (Elvin A. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 5th ed. (1991)). Система нумерации EU широко используется для константных доменов (включая части CH1, шарнир и Fc) (Elvin A. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 5th ed. (1991)).

Используемый в настоящем документе термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с $FR\alpha$, по существу не содержит антител, которые не связываются с $FR\alpha$, выделенное антитело, которое специфически связывается с CD47, по существу не содержит антител, которые не связываются с CD47, биспецифическое антитело, которое специфически связывается с CD47 и $FR\alpha$, по существу не содержит антител, которые не связываются с CD47 и $FR\alpha$). Кроме того, выделенное антитело по существу не содержит другого клеточного материала и/или химических веществ.

Используемый в настоящем документе термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены способом гибридомы, технологией фагового дисплея, технологией клонирования одного гена лимфоцита или способами рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела могут быть получены гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного животного, отличного от человека, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющего геном, содержащий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека.

Используемый в настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv фрагмент, стабилизированный дисульфидом Fv фрагмент (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), диатело, стабилизированное дисульфидом (ds диатело), молекула одноцепочечного антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), димер scFv (двухвалентное диатело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или несколько CDR, верблужье однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не включает полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент способен связываться с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент

содержит переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи и Fd сегмент тяжелой цепи. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

Используемый в настоящем документе термин «одноцепочечное антитело» относится к обычному одноцепочечному антителу в данной области техники, которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом, состоящим примерно из 15-20 аминокислот. Используемый в настоящем документе термин «однодоменное антитело» относится к обычному однодоменному антителу в данной области техники, которое содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

Используемый в настоящем документе термин «антитело человека» относится к антителу, продуцируемому человеком, или к антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеком, полученному с использованием любого метода, известного в данной области техники. Это определение антитела человека включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие, по меньшей мере, один полипептид тяжелой и/или легкой цепи человека.

Используемый в настоящем документе термин «гуманизированное антитело» относится к антителу нечеловеческого происхождения, которое модифицировано для увеличения гомологии последовательности с последовательностью антитела человека, так что антигенсвязывающие свойства антитела сохраняются, но его антигенность в теле человека уменьшается.

Используемый в настоящем документе термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина происходит от двух или нескольких видов. Переменная область как легкой, так и тяжелой цепей часто соответствует переменной области антитела, полученного из одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т. д.), имеющего желаемую специфичность, аффинность и способность, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела, полученным от другого вида млекопитающих (например, человека), чтобы избежать иммунного ответа у этого вида.

Используемый в настоящем документе термин «мультиспецифическое антитело» относится к антителу, которое содержит множество последовательностей переменных доменов иммуноглобулина, где первая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и вторая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, *например*, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы перекрываются или по

существу перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы не перекрываются или по существу не перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, *например*, на разных белках (или на разных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый вариабельный домен иммуноглобулина. В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, молекулу триспецифического антитела или молекулу тетраспецифического антитела.

Используемый в настоящем документе термин «биспецифическое антитело» относится к мультиспецифическому антителу, которое связывает не более двух эпитопов или двух антигенов. Биспецифическое антитело характеризуется последовательностью первого вариабельного домена иммуноглобулина, обладающей специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и последовательностью второго вариабельного домена иммуноглобулина, обладающей специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, *например*, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, *например*, на разных белках (или на разных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и последовательностью вариабельного домена тяжелой цепи и последовательностью вариабельного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит половину антитела или его фрагмента, обладающего специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и половину антитела или его фрагмента, обладающего специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания в отношении второго эпитопа.

Используемый в настоящем документе термин «FR α » относится к фолатному рецептору α , также известному как фолатный рецептор 1 (FOLR1) или фолатсвязывающему белку (FBP), который представляет собой гликозил-фосфатидилинозит (GPI)-заякоренный мембранный белок на клеточной поверхности, который обладает высоким сродством к и транспортирует активную форму фолата, 5-метилтетрагидрофолат (5-MTHF), и его производные, клетки (Salazar and Ratnam, Cancer Metastasis Rev 2007; 26:141-52). FR α стал онкологической мишенью, поскольку он сверхэкспрессирован в некоторых солидных опухолях, таких как рак яичников, легких и

молочной железы (Toffoli et al., Int J Cancer 1997; 74:193-198 and Boogerd et al., Oncotarget 2016; 7:17442-17454), но его экспрессия находится на низких уровнях в ограниченных нормальных тканях человека (Weitman, et al., Cancer Res 1992; 52:3396-3401). В соответствии с этим наблюдением, клинические испытания фазы 1, проведенные на настоящий момент времени, с малыми и большими молекулами, таргетирующими FR α , показали хорошую переносимость лекарственного средства (Cheung et al., Oncotarget 2016; 7:52553-52574). Таким образом, FR α является опухолеассоциированным/опухолеспецифическим антигеном, и анти-FR α моноклональные антитела (mAbs) и биспецифические антитела могут представлять собой потенциальную противораковую терапию. Кроме того, FR α можно использовать для специфического таргетирования терапевтических молекул на раковые клетки. Типовая аминокислотная последовательность FR α человека представлена в GenBank под номером доступа NP_057937.1.

Используемый в настоящем документе термин «CD47» относится к многоспиральному трансмембранному рецептору, принадлежащему к суперсемейству иммуноглобулинов, который, как показано, участвует во многих клеточных процессах, включая миграцию клеток, адгезию и функцию Т-клеток. CD47, также известный как интегрин-ассоциированный белок (IAP), антиген рака яичников (OA3), Rh-родственный антиген и MER6, первоначально был идентифицирован как опухолевый антиген при раке яичников человека, и впоследствии было показано, что он экспрессируется при множественных типах опухолей человека, включая как гематологические, так и солидные опухоли. Взаимодействие между CD47 и сигнальным регуляторным белком альфа (SIRP α), ингибирующим белком, экспрессируемым на макрофагах, предотвращает фагоцитоз клеток, экспрессирующих CD47. CD47 дополнительно экспрессируется на низких уровнях по существу во всех не злокачественных клетках. Термин «CD47 человека» относится к CD47, происходящему от человека. Типовая аминокислотная последовательность CD47 человека представлена в GenBank под номером доступа NP_001768.1.

Используемый в настоящем документе термин антитело, которое «специфически связывается с CD47 и/или FR α » относится к антителу, которое связывается с CD47 и/или FR α , предпочтительно, CD47 человека и/или FR α человека, с KD 1×10^{-7} М или меньше, предпочтительно, 1×10^{-8} М или меньше, более предпочтительно, 5×10^{-9} М или меньше, 1×10^{-9} М или меньше, 5×10^{-10} М или меньше или 1×10^{-10} М или меньше. Термин «KD» относится к константе диссоциации, которую получают из отношения Kd к Ka (т.е. Kd/Ka) и выражают в виде молярной концентрации (М). Значения KD для антител могут быть определены с использованием способов, известных в данной области техники, с учетом настоящего описания. Например, KD антитела можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с помощью биосенсорной системы, например, системы Biacore®, или с помощью технологии биослойной интерферометрии, такой как система Octet RED96.

Чем меньше значение KD антитела, тем выше аффинность, с которой антитело связывается с антигеном-мишенью.

Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенным биспецифическим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим:

- a. первую тяжелую цепь, H1;
- b. вторую тяжелую цепь, H2;
- c. первую легкую цепь, L1; и
- d. вторую легкую цепь, L2;

где H1 и L1 образуют первое плечо, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает первый антиген, предпочтительно, первый антиген, происходящий от человека, и

где H2 и L2 образуют второе плечо, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген, предпочтительно, второй антиген происходящий от человека, где

(a) H1 содержит CH1 область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека; и

(b) L1 содержит CL область легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека;

где CH1 и CL области содержат аминокислотные замены или нативную аминокислоту в аминокислотном остатке, соответствующем положению аминокислоты SEQ ID NO: 15, 21, 22 или 23 для CH1 и SEQ ID NO: 19 или 24 для CL;

где аминокислотные замены или нативную аминокислоту в областях CH1 и CL выбраны из:

- (1) K133C и C220X в CH1 и F209C и C214X в CL;
- (2) S131C и C220X в CH1 и P119C и C214X в CL;
- (3) K133C и C220X в CH1 и K207C и C214X в CL;
- (4) F170C и C220X в CH1 и S176C и C214X в CL;
- (5) P171C и C220X в CH1 и S162C и C214X в CL;
- (6) V173C и C220X в CH1 и Q160C и C214X в CL;
- (7) F170C и C131X в CH1 и S176C и C214X в CL;
- (8) P171C и C131X в CH1 и S162C и C214X в CL;
- (9) V173C и C131X в CH1 и Q160C и C214X в CL;
- (10) A129C и C220X в CH1 и S121C и C214X в CL;
- (11) K133C и C220X в CH1 и I117C и C214X в CL;
- (12) C131 в CH1 и P119C и C214X в CL;
- (13) A129C и C131X в CH1 и S121C и C214X в CL;
- (14) R133C и C131X в CH1 и K207C и C214X в CL;
- (15) R133C и C131X в CH1 и I117C и C214X в CL;
- (16) R133C и C131X в CH1 и L117C и C214X в CL;
- (17) K133C и C220X в CH1 и L117C и C214X в CL;
- (18) R133C и C131X в CH1 и F209C и C214X в CL;

(19) R133C и C131X в CH1 и V209C и C214X в CL; или

(20) K133C и C220X в CH1 и V209C и C214X в CL;

где X выбран из S, A или G.

Согласно другому конкретному аспекту, изобретение относится к выделенным биспецифическим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим:

a. первую тяжелую цепь, H1;

b. вторую тяжелую цепь, H2;

c. первую легкую цепь, L1; и

d. вторую легкую цепь, L2;

где H1 и L1 образуют первое плечо, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает первый антиген, предпочтительно, первый антиген, происходящий от человека, и

где H2 и L2 образуют второе плечо, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген, предпочтительно, второй антиген происходящий от человека, где

(a) H1 содержит CH1 область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека и вариабельную область тяжелой цепи (VH область); и

(b) L1 содержит CL область легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека и вариабельную область легкой цепи (VL область);

где CH1 область, VH область, CL область и VL область содержат аминокислотные замены в аминокислотном остатке, соответствующем положению аминокислоты SEQ ID NO: 15, 21, 22 или 23 для CH1; SEQ ID NO: 13 для VH; SEQ ID NO: 19 или 24 для CL; и SEQ ID NO: 17 для VL;

где аминокислотные замены в CH1 области, VL области, CL области и VL области выбраны из:

(1) C220X в CH1, G44C в VH, C214X в CL и G101C в VL; или

(2) C131X в CH1, G44C в VH, C214X в CL и G101C в VL;

где X выбран из S, A или G.

Согласно другому конкретному аспекту, первый антигенсвязывающий домен представляет собой CD47 связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления, VH область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CH1 область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, VL область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и CL область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

В соответствии с другим конкретным аспектом, (a) второе плечо, включающее H2 и L2, не содержит аминокислотные замены первого плеча, включающего H1 и L1; (b) каждая из двух тяжелых цепей H1 и H2 содержит VH область, CH1 область и Fc область (содержащую CH2 и CH3 области), где VL области имеют разные аминокислотные последовательности; (c) каждая из двух тяжелых цепей H1 и H2 содержит VH область, CH1 область и Fc область (содержащую CH2 и CH3 области), где CH1 области имеют разные

аминокислотные последовательности; (d) каждая из двух тяжелых цепей H1 и H2 содержит VH область, CH1 область и Fc область (содержащую CH2 и CH3 области), где Fc области имеют разные аминокислотные последовательности; (e) каждая из двух легких цепей L1 и L2 содержит VL область и CL область, где VL области имеют разные аминокислотные последовательности; и/или (f) каждая из двух легких цепей L1 и L2 содержит VL область и CL область, где CL области имеют разные аминокислотные последовательности.

В другом конкретном аспекте, H1 и H2 образуют гетеродимер.

В другом конкретном аспекте, (a) VH область H1 и VL область L1 имеют замещающую мутацию Q39E и Q38K, соответственно, и VH область H2 и VL область L2 имеют замещающую мутацию Q39K и Q38E, соответственно; или VH область H1 и VL область L1 имеют замещающую мутацию Q39K и Q38E, соответственно, и VH область H2 и VL область L2 имеют замещающую мутацию Q39E и Q38K, соответственно.

В другом конкретном аспекте, выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-CD47/анти-FR α биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD47/анти-FR α биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно блокировать связывание сигнального регуляторного белка альфа (SIRP α) с CD47 на раковых клетках, которые экспрессируют как FR α , так и CD47. В некоторых вариантах осуществления, выделенное гуманизованное анти-CD47/анти-FR α биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны индуцировать опосредованный макрофагами фагоцитоз раковых клеток, которые экспрессируют как FR α , так и CD47. В некоторых вариантах осуществления, выделенное гуманизованное анти-CD47/анти-FR α биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно связывать раковые клетки, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, с минимальным или неопределяемым связыванием с эритроцитами человека (RBC).

В другом конкретном аспекте, первый антигенсвязывающий домен имеет последовательность VH SEQ ID: 13 и последовательность VL SEQ ID: 17, и второй антигенсвязывающий домен имеет последовательность VH SEQ ID: 33 и последовательность VL SEQ ID: 35; или первый антигенсвязывающий домен имеет последовательность VH SEQ ID: 13 и последовательность VL SEQ ID: 17, и второй антигенсвязывающий домен имеет последовательность VH SEQ ID: 14 и последовательность VL SEQ ID: 18.

Полноразмерные биспецифические антитела по настоящему изобретению могут быть получены, например, с использованием обмена плечами Fab (или обмена половинами молекул) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами путем введения замен на границе CH3 тяжелой цепи в каждой половине молекулы, чтобы способствовать образованию гетеродимера из двух половин антитела, обладающих разной специфичностью, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с помощью коэкспрессии. Реакция обмена плечами Fab является результатом реакции изомеризации дисульфидной связи и диссоциации-ассоциации CH3 доменов. Дисульфидные связи тяжелой цепи в

шарнирных областях исходных моноспецифических антител уменьшены. Образовавшиеся свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидную связь между тяжелыми цепями с цистеиновыми остатками молекулы второго исходного моноспецифического антитела, и одновременно высвобождаются и восстанавливаются СНЗ домены исходных антител путем диссоциации-ассоциации. СНЗ домены плеч Fab могут быть сконструированы таким образом, чтобы способствовать гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два плеча Fab или половинные молекулы, каждое из которых связывает отдельный эпитоп, т.е. эпитоп на CD47 и эпитоп на FR α .

Используемый в настоящем документе термин «гомодимеризация» относится к взаимодействию двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности СНЗ. Используемый в настоящем документе термин «гомодимер» относится к антителу, имеющему две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Используемый в настоящем документе термин «гетеродимеризация» относится к взаимодействию двух тяжелых цепей, имеющих не идентичные аминокислотные последовательности СНЗ. Используемый в настоящем документе термин «гетеродимер» относится к антителу, имеющему две тяжелые цепи с не идентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Стратегия «выпуклость во впадине» (см., например, публикацию РСТ № WO 2006/028936) может быть использована для получения полноразмерных биспецифических антител. Коротко, выбранные аминокислоты, образующие поверхность раздела доменов СНЗ в IgG человека, могут быть мутированы в положениях, влияющих на взаимодействие СНЗ домена, чтобы способствовать образованию гетеродимера. Аминокислота с малой боковой цепью (впадина) вводится в тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном, и аминокислота с большой боковой цепью (выпуклость) вводится в тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося второй антиген. После коэкспрессии двух антител образуется гетеродимер в результате преимущественного взаимодействия тяжелой цепи с «впадиной» с тяжелой цепью с «выпуклостью». Типовые пары замен СНЗ, образующие выпуклость и впадину, представляют собой (показанные как измененные положения в первом СНЗ домене первой тяжелой цепи/измененные положения во втором СНЗ домене второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Могут быть использованы другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелой цепи с использованием электростатических взаимодействий путем замены положительно заряженных остатков на одной поверхности СНЗ и отрицательно заряженных остатков на второй поверхности СНЗ, как описано в публикации патента США № 2010/0015133; публикации патента США № 2009/0182127; публикации патента США № 2010/028637; или публикации патента США №

2011/0123532. В других стратегиях, гетеродимеризации могут способствовать следующие замены (показанные как модифицированное положение в первом СНЗ домене первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором СНЗ домене второй тяжелой цепи): L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V K409F Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в публикации патента США № 2012/0149876 или публикации патента США № 2013/0195849.

В дополнение к способам, описанным выше, биспецифические антитела по изобретению могут быть получены *in vitro* в бесклеточной среде путем введения асимметричных мутаций в СНЗ области двух моноспецифических гомодимерных антител и образования биспецифического гетеродимерного антитела из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстанавливающих условиях, обеспечивающих изомеризацию дисульфидной связи в соответствии со способами, описанными в публикации патента РСТ № WO2011/131746. В способах, первое моноспецифическое двухвалентное антитело и второе моноспецифическое двухвалентное антитело сконструированы так, чтобы иметь определенные замены в СНЗ домене, которые способствуют стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы позволить цистеинам в шарнирной области подвергнуться изомеризации дисульфидной связи; тем самым образуя биспецифическое антитело путем обмена плечами Fab. Условия инкубации необязательно могут быть восстановлены до не восстанавливающих условий. Примерами восстанавливающих агентов, которые можно использовать, являются 2-меркаптоэтиламин (2-МЕА), дитиотреитол (DTT), дитиозритрит (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно, восстанавливающий агент выбран из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Например, инкубация в течение, по меньшей мере, 90 минут при температуре, по меньшей мере, 20°C в присутствии, по меньшей мере, 25 мМ 2-МЕА или в присутствии, по меньшей мере, 0,5 мМ дитиотреитола при pH от 5 до 8, например, при pH 7,0 или при pH 7,4.

В другом общем аспекте, изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Специалистам в данной области будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, заменена, удалена, вставлена и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области техники будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, могут быть изменены без изменения аминокислотных последовательностей белков.

В другом общем аспекте, изобретение относится к вектору, содержащему

выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области техники, в свете настоящего изобретения, такой как плаزمид, космид, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии, такой как плазмид. Вектор может включать любой элемент для установления обычной функции вектора экспрессии, например, промотор, элемент связывания рибосомы, терминатор, энхансер, маркер селекции и точку начала репликации. Промотор может быть конститутивным, индуцируемым или репрессируемым промотором. Ряд векторов экспрессии, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известен в данной области техники и может быть использован в настоящем документе для продуцирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке. Для создания рекомбинантного вектора экспрессии в соответствии с вариантами осуществления изобретения, можно использовать обычные способы клонирования или синтез искусственных генов. Такие методики хорошо известны специалистам в данной области в связи с настоящим изобретением.

В другом общем аспекте, изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Любая клетка-хозяин, известная специалистам в данной области техники, в связи с настоящим описанием, может быть использована для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления, клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli* TG1 или BL21 (для экспрессии, например, антитела scFv или Fab), клетки CHO-DG44 или CHO-K1 или клетки HEK293 (для экспрессии, например, полноразмерного IgG антитела). В соответствии с конкретными вариантами осуществления, рекомбинантный вектор экспрессии трансформируют в клетки-хозяева обычными способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, где он стабильно интегрируется в геном клетки-хозяина, так что рекомбинантная нуклеиновая кислота эффективно экспрессируется.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающих получение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, и выделение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть собраны из клеток и очищены в соответствии с обычными методами, известными в данной области техники, и как описано в настоящем документе.

Фармацевтические композиции

В другом общем аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в настоящем документе термин «фармацевтическая композиция» означает продукт, содержащий антитело по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Антитела по настоящему изобретению и композиции, их содержащие, также можно использовать в производстве упомянутого в настоящем документе лекарственного средства для терапевтического применения.

Используемый в настоящем документе термин «носитель» относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, липидсодержащей везикуле, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники для использования в фармацевтических составах. Понятно, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от пути введения для конкретного применения. Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не влияет на эффективность композиции по изобретению или биологическую активность композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, с точки зрения настоящего описания, любой фармацевтически приемлемый носитель, пригодный для использования в фармацевтической композиции антитела, может быть использован в изобретении.

Состав фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известен в данной области техники, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21 издание (2005) и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают: буферы, разбавители, растворители, агенты, регулирующие тоничность, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или несколько фармацевтически приемлемых носителей могут быть использованы при составлении фармацевтических композиций по изобретению.

В одном варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция представляет собой жидкий состав. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, т.е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может включать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и подобное. Водный состав обычно содержит, по меньшей мере, 50% масс/масс воды или, по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или, по меньшей мере 95% масс/масс воды.

В одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция может быть составлена в виде инъекционного лекарственного средства, которое можно вводить, например, с помощью инъекционного устройства (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекцию можно вводить, например, подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутривитреально, интравитреально или интравитреально.

В другом варианте осуществления, фармацевтическая композиция представляет собой твердый состав, например, лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно использовать как есть, или к которой врач или пациент перед применением добавляет растворители и/или разбавители. Твердые дозированные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки и/или таблетки с покрытием, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция также может быть в форме саше, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков для восстановления, например.

Дозированные формы могут быть с немедленным высвобождением, и в этом случае они могут включать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут быть с отсроченным высвобождением, пролонгированным высвобождением или модифицированным высвобождением, и в этом случае они могут содержать водонерастворимые полимеры, которые регулируют скорость растворения дозированной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

В других вариантах осуществления, фармацевтическую композицию можно доставлять интраназально, интрабуккально или сублингвально.

pH водного состава может быть между pH 3 и pH 10. В одном варианте осуществления изобретения, pH композиции составляет от примерно 7,0 до примерно 9,5. В другом варианте осуществления изобретения, pH состава составляет от примерно 3,0 до примерно 7,0.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит буфер. Неограничивающие примеры буферов включают: аргинин, аспарагиновую кислоту, бицин, цитрат, гидрофосфат динатрия, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, винную кислоту, трицин и трис(гидроксиметил)аминометан и их смеси. Буфер может присутствовать индивидуально или в агрегате в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных буферов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит консервант. Неограничивающие примеры консервантов включают: хлорид бензетония, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил 4-гидроксibenзоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенезин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил 4-гидроксibenзоат, имидомочевину, метил 4-гидроксibenзоат, фенол, 2-феноксietанол, 2-фенилэтанол, пропил 4-гидроксibenзоат, дегидроацетат натрия, тиомеросал и их смеси. Консервант может присутствовать индивидуально или в агрегате, в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных консервантов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит изотонический агент. Неограничивающие примеры изотонических агентов включают соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновая кислота, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин, 1,2-пропандиол, пропиленгликоль), 1,3-пропандиол и 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, PEG400) и их смеси. Другой пример изотонического агента включает сахар. Неограничивающими примерами сахаров могут быть моно-, ди- или полисахариды или водорастворимые глюканы, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа- и бета-HPCD, растворимый крахмал, гидроксипропилоккрахмал и карбоксиметилцеллюлозу натрия. Другим примером изотонического агента является сахарный спирт, где термин «сахарный спирт» определяется как C(4-8) углеводород, имеющий, по меньшей мере одну группу -ОН. Неограничивающие примеры сахарных спиртов включают маннит, сорбит, инозит, галактит, дульцит, ксилит и арабит. Фармацевтические композиции, включающие каждый изотонический агент, перечисленный в этом абзаце, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения. Изотонический агент может присутствовать индивидуально или в агрегате в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных изотонических агентов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит хелатирующий агент. Неограничивающие примеры хелатирующих агентов включают лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) и их смеси. Хелатирующий агент может присутствовать индивидуально или в агрегате в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных хелатирующих агентов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Неограничивающие примеры стабилизаторов включают один или несколько ингибиторов агрегации, один или несколько ингибиторов окисления, одно или несколько поверхностно-активных веществ и/или один или несколько ингибиторов протеазы.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит стабилизатор, где указанный стабилизатор представляет собой карбокси-/гидроксицеллюлозу и их производные (такие как HPC, HPC-SL, HPC-L и HPMS), циклодекстрины, 2-метилтиоэтанол, полиэтиленгликоль (такой как PEG 3350), поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон, соли (такие как хлорид натрия), серосодержащие вещества, такие как монотиоглицерин) или тиогликолевую кислоту.

Стабилизатор может присутствовать отдельно или в агрегате в концентрации от примерно 0,01 мг/мл до примерно 50 мг/мл, например, от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных стабилизаторов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В дополнительных вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит одно или несколько поверхностно-активных веществ, предпочтительно, поверхностно-активное вещество, по меньшей мере, одно поверхностно-активное вещество или два разных поверхностно-активных вещества. Термин «поверхностно-активное вещество» относится к любым молекулам или ионам, которые состоят из водорастворимой (гидрофильной) части и жирорастворимой (липофильной) части. Поверхностно-активное вещество может быть выбрано, например, из группы, состоящей из анионных поверхностно-активных веществ, катионных поверхностно-активных веществ, неионных поверхностно-активных веществ и/или цвиттерионных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может присутствовать индивидуально или в агрегате в концентрации от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных поверхностно-активных веществ, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит один или несколько ингибиторов протеаз, таких как, например, ЭДТК и/или бензамидинхлористоводородная кислота (HCl). Ингибитор протеазы может присутствовать индивидуально или в агрегате в концентрации от примерно 0,1 мг/мл до примерно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных ингибиторов протеазы, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему комбинирование биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Способы использования

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу таргетирования FR α и CD47, которые оба экспрессируются на поверхности раковых клеток, у субъекта, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, анти-CD47/анти-FR α биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции по изобретению. Связывание биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с FR α и/или CD47 может опосредовать комплементзависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимый фагоцитоз (ADPC) и/или антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или другие эффекты, которые приводит к гибели раковой клетки-мишени. Биспецифическое

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут, например, служить для привлечения конъюгированных лекарственных средств для опосредования гибели раковой клетки-мишени.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу блокирования связывания SIRP α с CD47 на раковых клетках, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту биспецифического анти-CD47/анти-FR α антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции по изобретению.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу индукции опосредованного макрофагами фагоцитоза раковых клеток, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту биспецифического анти-CD47/анти-FR α антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции по изобретению.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу связывания раковых клеток, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, с помощью гуманизированного биспецифического анти-CD47/анти-FR α антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с минимальным или неопределяемым связыванием с эритроцитами человека (RBC) у нуждающегося в этом субъекта, где способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту выделенного гуманизированного биспецифического анти-CD47/анти-FR α антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции по изобретению. Гуманизированное биспецифическое анти-CD47/анти-FR α антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению обладает высокой селективностью в отношении раковых клеток с минимальным или неопределяемым связыванием с эритроцитами человека (RBC).

Функциональную активность биспецифических антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают как FR α , так и CD47, можно охарактеризовать способами, известными в данной области техники и описанными в настоящем документе. Способы характеристики биспецифических антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают как FR α , так и CD47, включают, но не ограничены ими, анализы аффинности и специфичности, включая анализ Biacore, ELISA, FACS и OctetRed. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, способы характеристики биспецифических антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают как FR α , так и CD47, включают способы, описанные ниже.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту выделенного гуманизированного биспецифического анти-CD47/анти-FR α антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции по изобретению. Рак может представлять собой любой гемобластоз или солидный рак, например, он может быть выбран из, но не ограничен ими, рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной

карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество биспецифического анти-CD47/анти-FR α антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. Используемый в настоящем документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает желаемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели.

Используемое в настоящем документе, в отношении биспецифических анти-CD47/анти-FR α антител или их антигенсвязывающих фрагментов, терапевтически эффективное количество означает количество биспецифического анти-CD47/анти-FR α антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое модулирует иммунный ответ у субъекта, нуждающегося в этом. Также в настоящем описании, в отношении биспецифических анти-CD47/анти-FR α антител или их антигенсвязывающих фрагментов, терапевтически эффективное количество означает количество биспецифического анти-CD47/анти-FR α антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое приводит к лечению заболевания, нарушения или состояния; предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, нарушения или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, связанные с заболеванием, нарушением или состоянием.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой рак, предпочтительно, рак, выбранный из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления, заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой воспалительное заболевание, нарушение обмена веществ или любое другое заболевание, при котором в качестве терапии можно использовать

биспецифическое антитело.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, терапевтически эффективное количество относится к количеству терапии, достаточной для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) снижение или облегчение тяжести заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) уменьшение продолжительности заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iii) профилактика прогрессирования заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) регресс заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (v) профилактика развития или начала заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) профилактика рецидива заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшение госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) уменьшение продолжительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (ix) увеличение выживаемости субъекта с заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащим лечению, или связанным с ним симптомом; (xi) ингибирование или уменьшение заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического или терапевтического эффекта(ов) другой терапии.

Терапевтически эффективное количество или дозировка могут варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, способ введения, сайт-мишень, физиологическое состояние субъекта (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), независимо от того, является ли субъект человеком или животным, введение других лекарственных средств и того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Лечебные дозировки оптимально титруются для оптимизации безопасности и эффективности.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, композиции, описанные в настоящем документе, составлены таким образом, чтобы они подходили для предполагаемого пути введения субъекту. Например, композиции, описанные в настоящем документе, могут быть составлены таким образом, чтобы они подходили для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

Используемые в настоящем документе термины «лечить», «лечение» и «лечение» все предназначены для обозначения улучшения или изменения, по меньшей мере, одного измеримого физического параметра, связанного с раком, который не обязательно различим у субъекта, но может быть различим у субъекта. Термины «лечить», «лечение» и «лечение» могут также относиться к регрессии, профилактике прогрессирования или, по меньшей мере, замедлению прогрессирования заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, «лечить», «лечение» и «лечение» относятся к

облегчению, профилактике развития или возникновения, или сокращению продолжительности одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием, нарушением или состоянием, таким как опухоль или, более предпочтительно, рак. В конкретном варианте осуществления, «лечить», «лечение» и «лечение» относятся к профилактике рецидива заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, термины «лечить», «лечение» и «лечение» относятся к увеличению выживаемости субъекта, страдающего заболеванием, нарушением или состоянием. В конкретном варианте осуществления, термины «лечить», «лечение» и «лечение» относятся к устранению заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, предложена композиция, используемая для лечения рака. Для терапии рака, композицию можно использовать в сочетании с другим лечением, включая, но не ограничиваясь этим, химиотерапию, анти-TIM 3mAb, анти-LAG-3 mAb, анти-CD73 mAb, анти-апелин mAb, анти-CTLA-4 антитело, анти-EGFR mAb, анти-HER-2mAb, анти-CD19 mAb, анти-CD20 mAb, анти-CD33 mAb, анти-TIP-1 mAb, анти-DLL3 mAb, анти-CLDN18.2 mAb, анти-PD-L1 антитело, анти-PD-1 антитело, терапия PD-1/PD-L1, другие иммуноонкологические лекарственные средства, антиангиогенный агент, лучевая терапия, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), таргетная терапия или другие противораковые лекарственные средства.

Используемый в настоящем документе термин «в комбинации», в контексте введения двух или нескольких видов терапии субъекту, относится к применению более чем одного вида терапии. Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок, в котором субъекту вводят терапевтические средства. Например, первая терапия (например, композиция, описанная в настоящем документе) может быть введена до (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель до), одновременно или после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель после) введения второй терапии субъекту.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Изобретение также предлагает следующие неограничивающие варианты осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

- a. первую тяжелую цепь, H1;
- b. вторую тяжелую цепь, H2;
- c. первую легкую цепь, L1; и
- d. вторую легкую цепь, L2;

где H1 и L1 образуют первое плечо, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает первый антиген, предпочтительно, первый антиген, происходящий от человека, и

где H2 и L2 образуют второе плечо, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген, предпочтительно, второй антиген, происходящий от человека, где

(a) H1 содержит CH1 область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека; и

(b) L1 содержит CL область легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека;

где CH1 и CL области содержат аминокислотные замены или нативную аминокислоту в аминокислотном остатке, соответствующем положению аминокислоты SEQ ID NO: 15, 21, 22 или 23 для CH1 и SEQ ID NO: 19 или 24 для CL;

где аминокислотные замены или нативную аминокислоту в областях CH1 и CL выбраны из:

- (1) K133C и C220X в CH1 и F209C и C214X в CL;
- (2) S131C и C220X в CH1 и P119C и C214X в CL;
- (3) K133C и C220X в CH1 и K207C и C214X в CL;
- (4) F170C и C220X в CH1 и S176C и C214X в CL;
- (5) P171C и C220X в CH1 и S162C и C214X в CL;
- (6) V173C и C220X в CH1 и Q160C и C214X в CL;
- (7) F170C и C131X в CH1 и S176C и C214X в CL;
- (8) P171C и C131X в CH1 и S162C и C214X в CL;
- (9) V173C и C131X в CH1 и Q160C и C214X в CL;
- (10) A129C и C220X в CH1 и S121C и C214X в CL;
- (11) K133C и C220X в CH1 и I117C и C214X в CL;
- (12) C131 в CH1 и P119C и C214X в CL;
- (13) A129C и C131X в CH1 и S121C и C214X в CL;
- (14) R133C и C131X в CH1 и K207C и C214X в CL;
- (15) R133C и C131X в CH1 и I117C и C214X в CL;
- (16) R133C и C131X в CH1 и L117C и C214X в CL;
- (17) K133C и C220X в CH1 и L117C и C214X в CL;
- (18) R133C и C131X в CH1 и F209C и C214X в CL;
- (19) R133C и C131X в CH1 и V209C и C214X в CL; или
- (20) K133C и C220X в CH1 и V209C и C214X в CL;

где X выбран из S, A или G.

Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

- a. первую тяжелую цепь, H1;
- b. вторую тяжелую цепь, H2;
- c. первую легкую цепь, L1; и

d. вторую легкую цепь, L2;

где H1 и L1 образуют первое плечо, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает первый антиген, предпочтительно, первый антиген, происходящий от человека, и

где H2 и L2 образуют второе плечо, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген, предпочтительно, второй антиген, происходящий от человека, где

(a) H1 содержит CH1 область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека и вариабельную область тяжелой цепи (VH область); и

(b) L1 содержит CL область легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека и вариабельную область легкой цепи (VL область);

где CH1 область, VH область, CL область и VL область содержат аминокислотные замены в аминокислотном остатке, соответствующем положению аминокислоты SEQ ID NO: 15, 21, 22 или 23 для CH1; SEQ ID NO: 13 для VH; SEQ ID NO: 19 или 24 для CL; и SEQ ID NO: 17 для VL;

где аминокислотные замены в CH1 области, VL области, CL области и VL области выбраны из:

(1) C220X в CH1, G44C в VH, C214X в CL и G101C в VL; или

(2) C131X в CH1, G44C в VH, C214X в CL и G101C в VL;

где X выбран из S, A или G.

Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по вариантам осуществления 1 или 2, где первый антигенсвязывающий домен представляет собой домен связывания CD47.

Вариант осуществления 4 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 3, где VH область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CH1 область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, VL область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и CL область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Вариант осуществления 5 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-4, где

(a) второе плечо, включающее H2 и L2, не содержит аминокислотные замены первого плеча, включающего H1 и L1;

(b) каждая из двух тяжелых цепей H1 и H2 содержит VH область, CH1 область и Fc область (содержащую CH2 и CH3 области), где VL области имеют разные аминокислотные последовательности;

(c) каждая из двух тяжелых цепей H1 и H2 содержит VH область, CH1 область и Fc область (содержащую CH2 и CH3 области), где CH1 области имеют разные аминокислотные последовательности;

(d) каждая из двух тяжелых цепей H1 и H2 содержит VH область, CH1 область и Fc область (содержащую CH2 и CH3 области), где Fc области имеют разные аминокислотные последовательности;

(e) каждая из двух легких цепей L1 и L2 содержит VL область и CL область, где VL области имеют разные аминокислотные последовательности; и/или

(f) каждая из двух легких цепей L1 и L2 содержит VL область и CL область, где CL области имеют разные аминокислотные последовательности.

Вариант осуществления 6 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 5, где H1 и H2 образуют гетеродимер.

Вариант осуществления 7 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 1-6, где

(a) VH область H1 и VL область L1 имеют замещающую мутацию Q39E и Q38K, соответственно, и VH область H2 и VL область L2 имеют замещающую мутацию Q39K и Q38E, соответственно; или

(b) VH область H1 и VL область L1 имеют замещающую мутацию Q39K и Q38E, соответственно, и VH область H2 и VL область L2 имеют замещающую мутацию Q39E и Q38K, соответственно.

Вариант осуществления 8 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-7, где выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое анти-CD47/анти-FR α антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где первый антигенсвязывающий домен специфически связывает CD47, предпочтительно, CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен специфически связывает фолатный рецептор α (FR α), предпочтительно, FR α человека.

Вариант осуществления 9 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов 1-8, где

(a) первый антигенсвязывающий домен имеет последовательность VH SEQ ID: 13 и последовательность VL SEQ ID: 17, и второй антигенсвязывающий домен имеет последовательность VH SEQ ID: 33 и последовательность VL SEQ ID: 35; или

(b) первый антигенсвязывающий домен имеет последовательность VH SEQ ID: 13 и последовательность VL SEQ ID: 17, и второй антигенсвязывающий домен имеет последовательность VH SEQ ID: 14 и последовательность VL SEQ ID: 18.

Вариант осуществления 10 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по вариантам осуществления 8 или 9, где биспецифическое анти-CD47/анти-FR α антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны блокировать связывание сигнального регуляторного белка альфа (SIRP α) с CD47 на раковых клетках, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, индуцируя опосредованный макрофагами фагоцитоз раковых клеток, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, и/или связывание раковых клеток, которые экспрессируют как FR α , так и

CD47, с минимальным или неопределяемым связыванием с эритроцитами человека (RBC).

Вариант осуществления 11 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-10.

Вариант осуществления 12 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 11.

Вариант осуществления 13 представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор по варианту осуществления 12.

Вариант осуществления 14 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-10, и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 15 представляет собой способ таргетирования FR α и CD47, которые экспрессируются на поверхности раковых клеток, у нуждающегося в этом субъекта, блокирования связывания SIRP α с CD47 на раковых клетках, экспрессирующих как FR α , так и CD47, у нуждающегося в этом субъекта, индукции опосредованного макрофагами фагоцитоза раковых клеток, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, у субъекта, нуждающегося в этом, связывания раковых клеток, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, с минимальным или неопределяемым связыванием с эритроцитами человека (RBC) у субъекта, нуждающегося в этом, и/или лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей выделенное биспецифическое анти-CD47/анти-FR α антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 8-10 и фармацевтически приемлемый носитель, необязательно, где рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

Вариант осуществления 16 представляет собой способ получения биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-10, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающих продуцирование биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из вариантов осуществления 1-10, включающий комбинирование биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Конструирование биспецифических антител с измененными сайтами цистеина

На ФИГ. 1А и 1В показано биспецифическое антитело с двумя разными тяжелыми цепями и двумя разными легкими цепями в гетеродимере H1H2, которое может быть облегчено с помощью обычных подходов, таких как «выпуклость во впадине» и заряженные пары. Два нативных цистеина, которые образуют межцепочечную дисульфидную связь в плече H1L1, могут быть превращены в не цистеины, так что нативная межцепочечная дисульфидная связь устраняется (пунктирные линии на ФИГ. 1А и 1В); тем временем, два нативных не цистеиновых остатка в H1L1, близких друг к другу в трехмерной структуре, могут быть превращены в цистеины с образованием новой межцепочечной дисульфидной связи (сплошные линии на ФИГ. 1А и 1В). Новообразованная межцепочечная дисульфидная связь может быть между CH1 и CL H1L1 (ФИГ. 1А) или VH и VL H1L1 (ФИГ. 1В). Смещая сайты для межцепочечной дисульфидной связи в H1L1, две легкие цепи могут благоприятно спариваться с соответствующими им тяжелыми цепями, соответственно. Кроме того, асимметричная структура, образованная в результате смещения межцепочечной дисульфидной связи на плече mAb 1, может лучше дифференцировать физические свойства биспецифического антитела и потенциальных примесей, облегчая очистку и получение желаемого биспецифического антитела. Идентифицировано множество пар нативных не цистеиновых остатков (также называемых «сайтами нокина») в H1L1, которые могут образовывать новую межцепочечную дисульфидную связь. В приведенных ниже примерах показаны биспецифические антитела в последовательностях VH и CH1 тяжелой цепи IgG1 человека и VL и CL легкой цепи каппа. Эта концепция также может применяться для конструирования биспецифических антител с использованием CH1 тяжелой цепи IgG2, IgG3 или IgG4 человека и CL легкой цепи лямбда человека, когда существуют консервативные сайты нокина. Всякий раз, когда сайт нокина оказывается нативным цистеином (а не тем, который участвует в формировании нативной межцепочечной дисульфидной связи), его можно непосредственно использовать для образования новой межцепочечной дисульфидной связи.

Гуманизированное анти-CD47 mAb (описано в международной патентной публикации № WO 2019/217145; упоминается в настоящем документе как mAb 1) и два гуманизированных анти-FR α mAb (описаны в международной патентной публикации № WO 2019/177854; упоминаются как mAb 2 и mAb 2b, соответственно, в настоящем

документе) используют для конструирования биспецифических анти-CD47/анти-FR α антител. ФИГ. 1А и 1В иллюстрируют структуру желаемого биспецифического антитела с mAb 1 (анти-CD47) в качестве правого плеча и mAb 2 (анти-FR α) в качестве левого плеча (в некоторых биспецифических антителах mAb 2b, а не mAb 2 используется в качестве левого плеча). VL и VL области биспецифического антитела сливаются с константными областями тяжелой цепи (HC) и легкой каппа-цепи (LC) IgG1 человека, соответственно. mAb 1 HC имеет мутацию T366W (нумерация EU) для образования «выпуклости», и mAb 2 HC имеет мутации T366S, L368A и Y407V для образования «впадины», так что две тяжелые цепи благоприятствуют для образования биспецифического антитела с гетеродимерными HC (mAb 1 HC/mAb 2 HC), а не с гомодимерными HC (mAb 1 HC/mAb 1 HC или mAb 2 HC/mAb 2 HC). Кроме того, цистеиновую мутацию S354C вводят в mAb 1 HC, и цистеиновую мутацию Y349C вводят в mAb 2 HC для стабилизации гетеродимерного спаривания тяжелых цепей гетеродимера (Merchant et al. Nat. Biotechnol. 16(7):677-81 (1998)). Стратегию смещения межцепочечной дисульфидной связи между HC и LC на плече mAb 1 используют для благоприятствования экспрессии, очистки и/или продуцирования желаемого биспецифического антитела, когда две HC и две LC совместно трансфицируют в клетки. Для достижения этой цели, два нативных цистеина на HC и LC плечах mAb 1, соответственно, которые образуют межцепочечную дисульфидную связь, превращают в сериновые остатки, и два нативных не цистеиновых остатка на HC и LC плечах mAb 1, соответственно, идентифицируют с помощью структурного моделирования на предмет их непосредственной близости, так что как только цистеины введены в эти сайты (в настоящем документе именуемые «нокинированные цистеины» или «альтернативные цистеины»), цистеиновые остатки потенциально могут образовать новую межцепочечную дисульфидную связь. Вновь образованная межцепочечная дисульфидная связь за счет спаривания альтернативных цистеинов может находиться между областями CH1 и CL, как показано на ФИГ. 1А, или между областями VH и VL, как показано на ФИГ. 1В, где нативная межцепочечная дисульфидная связь между областями CH1 и CL плеча mAb 1 отмечена пунктирной линией, и вновь образованная нокинированными цистеинами межцепочечная дисульфидная связь на плече mAb 1 отмечена сплошной линией. Мутации не вводят в VL, VL, CH1 или CL области плеча mAb 2, и, следовательно, плечо mAb 2 имеет такую же нативную межцепочечную дисульфидную связь.

Последовательности VH, CH1, VL и CL mAb 1 и mAb 2, и последовательности IgG2 CH1, IgG3 CH1, IgG4 CH1 и лямбда CL перечислены на ФИГ. 2А-2F и в таблице 1 (SEQ ID NO: 13, 15, 17 и 19, соответственно, для mAb 1; и SEQ ID NO: 14, 16, 18 и 20, соответственно, для mAb 2; и SEQ ID NO: 21, 22, 23 и 24 соответственно для IgG2 CH1, IgG3 CH1, IgG4 CH1 и лямбда CL). Последовательности VH, CH1, VL и CL mAb 2b перечислены в таблице 1 (SEQ ID NO: 33, 34, 35 и 36, соответственно). Анти-CD47 антитело mAb 1 выбрано в качестве плеча с модифицированной межцепочечной дисульфидной связью. Модели гомологии с рядом ранее решенных структур антител в

общедоступном домене созданы в Schrodinger BioLuminate® (Schrodinger; New York, NY), и возможные межцепочечные дисульфидные мостики идентифицированы с помощью инструмента Cysteine Mutation с использованием порогового расстояния бета-углерода 7 Å. Идентифицированные пары дополнительно анализируют индивидуально и попарно с помощью инструмента Mutagenesis для идентификации мутаций не цистеина в цистеин, что приводит к наименьшему нарушению общей структуры, и одновременно приводит к снижению межцепочечной аффинности связывания для одиночных мутаций не цистеина в цистеин, при этом не оказывая значительного влияния на аффинность связывания спаренных цистеиновых мутаций. Лучшие кандидаты селективируют для экспрессии и экспериментальной валидации. Потенциальные дисульфидные связи, образованные нокином цистеиновых сайтов, отмечены сплошной линией, и нативные межцепочечные дисульфидные связи отмечены пунктирной линией, как показано на ФИГ. 3А-3L. Нативная межцепочечная дисульфидная область не включена в модели для bsAb 9, 10, 11 и 12, поэтому в моделях этих 4 bsAb нет пунктирной линии. Каждое из плеч mAb 1 с разными парами нокинированных цистеинов спаривают с одним нативным плечом mAb 2 с образованием биспецифического антитела (bsAb). Аминокислотные замены на плече mAb 1 биспецифического антитела mAb 1/mAb 2 для сдвинутой межцепочечной дисульфидной связи перечислены в таблице 2.

Чтобы оценить влияние различных пар сдвинутых межцепочечных дисульфидных связей, перечисленных в таблице 2, на стабильность mAb, некоторые из групп мутаций (или конструкций) в таблице 2 вводят в mAb 1 на обоих плечах. M1, M2, Z1 и Z2, которые представляют собой мутантные конструкции из патентной литературы (US 9,527,927 B2 и US 10,344,099 B2), также вводят в mAb 1 на обоих плечах для сравнения. Мутантные mAb экспрессируют и очищают с использованием хроматографии с белком А и хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC). Хроматографию с белком А проводят с использованием обычных способов. Для HIC, образцам, очищенным белком А, меняют буфер на PBS и добавляют $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до конечной концентрации 800 мМ. Образцы загружают в предварительно упакованную колонку Source 15 PHE (GE), предварительно уравновешенную 50 мМ MES pH 6,0 и 1 М буфером $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Образцы элюируют с использованием линейного или ступенчатого градиента (буфер А: 50 мМ MES pH 6,0, 1М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; буфер В: 50 мМ MES pH 6,0, 10% глицерина) с элюированием основной фракции при 60% буфера В. Элюированные фракции анализируют с помощью SDS-PAGE, и фракции, содержащие преимущественно полосу 145 кДа без примесей с более низкой молекулярной массой, объединяют в виде очищенного белка. На ФИГ. 4А-4Н показаны профили ОФ-ВЭЖХ очищенных мутантных mAb, содержащих различные сдвинутые межцепочечные дисульфидные связи в восстанавливающих или не восстанавливающих условиях; на ФИГ. 4I-4J показано связывание мутантных mAb, содержащих различные сдвинутые межцепочечные дисульфидные связи, с CD47 в анализе ELISA.

Очищенные мутантные mAb анализируют на их термостабильность. Мутантным mAb заменяют буфер на DPBS (Corning, кат: 21-031-CM) в концентрации 1 мг/мл и

инкубируют при 55°C, 60°C, 65°C, 70°C или 75°C в течение 5 минут на Thermo Cycler (Simpliamp, Thermo Fisher). После инкубации, mAb анализируют с помощью SEC (эксклюзионной хроматографии). Каждый пик количественно определяют для определения доли содержания антитела (среднемолекулярные виды). Результаты показаны на ФИГ. 5A-5G. Мутантные mAb, содержащие мутации bsAb 10 и bsAb 12, соответственно, являются более термостабильными, чем любые другие мутантные mAb, включая те, которые содержат мутации M1, M2, Z1 и Z2, соответственно. Эти неожиданные результаты показывают, что конструкции bsAb 10 и bsAb 12 превосходят любые конструкции M1, M2, Z1 или Z2. Термостабильность антитела является важным свойством, которое требуется в процессе производства и хранения. Хорошая термостабильность значительно улучшает возможности конструирования антител и повышает их шансы стать терапевтическим средством.

Мутантные mAb также тестируют на их pH стабильность или восстановление после инкубации при низком pH. mAb в концентрации 10 мг/мл меняют буфер на буфер (pH 3,0), содержащий 0,1 М лимонной кислоты и 0,1 М хлорида натрия, с использованием колонок Zeba™ Spin Desalting Columns (Thermo Fisher, кат.: 89882). mAb разводят в том же буфере до концентрации 2 мг/мл и инкубируют в течение 1 часа, 3 часов, 5 часов или 7 часов при комнатной температуре, и затем нейтрализуют добавлением 1,0 М трис-HCl (pH 9,0) для доведения образцов до конечного pH 6,0-7,0. После нейтрализации, mAb разводят в DPBS до концентрации 1 мг/мл для SEC анализа. Результаты показаны на ФИГ. 6A-6H. Мутант mAb, содержащий конструкцию bsAb 12, был более pH стабильным, чем любой из мутантов mAb, содержащих мутации M1, M2, Z1 или Z2; он также является лучшим, по сравнению с остальными протестированными мутантами mAb, по pH стабильности (ФИГ. 6A-6H). Восстановление после исследования стабильности pH мутанта mAb, содержащего дизайн bsAb 10, было лучше, чем у любого из мутантов mAb, содержащих мутации M1, M2, Z1 или Z2. Данные показывают, что конструкции bsAb 12 и bsAb 10 превосходят любые конструкции M1, M2, Z1 или Z2 в отношении pH стабильности или восстановления после инкубации с низким pH. Кроме того, pH стабильность мутантов mAb, содержащих конструкцию bsAb 5, была лучше, чем у любого из мутантов mAb, содержащих конструкцию M1, M2, Z1 или Z2, при инкубации при pH 3,0 в течение 1 или 3 часов. Эти неожиданные результаты показывают, что конструкции bsAb 5, 10 и 12 превосходят любые конструкции M1, M2, Z1 или Z2. pH стабильность или восстановление после инкубации антитела при низком pH является важным свойством, которое требуется в процессе производства. Хорошая pH стабильность или восстановление после инкубации с низким pH, особенно в течение 3-часового периода в условиях низкого pH, значительно улучшают возможности развития антитела и увеличивают его шансы стать терапией.

Таблица 1: Последовательности различных областей mAb 1; mAb 2; тяжелой цепи (HC) IgG2, IgG3 и IgG4 человека; и CL ламбда человека

Имя	Последовательность	SEQ ID NO:
-----	--------------------	------------

VH для mAb 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMH WVRQAPGQGLEWIGNIDPSDSETHYAQKFQGRVTLT VDKSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCAGTDLAYWGQ GTLVTVSS	13
VH для mAb 2	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSDFGMHWI RQAPGKGLEWVAYMSYTPGTFHYADTVKDRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDNAVYYCARVHVGTVDY WGQGTLLVTVSS	14
CH1 для mAb 1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	15
CH1 для mAb 2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	16
BH для mAb 1	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCHASQNINWLSWYQ QKPGQAPRLLIYKASNLHTGIPDRFSGSGSGTDFTLT SRLEPEDFAVYYCQQGQSYPTFGQGTKVEIK	17
BH для mAb 2	EVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNINNNLHWYQ QKPGQAPRLLIYKASQSIGIPARFSGSGSGTDFTLT SLEPEDFAVYFCQQSNSWPALTFGQGTKVEIK	18
CL для mAb 1	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	19
CL для mAb 2	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	20
IgG2 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCC	21
IgG3 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLG	22
IgG4 CH1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS	23

	LGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG	
лямбда CL	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC	24
VH для mAb 2b	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSSSWMN WVRQAPGQGLEWIGRIYPGDGYTHYNGMFKGRASL TADKSTSTGYMELSSLRSEDVAVFFCTRHGDFPYWYF DVWGRGTLVTVSS	33
CH1 для mAb 2b	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	34
BH для mAb 2b	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASENIDSYLAWYQ QKPGRAPKLLVYAATNLAVGVPSRFSGSGSGTEYTLTI SSLQPDDFATYYCQHHYSTPPTFGQGTKLEIK	35
CL для mAb 2b	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	36

Таблица 2: Аминокислотные замены на плече mAb 1 биспецифического антитела mAb 1/mAb 2 (bsAb) для сдвинутой межцепочечной дисульфидной связи

	VH	CH1	VL	CL
bsAb 1	G44C	C220S	G101C	C214S
bsAb 2	H58C	C220S	Y94C	C214S
bsAb 3	A60C	C220S	P95C	C214S
bsAb 4	W103C	C220S	P44C	C214S
bsAb 5		S131C; C220S		P119C; C214S
bsAb 6		F170C; C220S		S176C; C214S
bsAb 7		P171C; C220S		S162C; C214S
bsAb 8		V173C; C220S		Q160C; C214S
bsAb 9		A129C; C220S		S121C; C214S
bsAb 10		K133C; C220S		K207C; C214S
bsAb 11		K133C; C220S		I117C; C214S
bsAb 12		K133C; C220S		F209C; C214S
M1		F126C; C220S		S121C; C214S
M2		A141C; C220S		F116C; C214S

Z1		F126C; C220S		Q124C; C214S
Z2		F170C; C220S		S162C; C214S

Примечание. Нумерацию Kabat используют для VH и VL областей; Нумерацию EU используют для CH1 и CL областей.

Биспецифические антитела в примерах находятся на каркасе HC и каппа LC IgG1 (нумерация Kabat для VH и VL областей; нумерация EU для CH1 и CL областей). Некоторые биспецифические антитела сконструированы с использованием bsAb 1, bsAb 2, bsAb 3, bsAb 4, bsAb 5, bsAb 6, bsAb 7 и bsAb 8 (bsAb 1 относится к биспецифическим антителам с mAb 1 плечом, содержащим соответствующие мутации в таблице 2, которые, как ожидается, приведут к перемещению (или «смещению») межцепочечной дисульфидной связи HC/LC, и с mAb 2 в качестве второго плеча; другие биспецифические антитела в этой группе следуют тому же правилу именования). Мутации в VL, CH1, VL или CL области плеча mAb 2 не вводят. Мутация G44C относится к превращению нативного глицина на остатке 44 (G44) в цистеин; все остальные мутации используют то же правило именования. Другие биспецифические антитела сконструированы с использованием mAb 1 и mAb 2b, включая bsAb 5b, bsAb 10 и bsAb 12 (bsAb 5b относится к биспецифическим антителам с плечом mAb 1, содержащим соответствующие мутации bsAb 5 в таблице 2, и с mAb 2b в качестве второго плеча; bsAb 10 относится к биспецифическому антителу с плечом mAb 1, содержащим соответствующие мутации bsAb 10 в таблице 2, и с mAb 2b в качестве второго плеча; bsAb 12 относится к биспецифическому антителу с плечом mAb 1, содержащим соответствующие мутации bsAb 12 в таблице 2 и с mAb 2b в качестве второго плеча). Последовательности CH1, CL, VH и VL областей плеча mAb 1 биспецифических антител перечислены в таблице 3. Кроме того, заряженные пары аминокислот вводят в положении Q39 (нумерация Kabat) на HC и Q38 (нумерация Kabat) на LC каждого плеча данного биспецифического антитела. Эти биспецифические антитела называют следующим образом: bsAb 5b (E/K) относится к биспецифическим антителам с Q39E (Q изменен на E; то же правило именования применяется к другим мутациям ниже) на HC и Q38K на LC плеча mAb 1, и Q39K на HC и Q38E на LC плеча mAb 2b bsAb 5b; bsAb 10 (E/K) и bsAb 12 (E/K) следуют тому же правилу именования. Кроме того, bsAb 5b (K/E) относится к биспецифическому антителу с Q39K на HC и Q38E на LC плеча mAb 1, и Q39E на HC и Q38K на LC плеча mAb 2b bsAb 5b; bsAb 10 (K/E) и bsAb 12 (K/E) следуют тому же правилу именования. mAb 1 HC имеет мутацию T366W (нумерация EU) для образования «выпуклости», и mAb 2 или mAb 2b HC имеет мутации T366S, L368A и Y407V для образования «впадины». Кроме того, цистеиновая мутация S354C введена в mAb 1 HC, и цистеиновая мутация Y349C введена в mAb 2 или mAb 2b HC для стабилизации гетеродимерного спаривания.

Таблица 3: Последовательности областей CH1, CL, VH и VL плеча mAb 1 биспецифических антител

Имя клона	Последовательность	SEQ ID
-----------	--------------------	--------

		NO:
bsAb 1 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWV RQAPGQ <u>C</u> LEWIGNIDPSDSETHYAQKFQGRVTLTVDKST STVYMESSLRSED ¹ AVYYCAGTDLAYWGQGT ² LVTVSS	1
bsAb 1 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPK <u>S</u>	2
bsAb 1 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCHASQNINVWLSWYQQKP GQAPRLLIYKASNLHTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQGQSYPTFGQ <u>C</u> TKVEIK	3
bsAb 1 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE <u>S</u>	4
bsAb 5 or 5b CH1	ASTKGPSVFPLAP <u>C</u> SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPK <u>S</u>	5
bsAb 5 or 5b CL	RTVAAPSVFIF <u>C</u> PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE <u>S</u>	6
bsAb 6 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHT <u>C</u> PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPK <u>S</u>	7
bsAb 6 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSL <u>C</u> STLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE <u>S</u>	8
bsAb 7 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTF <u>C</u> AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPK <u>S</u>	9
bsAb 7 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQE <u>C</u> VTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE <u>S</u>	10
bsAb 8 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPA <u>C</u> LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPK <u>S</u>	11

bsAb 8 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNS <u>C</u> ESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN <u>RGE</u> <u>S</u>	12
bsAb 9 CH1	ASTKGPSVFPL <u>C</u> PSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDDKKVEPK <u>S</u> <u>S</u>	25
bsAb 9 CL	RTVAAPSVFIFPP <u>C</u> DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN <u>RGE</u> <u>S</u>	26
bsAb 10 CH1	ASTKGPSVFPLAPSS <u>C</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDDKKVEPK <u>S</u> <u>S</u>	27
bsAb 10 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVT <u>C</u> SFN <u>RGE</u> <u>S</u>	28
bsAb 11 CH1	ASTKGPSVFPLAPSS <u>C</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDDKKVEPK <u>S</u> <u>S</u>	29
bsAb 11 CL	RTVAAPSVF <u>C</u> FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN <u>RGE</u> <u>S</u>	30
bsAb 12 CH1	ASTKGPSVFPLAPSS <u>C</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDDKKVEPK <u>S</u> <u>S</u>	31
bsAb 12 CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS <u>C</u> N <u>RGE</u> <u>S</u>	32

Примечание. Остатки, полученные в результате аминокислотных замены, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Пример 2: Характеризация биспецифических антител

Одновременная экспрессия двух тяжелых цепей и двух легких цепей в одной и той же клетке приводит к экспрессии и сборке желаемого биспецифического антитела, которое содержит анти-CD47 плечо и анти-FR α плечо. Биспецифические антитела очищают с помощью хроматографии с белком А. Некоторые образцы дополнительно очищают с использованием гидрофобной хроматографии (HIC).

Биспецифические антитела, очищенные белком А, анализируют с помощью SDS-

PAGE. Образцы белка разводят до концентрации 1 мг/мл. Для не восстанавливающих дорожек, 3 мкл белка добавляют к 4,5 мкл воды и 2,5 мкл буфера для образцов 4x LDS (Thermo NP0007; Waltham, MA) и загружают непосредственно на гель. Для уменьшения полос, 3 мкл белка добавляют к 3,5 мкл воды, 2,5 мкл буфера для образцов 4x LDS и 1 мкл 1М DTT, нагревают при 95° в течение 3 мин и наносят на гель. Для всех образцов используют 4-12% бис-трис гели Bolt (Thermo NP0323BOX). Образцы подвергают электрофорезу в течение 30 мин при 180 В и визуализируют с помощью Coomassie G-250. На ФИГ. 7А-7В показаны изображения SDS-PAGE образцов биспецифического антитела mAb 1/mAb 2, очищенного с использованием хроматографии с белком А. В восстанавливающих и денатурирующих условиях, все образцы демонстрируют две полосы, одна из которых соответствует тяжелым цепям (около 50 кДа), и другая соответствует легким цепям (около 25 кДа). В не восстанавливающих и денатурирующих условиях, все образцы демонстрируют несколько полос, из которых верхняя полоса на каждой дорожке представляет собой интактное антитело или смесь интактных антител (около 150 кДа), хотя неясно, является ли это смесью гетеродимерных биспецифических антител (способствующих взаимодействию H1H2) и гомодимерных антител. Меньшие полосы представляют собой различные не интактные антитела на SDS-PAGE - например, вторая полоса (около 125 кДа) сверху на каждой дорожке, вероятно, представляет собой антитело, лишенное одной легкой цепи; оно может происходить от интактного антитела, в котором одна легкая цепь не образует межцепочечную дисульфидную связь, так что при SDS-PAGE легкая цепь отделяется от основного антитела. На ФИГ. 7С-7D показаны изображения SDS-PAGE образцов биспецифического антитела mAb 1/mAb 2b, очищенных с использованием хроматографии с белком А. В не восстанавливающих и денатурирующих условиях, все образцы демонстрируют одну основную полосу, соответствующую молекулярным массам биспецифических антител (ФИГ. 7С); в восстанавливающих и денатурирующих условиях все образцы демонстрируют две полосы, соответствующие молекулярным массам двух разных тяжелых цепей, и одну полосу, соответствующую молекулярным массам двух разных легких цепей (ФИГ. 7D).

Для оценки активности связывания биспецифических образцов в мостиковом анализе ELISA, рекомбинантный рецептор фолиевой кислоты 1 (Novoprotein C784; Summit, NJ) разводят до концентрации 0,25 мкг/мл в PBS и используют для покрытия 96-луночного планшета (Genesee Scientific 91-415F; San Diego, CA). Добавляют по 50 мкл антигена на лунку и покрывают в течение ночи при 4°. Планшеты блокируют 5% BSA в TBST и промывают TBST. Добавляют 50 мкл антител в 5% BSA в TBST в указанных концентрациях, инкубируют при комнатной температуре и промывают TBST. В каждую лунку добавляют вторичный рекомбинантный биотинилированный антиген CD47 (AcroBio CD47-H82E9-258g; Newark, DE), разведенный до концентрации 0,05 мкг/мл в 5% BSA в TBST, инкубируют при комнатной температуре и промывают TBST. В каждую лунку добавляют стрептавидин HRP (JIR 016-030-084), разведенный до концентрации 0,2 или 0,5 мкг/мл в 5% BSA в TBST, инкубируют при комнатной температуре и промывают.

Планшеты проявляют субстратом TMB (Thermo 34028) и гасят стоп-раствором (Thermo SS04), и лунки количественно оценивают по поглощению при 450 нм. На ФИГ. 8А-8J показаны результаты связывания очищенных биспецифических антител с обоими антигенами в мостиковом анализе ELISA. Данные на ФИГ. 8А показывают, что bsAb 1, 5, 6, 7 и 8 обладают анти-CD47/FR α биспецифической активностью, что подтверждает образование предполагаемого биспецифического анти-CD47/FR α антитела каждой из этих конструкций. Все биспецифические антитела, протестированные на ФИГ. 8В-8J проявляют мостиковую активность ELISA.

Для определения чистоты образцов, очищенных хроматографией на белке А или хроматографией на белке А с последующей НИС, используют эксклюзионную хроматографию (SEC). Образцы белка разводят до концентрации 1 мг/мл и подвергают субмикронной фильтрации. 5 мкл белка вводят в колонку AdvanceBio SEC (300 мм, 2,7 мкм, 300 Å, Agilent PL1580-5301). В качестве подвижной фазы используют DPBS со скоростью 0,35 мл/мин. В качестве стандарта используют стандарты гель-фильтрации Bio-rad (Bio-rad 1511901; Hercules, CA). Образцы количественно оценивают путем измерения поглощения при 280 нм. На ФИГ. 9А-9Е показаны профили SEC образцов, очищенных хроматографией с белком А. Появление основного пика около 150 кДа свидетельствует о том, что основными частицами в образцах являются полные антитела (или антитело) с двумя тяжелыми цепями и двумя легкими цепями. Эти данные согласуются с наблюдениями с помощью SDS-PAGE, показанными на ФИГ. 7А-7В. На ФИГ. 9F-9N показаны профили SEC образцов, очищенных хроматографией на белке А с последующей НИС.

Чистоту образцов биспецифического антитела, очищенных НИС, дополнительно анализируют с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ) в не восстанавливающих условиях. На ФИГ. 10А-10L показаны профили ОФ-ВЭЖХ биспецифических антител. В каждом случае имеется один основной вид. ОФ-ВЭЖХ также проводят в восстанавливающих условиях для определения наличия как обоих НС (Н1 и Н2), так и обоих LC (L1 и L2) предполагаемого биспецифического антитела. Образцы контрольных антител получают путем кратковременной экспрессии Н1, Н2 и L1 bsAb 7 (контрольное антитело № 1) и Н1, Н2 и L2 bsAb 7 (контрольное антитело № 2) соответственно с последующей очисткой с использованием хроматографии с белком А. Эти образцы служат в качестве контролей для идентификации пиков ЖХ на ОФ-ВЭЖХ (ФИГ. 11А и 11В). В сочетании с профилями ОФ-ВЭЖХ bsAb 6 (ФИГ. 11С), bsAb 7 (ФИГ. 11D) и bsAb 8 (ФИГ. 11Е), идентифицируют пики НС (Н1 и Н2) и пики LC (L1 и L2) (ФИГ. 11А-11Е). На ФИГ. 11F-11N показаны профили ОФ-ВЭЖХ в восстанавливающих условиях биспецифических антител, сконструированных с mAb 1 и mAb 2b. Соответствующие контрольные трансфекции с одним из двух плеч используют для идентификации различных пиков НС и LC для данного биспецифического антитела (данные в настоящем документе не показаны). Площадь под кривой (AUC) каждого НС или LC относительно общей AUC в профилях

ОФ-ВЭЖХ количественно определяют и показывают на ФИГ. 11С-11Н. Соотношения Н1, L1, Н2 и L2 соответствуют таковым для гетеродимерного биспецифического антитела. Эти данные показывают, что основными видами в очищенных НИС биспецифических образцах являются гетеродимерные биспецифические антитела с желаемой композицией НС (Н1 и Н2) и LC (L1 и L2). Важно отметить, что данные на ФИГ. 10А-10L и ФИГ. 11А-11Н предполагают наличие межцепочечных дисульфидных связей между НС и между НС и LC на каждом из двух плеч биспецифических антител.

Те же образцы биспецифических антител, очищенные НИС, анализируют на их способность связывать оба антигена с помощью мостикового ELISA. В соответствии с приведенными выше аналитическими данными, показано, что все биспецифические антитела способны одновременно связываться как с CD47, так и с FR α , что свидетельствует о том, что каждое плечо биспецифических антител правильно сформировано с правильными НС и LC (ФИГ. 12А-12F). Биспецифические антитела тестируют на их способность связываться с клетками SK-OV-3, экспрессирующими оба антигена (CD47 и FR α). В анализе, клетки SK-OV-3 инкубируют с биспецифическими антителами в различных концентрациях в течение 15 минут при 4°C. Затем клетки центрифугируют в течение 5 минут и трижды промывают FACS буфером (HBSS с добавлением 5% BSA и 0,05% азида натрия). Затем клетки инкубируют с конъюгированным с Alexa Fluor 488 вторичным антителом против IgG человека (ThermoFisher, кат. №: H10120) и инкубируют на льду в течение еще 15 минут. Затем клетки дважды промывают буфером FACS и ресуспендируют в буфере FACS. Затем клетки пропускают через Attune NxT, и данные анализируют с помощью программного обеспечения Attune NxT. Биспецифические антитела показывают значительное связывание с клетками SK-OV-3 в анализе FACS (ФИГ. 13А-13С).

Образцы биспецифических антител, очищенные НИС, подвергают папаиновому перевару в не восстанавливающих условиях, чтобы определить, образуются ли ожидаемые Fab фрагменты из биспецифических антител. Образцы концентрируют до конечной концентрации 5-10 мг/мл, и буфер заменяют на буфер для папаинового перевара (20 mM цистеин, 20 mM фосфат натрия, 10 mM ЭДТК, pH 7,0). Имобилизованный в агарозе папаин (Thermo 20341) предварительно уравнивают в буфере для папаинового перевара и ресуспендируют в виде 50% суспензии. Образцы белка добавляют к суспензии в объемном соотношении 2:1 и встряхивают в течение ночи при комнатной температуре. Супернатант экстрагируют и анализируют непосредственно с помощью масс-спектрометрии. Рассчитанная молекулярная масса (mw) каждого Fab фрагмента показана вместе с его наблюдаемой mw (ФИГ. 14А-14С). Данные показывают, что ожидаемые Fab фрагменты, полученные при папаиновом переваре, обнаружены с помощью масс-спектрометрии, и предполагаемые биспецифические антитела образованы должным образом.

Образцы очищенных НИС биспецифических антител также подвергают трипсиновому перевару в не восстанавливающих условиях, чтобы определить, образуются

ли рассчитанные пептидные фрагменты гидролиза трипсином из плеч mAb 1 предполагаемых биспецифических антител. Образцы разводят до конечной концентрации 1 мг/мл в 200 мМ гуанидина HCl и нагревают при 95°C в течение 1 минуты. Добавляют 2х буфер для трипсинового перевара в объемном соотношении 1:1 (NEB P8101S) и добавляют 2 мкг общего трипсина ультра (NEB P8101S). Полученную реакцию встряхивают при 37°C в течение 4 часов и используют непосредственно для анализа методом масс-спектрометрии. Аминокислотные последовательности и сайты для дисульфидной связи дисульфидного перекрестно-сшитого пептидного фрагмента, который, как ожидается, будет получен в результате трипсинового перевара плеча mAb 1 (анти-CD47 плечо) bsAb 6, показаны на ФИГ. 15А. Цистеиновые остатки, образующие дисульфидные связи, выделены жирным шрифтом; также указана ожидаемая межцепочечная дисульфидная связь, образованная нокинами цистеинов (ФИГ. 15А). Подобные иллюстрации также показаны для bsAb 7 (ФИГ. 15В), bsAb 8 (ФИГ. 15С), bsAb 5b (ФИГ. 15D), bsAb 10 (ФИГ. 15Е) и bsAb 12 (ФИГ. 15F), соответственно. Результаты МС на ФИГ. 15А-15F показывают, что ожидаемый дисульфидный перекрестно-сшитый пептидный фрагмент из переваренного трипсином mAb 1 плеча каждого из биспецифических антител (bsAb 6, bsAb 7, bsAb 8, bsAb 5b, bsAb 10 и bsAb 12) можно идентифицировать на МС. Эти данные дополнительно демонстрируют, что нокины цистеинов обеспечивают правильное образование межцепочечной дисульфидной связи в каждом из биспецифических антител bsAb 6, bsAb 7, bsAb 8, bsAb 5b, bsAb 10 и bsAb 12 (ФИГ. 15А-15F).

Образцы биспецифических антител, очищенные НИС, также подвергают протеазному перевару IdeZ в не восстанавливающих условиях, чтобы определить, были ли получены рассчитанные части (Fab')₂ из предполагаемых биспецифических антител. Образцы разводят до конечной концентрации 0,5 мг/мл в 1х гликобуфере 2 (NEB). Добавляют протеазу IdeZ в соотношении 80 ед. протеазы на 12,5 мкг антитела. Полученную смесь инкубируют при 37°C в течение 4 часов и используют непосредственно для анализа методом масс-спектрометрии. На ФИГ. 16А-16С показаны профили МС переваренных протеазой IdeZ образцов биспецифических антител, очищенных с помощью НИС. Идентифицирован (Fab')₂, полученный из каждого из биспецифических антител, что указывает на то, что предполагаемые биспецифические антитела образованы с надлежащим образом сформированными межцепочечными дисульфидными связями за счет нокинирования цистеинов.

Чтобы продемонстрировать вклад обоих плеч биспецифических антител в связывание с клетками SK-OV-3, которые, как известно, экспрессируют оба антигена, ингибирование связывания антитела с клетками посредством F(ab')₂, созданного из исходного анти-CD47 или анти-FRα mAb, оценивают в анализе FACS. Концентрации Ab (антитела), использованные в анализе, указаны под каждым графиком на ФИГ. 17А-17С. Ингибирующий эффект тестируют с 5000 нМ F(ab')₂ (ФИГ. 17А-17С). Кроме того, последовательное связывание CD47 и FRα с иммобилизованным bsAb 12 определяют с

помощью Biacore (ФИГ. 18А-18В).

Очищенные белком А биспецифические антитела переваривают папаином, и Fab-фрагменты, полученные в результате перевара, идентифицируют с помощью МС (ФИГ. 19А-19С). В образце биспецифического антитела дикого типа обнаружены Fab фрагменты как из правильно спаренных плеч, так и из двух ошибочно спаренных плеч (H1/L2 и H2/L1) (ФИГ. 19А). Однако в образцах bsAb 10 (ФИГ. 19В) и bsAb 12 (ФИГ. 19С) обнаружено только одно из двух ошибочно спаренных плеч. В то же время, в конструкциях bsAb 10 и bsAb 12 нет ошибочно спаренных HC/LC частиц, которые не образуют межцепочечную дисульфидную связь HC/LC, поскольку в этих конструкциях не обнаружена полоса LC при не восстанавливающем SDS-PAGE (ФИГ. 7С). Таким образом, эти данные указывают на то, что конструкции bsAb 10 и bsAb 12 устраняют образование ошибочно спаренных видов H2/L1; кроме того, отсутствие спаривания H2L1 также подтверждает вывод о том, что рандомизированные виды H1L2/H2L1 не образуются. По сравнению с другими конструкциями биспецифических антител, использующими стратегию сдвига межцепочечной дисульфидной связи HC/LC, которые были описаны в литературе, конструкции bsAb 10 и bsAb 12 превосходят их тем, что они предотвращают образование одного ошибочно спаренного вида и рандомизированных видов. Когда очищенное белком А bsAb 12 дополнительно очищают с помощью ИС, ошибочно спаренные H1/L2 Fab исчезают на профиле МС (ФИГ. 20). Процесс очистки bsAb 12 оптимизирован и показан в таблице 4. Выход составляет 77 мг из 500 мл культуры временно трансфицированных клеток ExpiCHO, которые находятся в аналогичном диапазоне для mAb в той же системе временной трансфекции.

Таблица 4: Оптимизация процесса очистки bsAb 12

Стадии	Процедура
1	Экспрессия в клетках CHO: Две временно трансфицированные культуры ExpiCHO по 250 мл. Культивируют в течение 10 дней с одной подкормкой.
2	Очистка белка А: 20 мл MabSelect Prisma в HiScale 16/40. Связывают со скоростью 15 мл/мин, промывают со скоростью 15 мл/мин 200 мл PBS и элюируют со скоростью 5 мл/мин 50 mM NaCl в 50 mM цитрате (pH 3,7).
3	Вирусная инаktivация: Выдерживают в элюирующем буфере в течение 1 часа.
4	Нейтрализация: Медленно добавляют 1 М тринатрия цитрата (pH 6,5) до pH 6,0.
5	Проточная АЕХ: Puros GoPure XQ 5 мл, скорость потока 1,5 мл/мин. Промывают 25 mM цитрата (pH 6,0). Собирают все проточные и промывочные фракции.

6	НЭС связывание и элюирование: 50 мл бутиловой смолы HP (Cytiva 17543202) в HiScale 16/40. Буфер А: 1 М (NH₄)₂SO₄, 50 мМ Трис (pH 7,5). Буфер В: 50 мМ Трис (pH 7,5). Ступенчато промывают со скоростью 3 мл/мин 450 мл 36% буфера В. Элюируют линейным градиентом 43%-50% буфера В на 100 мл. Собирают все элюированные фракции. Конечный выход составляет 77 мг. Чистота составляет 98% как по данным НЭС, так и по данным эксклюзионной ВЭЖХ.
---	--

Таблица 5: Аминокислотные остатки в областях CH1 и CL для образования заряженных пар

Имя	CH1	CL
bsAb 5 CP	S131	P119
bsAb 9 CP	A129	S121
bsAb 10 CP	K133	K207
bsAb 11 CP	K133	I117
bsAb 12 CP	K133	F209
CP9	G166	S114
CP10	T187	D170

Примечание. Нумерация ЕС используется для CH1 и CL областей. CP, заряженная пара.

Чтобы еще больше облегчить спаривание HC и LC на каждом плече данного биспецифического антитела и/или повысить осуществимость очистки с использованием обычного производственного процесса, аминокислотные мутации вводят в пару остатков в CH1 и CL областях, соответственно, для образования заряженной пары. Каждая заряженная пара или любая комбинация более чем одной заряженной пары может быть использована для конструирования биспецифических антител, поскольку они увеличивают правильное спаривание HC и LC и/или облегчают очистку за счет придания различных физических свойств по сравнению с примесями (т.е. ошибочно спаренными молекулярными видами). Любая заряженная пара или любая комбинация заряженных пар в таблице 5 может быть объединена с другими заряженными парами (известными в литературе или недавно разработанными) для достижения и/или улучшения правильного спаривания HC/LC и/или облегчения очистки путем введения различных физических свойства по сравнению с примесями (т. е. ошибочно спаренными молекулярными видами). Один из двух остатков для образования заряженных пар может быть заменен глутаматом (E), и другой может быть замещен лизином (K), или наоборот. Например, для данного биспецифического антитела, состоящего из H1L1 и H2L2, если «E» вводится в H1, и «K» вводится в L1, то «K» вводится в H2, и «E» вводится в L2. Два остатка для образования заряженных пар могут быть заменены кислыми и основными

аминокислотами, соответственно, отличными от «Е» и «К». Например, остаток, в который вводится «Е», также может быть заменен аспаратом (D), если «Е» не используется. Всякий раз, когда нативная аминокислота в данном остатке оказывается предполагаемой замещающей аминокислотой (т. е. Е, D или К), мутация не требуется. Аминокислотные остатки в областях СН1 и CL для образования заряженных пар перечислены в таблице 5. Каждая пара этих остатков выбирается с помощью трехмерного моделирования на основе множества факторов, включая близость.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что в описанные выше варианты осуществления, могут быть внесены изменения без отклонения от их широкой изобретательской концепции. Таким образом, следует понимать, что это изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но предназначено для охвата модификаций в пределах сущности и объема настоящего изобретения, как определено настоящим описанием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

- a. первую тяжелую цепь, H1;
- b. вторую тяжелую цепь, H2;
- c. первую легкую цепь, L1; и
- d. вторую легкую цепь, L2;

где H1 и L1 образуют первое плечо, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает первый антиген, предпочтительно, первый антиген, происходящий от человека, и

где H2 и L2 образуют второе плечо, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген, предпочтительно, второй антиген, происходящий от человека, где

(a) H1 содержит CH1 область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека; и

(b) L1 содержит CL область легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека;

где CH1 и CL области содержат аминокислотные замены или нативную аминокислоту в аминокислотном остатке, соответствующем положению аминокислоты SEQ ID NO: 15, 21, 22 или 23 для CH1 и SEQ ID NO: 19 или 24 для CL;

где аминокислотные замены или нативную аминокислоту в областях CH1 и CL выбраны из:

- (1) K133C и C220X в CH1 и F209C и C214X в CL;
- (2) S131C и C220X в CH1 и P119C и C214X в CL;
- (3) K133C и C220X в CH1 и K207C и C214X в CL;
- (4) F170C и C220X в CH1 и S176C и C214X в CL;
- (5) P171C и C220X в CH1 и S162C и C214X в CL;
- (6) V173C и C220X в CH1 и Q160C и C214X в CL;
- (7) F170C и C131X в CH1 и S176C и C214X в CL;
- (8) P171C и C131X в CH1 и S162C и C214X в CL;
- (9) V173C и C131X в CH1 и Q160C и C214X в CL;
- (10) A129C и C220X в CH1 и S121C и C214X в CL;
- (11) K133C и C220X в CH1 и I117C и C214X в CL;
- (12) C131 в CH1 и P119C и C214X в CL;
- (13) A129C и C131X в CH1 и S121C и C214X в CL;
- (14) R133C и C131X в CH1 и K207C и C214X в CL;
- (15) R133C и C131X в CH1 и I117C и C214X в CL;
- (16) R133C и C131X в CH1 и L117C и C214X в CL;
- (17) K133C и C220X в CH1 и L117C и C214X в CL;
- (18) R133C и C131X в CH1 и F209C и C214X в CL;
- (19) R133C и C131X в CH1 и V209C и C214X в CL; или

(20) K133C и C220X в CH1 и V209C и C214X в CL;

где X выбран из S, A или G.

2. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

- a. первую тяжелую цепь, H1;
- b. вторую тяжелую цепь, H2;
- c. первую легкую цепь, L1; и
- d. вторую легкую цепь, L2;

где H1 и L1 образуют первое плечо, содержащее первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает первый антиген, предпочтительно, первый антиген, происходящий от человека, и

где H2 и L2 образуют второе плечо, содержащее второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает второй антиген, предпочтительно, второй антиген, происходящий от человека, где

(a) H1 содержит CH1 область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека и вариабельную область тяжелой цепи (VH область); и

(b) L1 содержит CL область легкой цепи каппа человека или легкой цепи лямбда человека и вариабельную область легкой цепи (VL область);

где CH1 область, VH область, CL область и VL область содержат аминокислотные замены в аминокислотном остатке, соответствующем положению аминокислоты SEQ ID NO: 15, 21, 22 или 23 для CH1; SEQ ID NO: 13 для VH; SEQ ID NO: 19 или 24 для CL; и SEQ ID NO: 17 для VL;

где аминокислотные замены в CH1 области, VL области, CL области и VL области выбраны из:

- (1) C220X в CH1, G44C в VH, C214X в CL и G101C в VL; или
- (2) C131X в CH1, G44C в VH, C214X в CL и G101C в VL;

где X выбран из S, A или G.

3. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, отличающееся тем, что первый антигенсвязывающий домен представляет собой домен связывания CD47.

4. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, отличающееся тем, что VH область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CH1 область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, VL область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и CL область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

5. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что

(a) второе плечо, включающее H2 и L2, не содержит аминокислотные замены первого плеча, включающего H1 и L1;

(b) каждая из двух тяжелых цепей H1 и H2 содержит VH область, CH1 область и Fc область (содержащую CH2 и CH3 области), где VL области имеют разные аминокислотные последовательности;

(c) каждая из двух тяжелых цепей H1 и H2 содержит VH область, CH1 область и Fc область (содержащую CH2 и CH3 области), где CH1 области имеют разные аминокислотные последовательности;

(d) каждая из двух тяжелых цепей H1 и H2 содержит VH область, CH1 область и Fc область (содержащую CH2 и CH3 области), где Fc области имеют разные аминокислотные последовательности;

(e) каждая из двух легких цепей L1 и L2 содержит VL область и CL область, где VL области имеют разные аминокислотные последовательности; и/или

(f) каждая из двух легких цепей L1 и L2 содержит VL область и CL область, где CL области имеют разные аминокислотные последовательности.

6. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5, отличающееся тем, что H1 и H2 образуют гетеродимер.

7. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, отличающееся тем, что

(a) VH область H1 и VL область L1 имеют замещающую мутацию Q39E и Q38K, соответственно, и VH область H2 и VL область L2 имеют замещающую мутацию Q39K и Q38E, соответственно; или

(b) VH область H1 и VL область L1 имеют замещающую мутацию Q39K и Q38E, соответственно, и VH область H2 и VL область L2 имеют замещающую мутацию Q39E и Q38K, соответственно.

8. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7, отличающееся тем, что выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое анти-CD47/анти-FR α антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где первый антигенсвязывающий домен специфически связывает CD47, предпочтительно, CD47 человека, и второй антигенсвязывающий домен специфически связывает фолатный рецептор α (FR α), предпочтительно, FR α человека.

9. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, отличающееся тем, что

(a) первый антигенсвязывающий домен имеет последовательность VH SEQ ID: 13 и последовательность VL SEQ ID: 17, и второй антигенсвязывающий домен имеет последовательность VH SEQ ID: 33 и последовательность VL SEQ ID: 35; или

(b) первый антигенсвязывающий домен имеет последовательность VH SEQ ID: 13 и последовательность VL SEQ ID: 17, и второй антигенсвязывающий домен имеет последовательность VH SEQ ID: 14 и последовательность VL SEQ ID: 18.

10. Выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8 или 9, отличающееся тем, что биспецифическое анти-CD47/анти-FR α антитело или

его антигенсвязывающий фрагмент способны блокировать связывание сигнального регуляторного белка альфа (SIRP α) с CD47 на раковых клетках, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, индуцируя опосредованный макрофагами фагоцитоз раковых клеток, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, и/или связывание раковых клеток, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, с минимальным или неопределяемым связыванием с эритроцитами человека (RBC).

11. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-10.

12. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 11.

13. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 12.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-10, и фармацевтически приемлемый носитель.

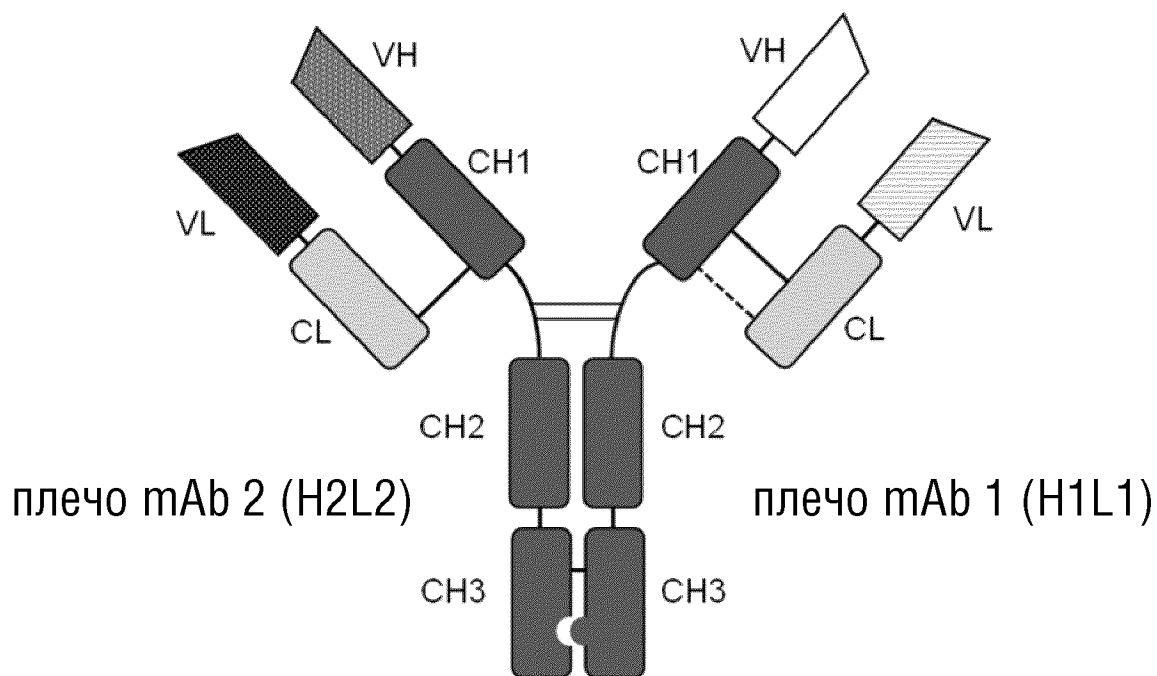
15. Способ таргетирования FR α и CD47, которые экспрессируются на поверхности раковых клеток, у нуждающегося в этом субъекта, блокирования связывания SIRP α с CD47 на раковых клетках, экспрессирующих как FR α , так и CD47, у нуждающегося в этом субъекта, индукции опосредованного макрофагами фагоцитоза раковых клеток, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, у субъекта, нуждающегося в этом, связывания раковых клеток, которые экспрессируют как FR α , так и CD47, с минимальным или неопределяемым связыванием с эритроцитами человека (RBC) у субъекта, нуждающегося в этом, и/или лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей выделенное биспецифическое анти-CD47/анти-FR α антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 8-10 и фармацевтически приемлемый носитель, необязательно, где рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

16. Способ получения биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-10, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающих продуцирование биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

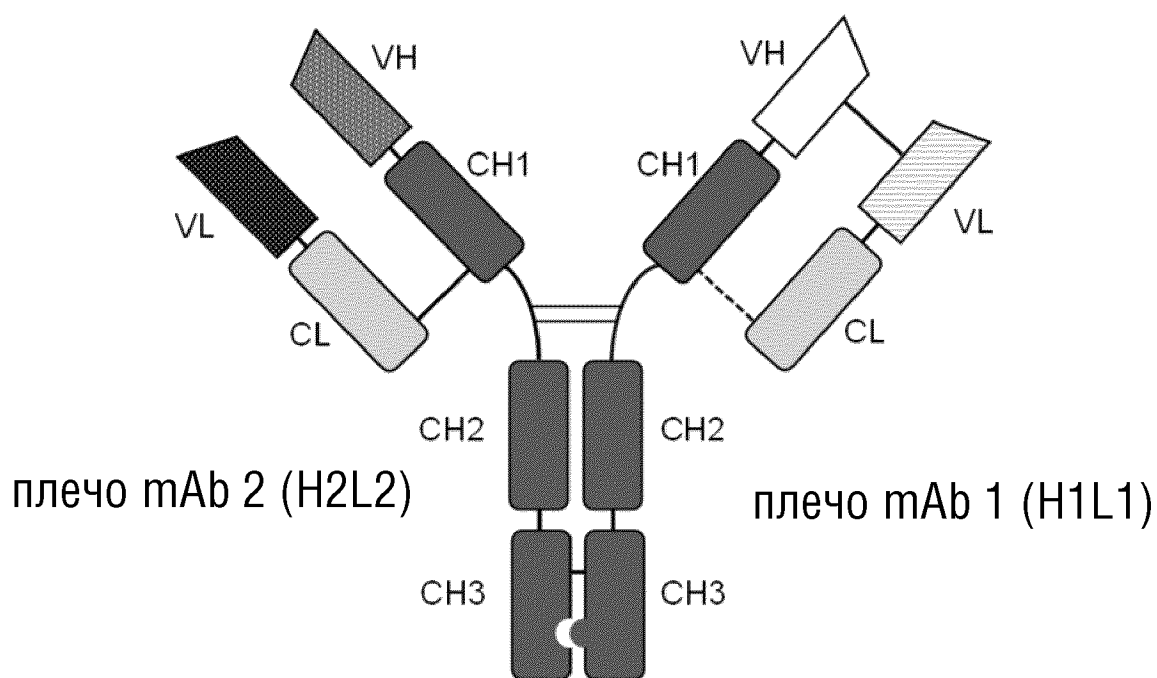
17. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей

биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из пп. 1-10, включающий комбинирование биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

ФИГ.1А



ФИГ.1В



ФИГ.2А

Область	FR1																							
Нумерация Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
mAб 1	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A
mAб 2	E	V	Q	L	V	E	T	G	G	G	L	I	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A

Область	FR1						CDR1					FR2												
Нумерация Kabat	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
mAb 1	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	I
mAb 2	S	G	F	T	F	S	D	F	G	M	H	W	I	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V

Область	FR2	CDR2																	FR3					
Нумерация Kabat	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71
mAb 1	G	N	I	D	P	S	D	S	E	T	H	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	V
mAb 2	A	Y	M	S	Y	T	P	G	T	F	H	Y	A	D	T	V	K	D	R	F	T	I	S	R

Область	FR3																							
Нумерация Kabat	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
mAb 1	D	K	S	T	S	T	V	Y	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C
mAb 2	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C

Область	FR3		CDR3								FR4										
Нумерация Kabat	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
mAб 1	A	G	T	D	L	-	-	-	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
mAб 2	A	R	V	H	V	G	T	V	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

ФИГ.2В

Область	CH1																							
Нумерация EU	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141
mAb 1	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A
mAb 2	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A

Область	CH1																							
Нумерация EU	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
mAb 1	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S
mAb 2	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S

Область	CH1																							
Нумерация EU	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189
mAb 1	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P
mAb 2	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P

Область	CH1																							
Нумерация EU	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213
mAb 1	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K
mAb 2	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K

Область	CH1						
Нумерация EU	214	215	216	217	218	219	220
mAb 1	K*	V	E	P	K	S	C
mAb 2	K*	V	E	P	K	S	C

ФИГ.2С

Область	FR1																							CDR1
Нумерация Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
mAb 1	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	H
mAb 2	E	V	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R

Область	CDR1										FR2													
Нумерация Kabat	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
mAb 1	A	S	Q	N	I	N	V	W	L	S	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I
mAb 2	A	S	Q	N	I	N	N	N	L	H	W	F	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I

Область	CRD2	CDR2							FR3															
Нумерация Kabat	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
mAb 1	Y	K	A	S	N	L	H	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T
mAb 2	K	Y	A	S	Q	S	I	S	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T

Область	FR3																CDR3							
Нумерация Kabat	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a
mAb 1	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	G	Q	S	Y	P	-
mAb 2	L	T	I	S	S	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	F	C	Q	Q	S	N	S	W	P	A

Область	CDR3		FR4									
Нумерация Kabat	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
mAb 1	F	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
mAb 2	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K

ФИГ.2D

Область	CL																							
Нумерация EU	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131
mAb 1	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S
mAb 2	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S

Область	CL																							
Нумерация EU	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155
mAb 1	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A*	L	Q
mAb 2	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A*	L	Q

Область	CL																							
Нумерация EU	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179
mAb 1	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L
mAb 2	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L

Область	CL																							
Нумерация EU	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203
mAb 1	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V*	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
mAb 2	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V*	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S

Область	CL										
Нумерация EU	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214
mAb 1	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
mAb 2	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C

ФИГ.2Е

Область	CH1																							
Нумерация EU	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141
IgG2	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S	T	A	A
IgG3	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	G	G	T	A	A
IgG4	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E	S	T	A	A

Нумерация EU	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
IgG2	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S
IgG3	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S
IgG4	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S

Область	CH1																							
Нумерация EU	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189
IgG2	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P*
IgG3	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S*	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P
IgG4	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P

Область	CH1																							
Нумерация EU	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213
IgG2	S	S	N*	F*	G	T	Q	T	Y	T	C	N	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K
IgG3	S	S	S*	L*	G	T	Q	T	Y	T	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K
IgG4	S	S	S	L	G	T	K	T	Y	T	C	N	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K

Область	CH1								
Нумерация EU	214	215	216	217	218			219	220
IgG2	T	V	E	R	K			C	C
IgG3	R	V	E	L	K	T	P	L	G
IgG4	R	V	E	S	K	Y	G		

ФИГ.2F

Область	CL																							
Нумерация EU	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131
Лямбда CL	Q	P	K	A	A*	P	S*	V	T	L	F	P	P	S	S	E	E	L	Q	A	N	K	A	T

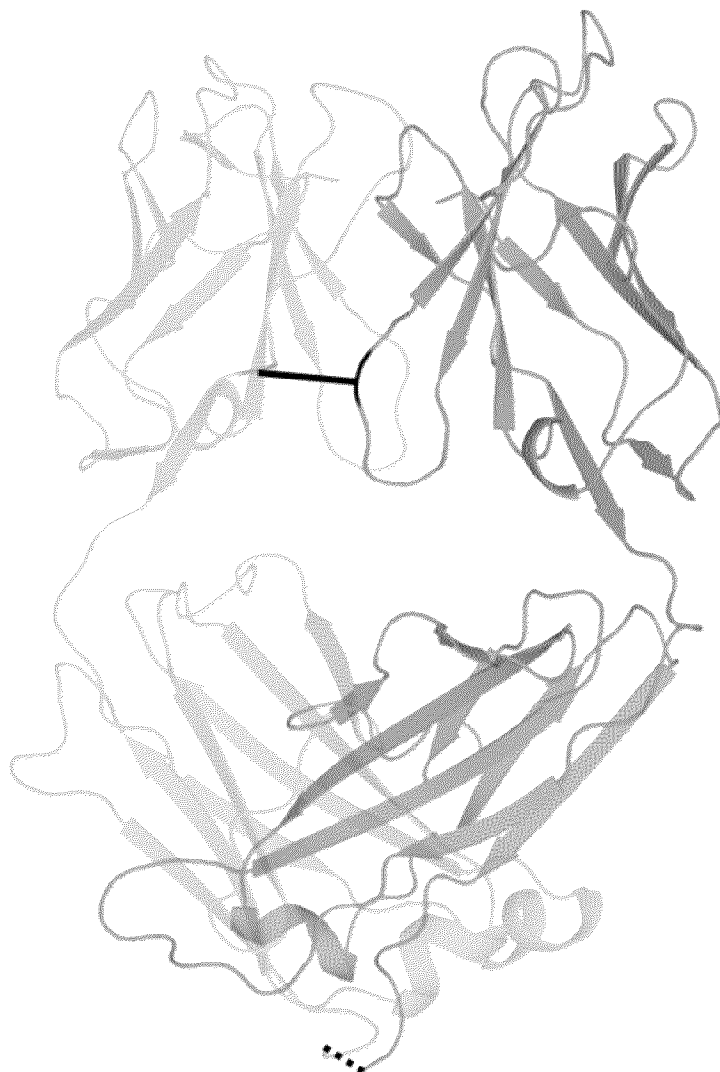
Область	CL																							
Нумерация EU	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153		154
Лямбда CL	L	V	C	L	I	S	D	F	Y	P	G	A	V	T	V	A	W	K	A	D	S*	S	P	V

Область	CL																							
Нумерация EU	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178
Лямбда CL	K	A	G			V	E	T	T	T*	P	S	K	Q	S	N	N	K	Y	A	A	S	S	Y

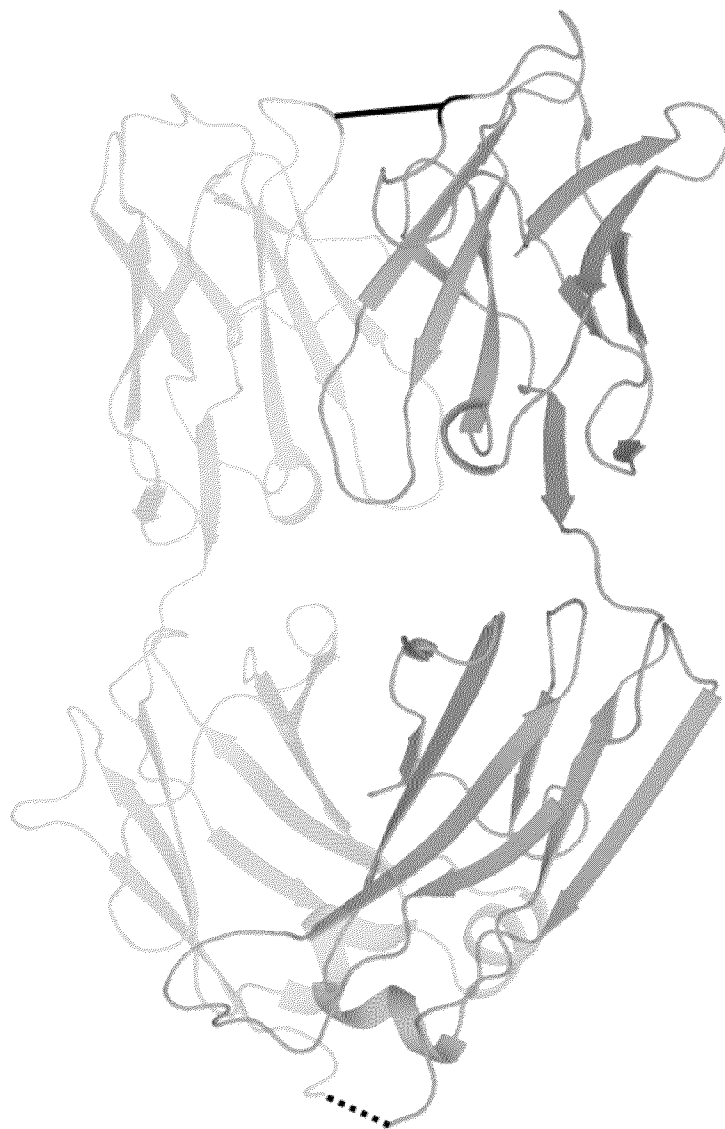
Область	CL																							
Нумерация EU	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202
Лямбда CL	L	S	L	T	P	E	Q	W	K	S	H	R*	S	Y	S	C	Q	V	T	H	E	G		

Область	CL											
Нумерация EU	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214
Лямбда CL	S	T	V	E	K	T	V	A	P	T	E	C

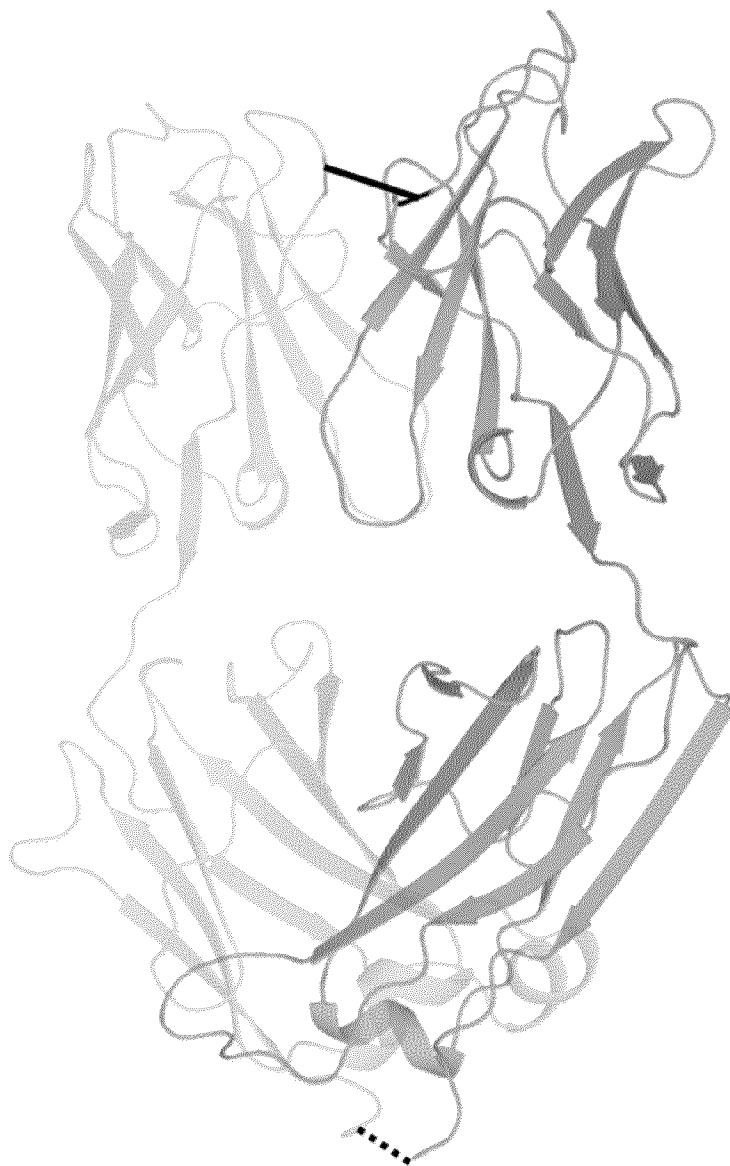
ФИГ.3А



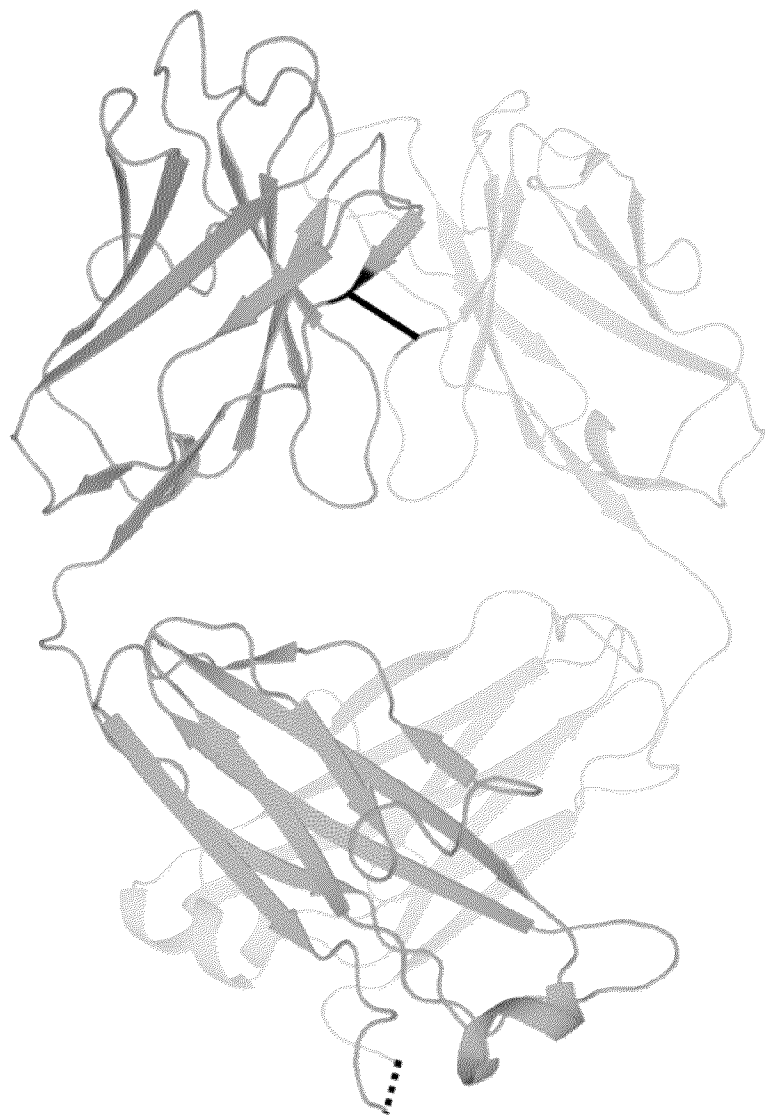
ФИГ.3В



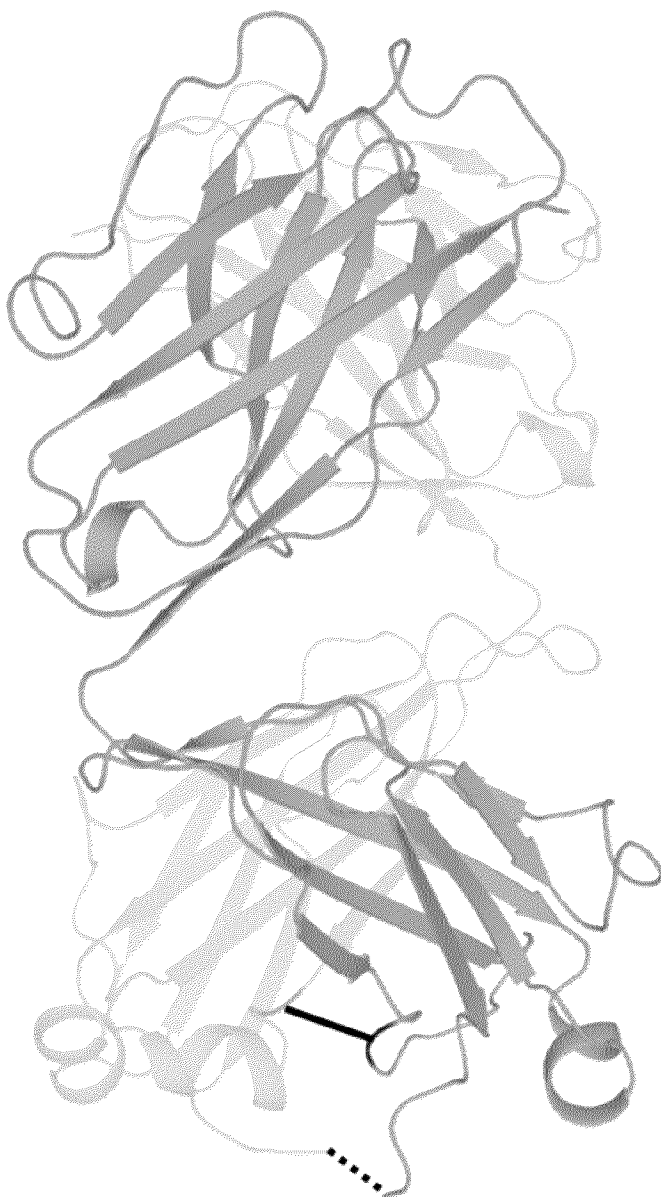
ФИГ.3С



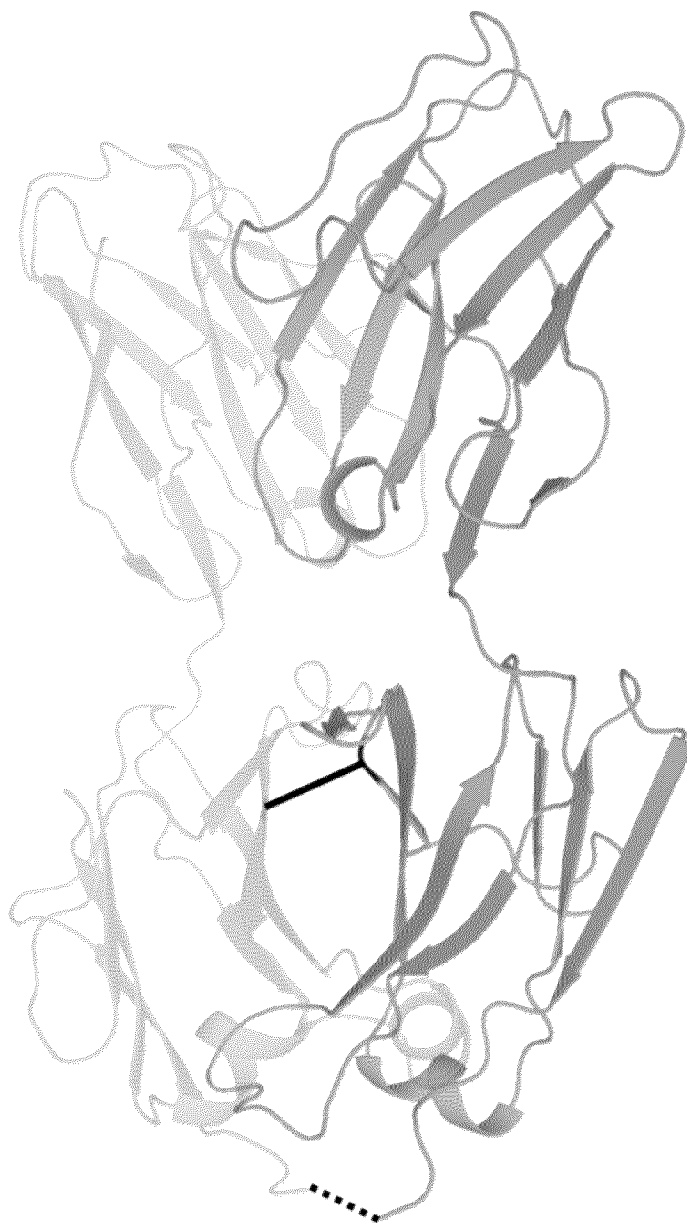
ФИГ.3D



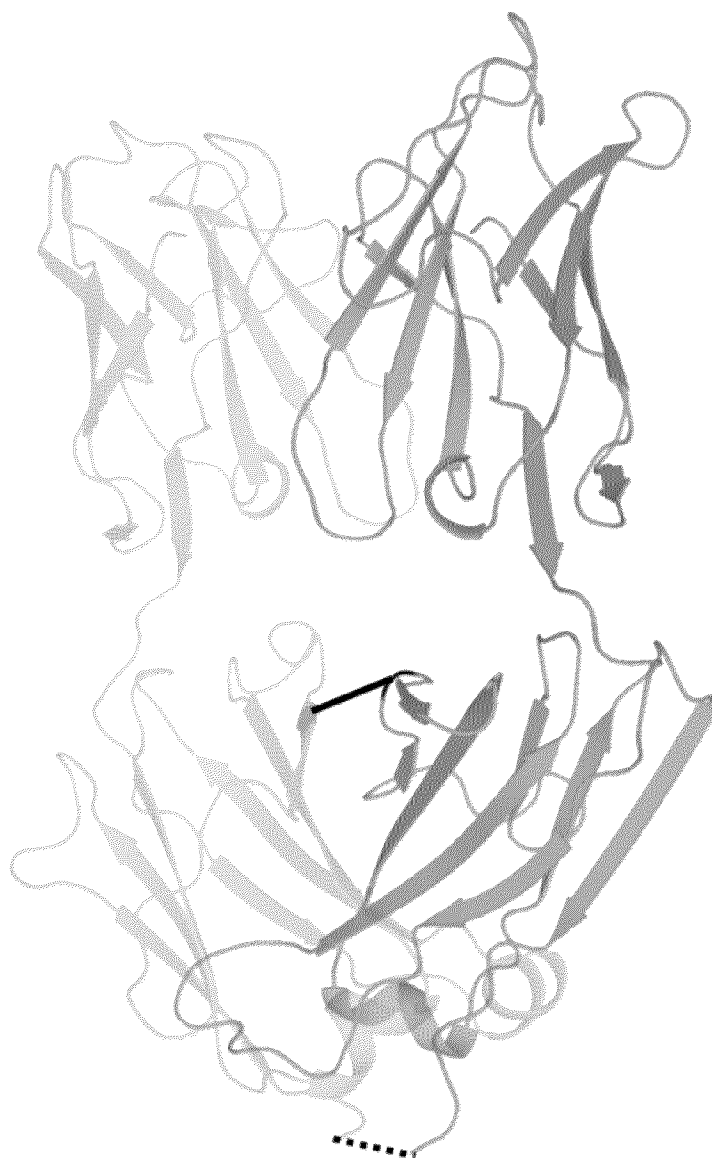
ФИГ.3Е



ФИГ.3F



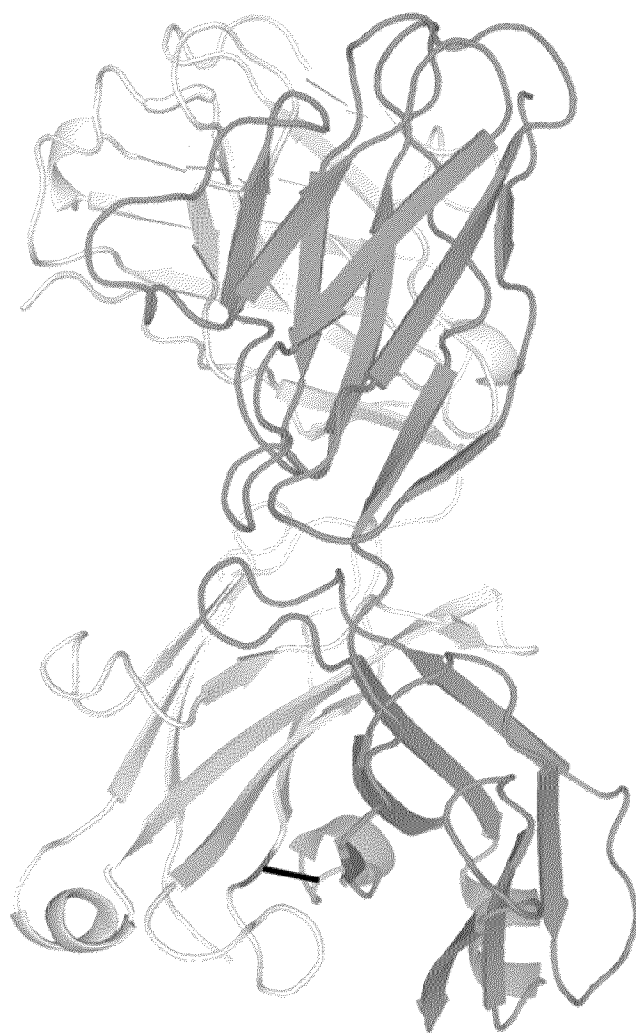
ФИГ.3G



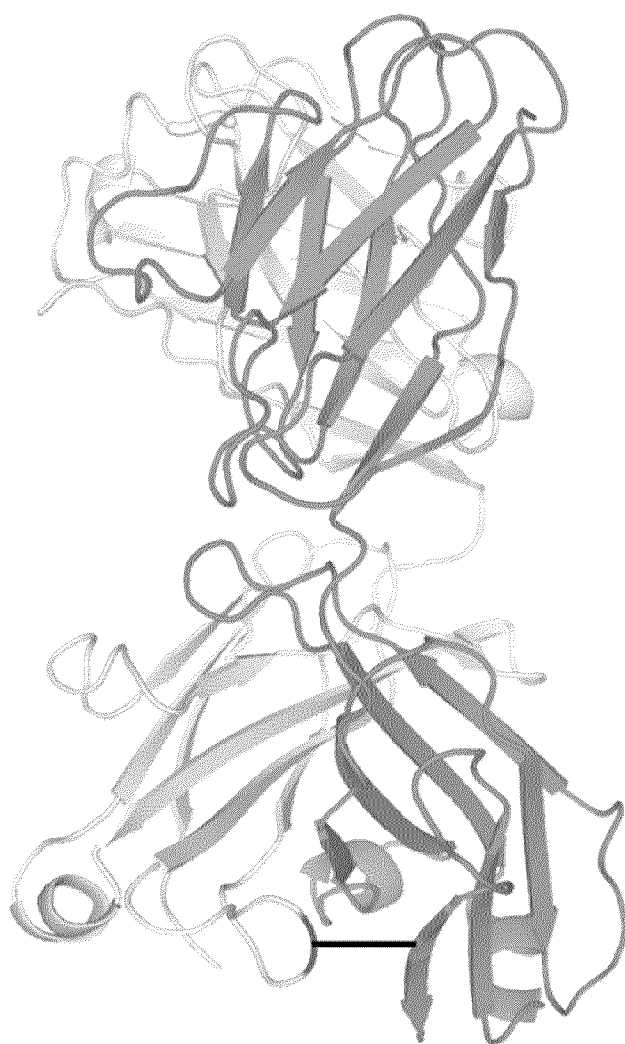
ФИГ.3Н



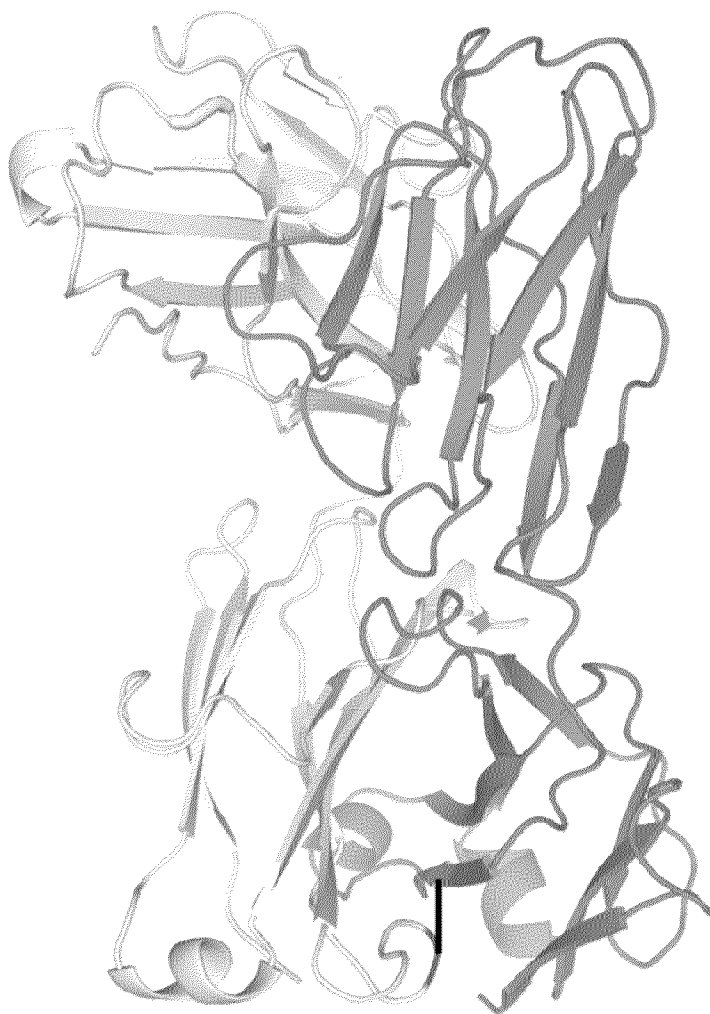
ФИГ.3I



ФИГ.3J



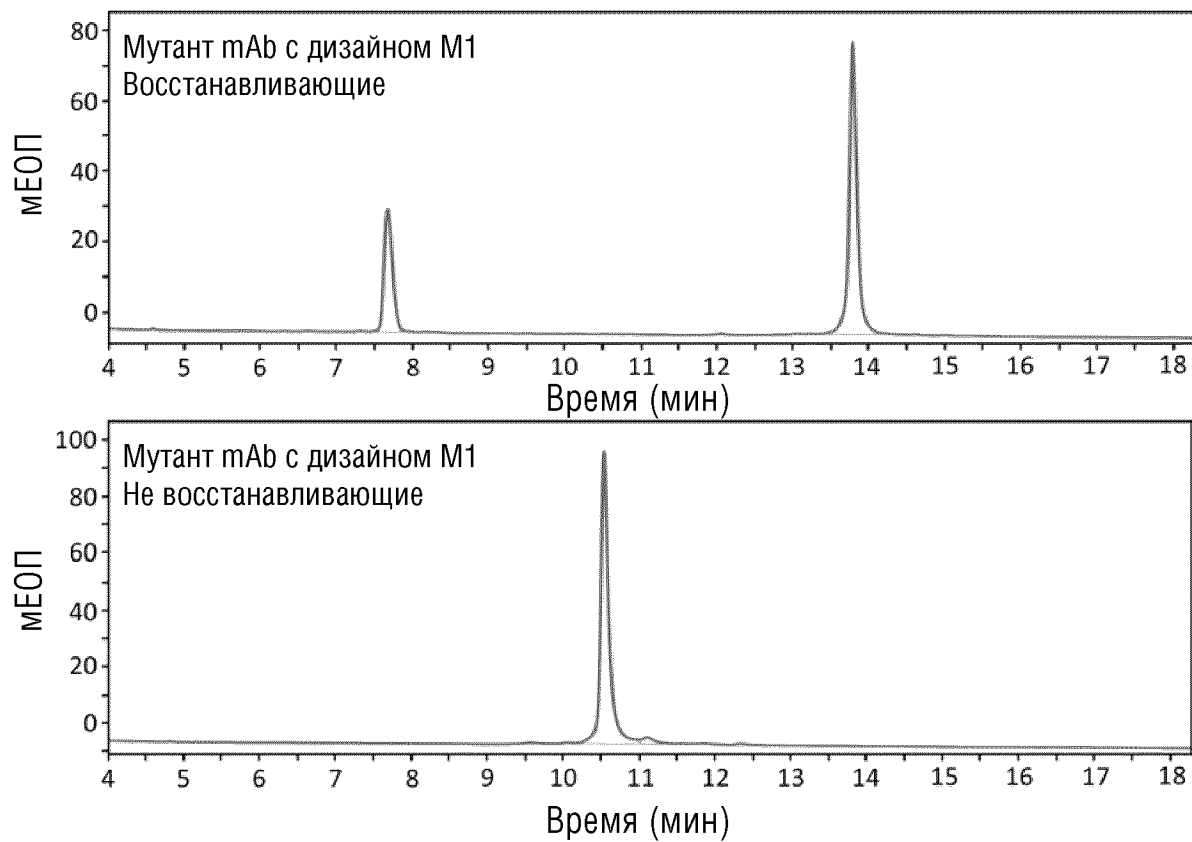
ФИГ.3К



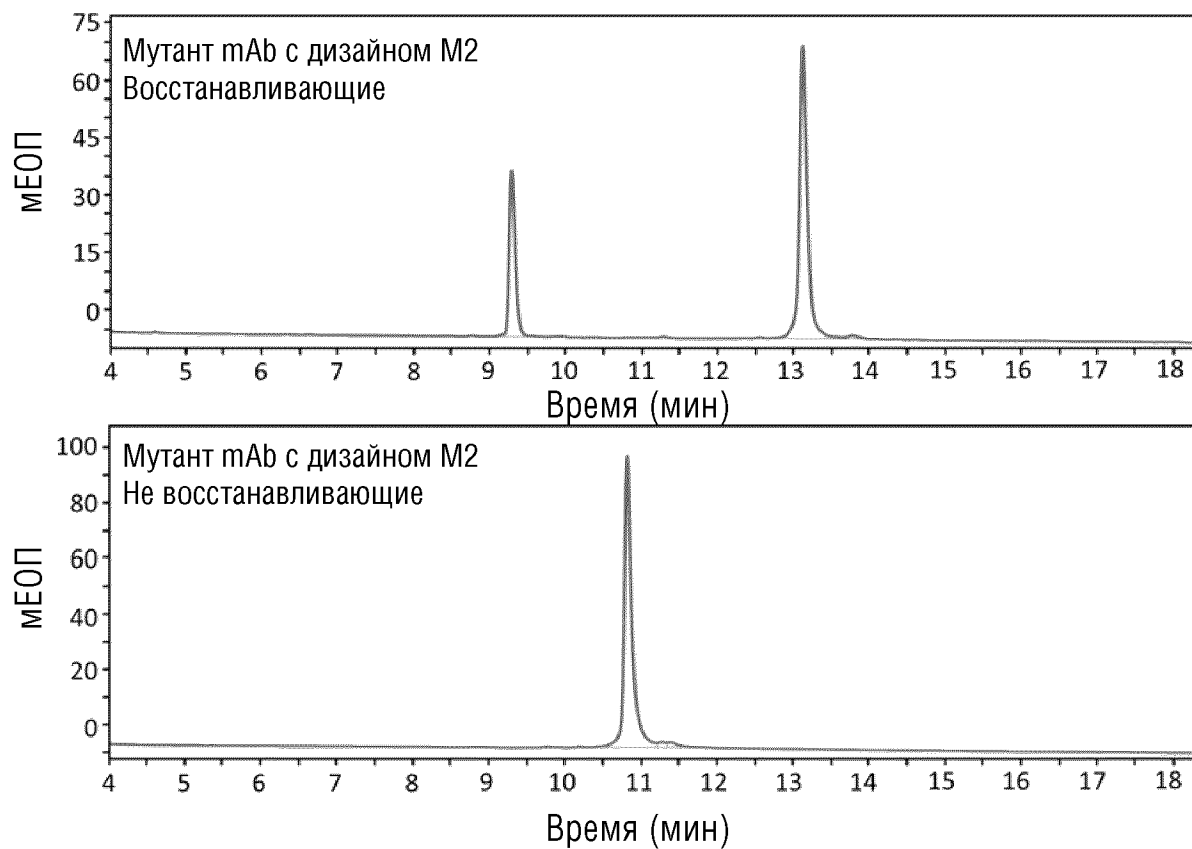
ФИГ.3L



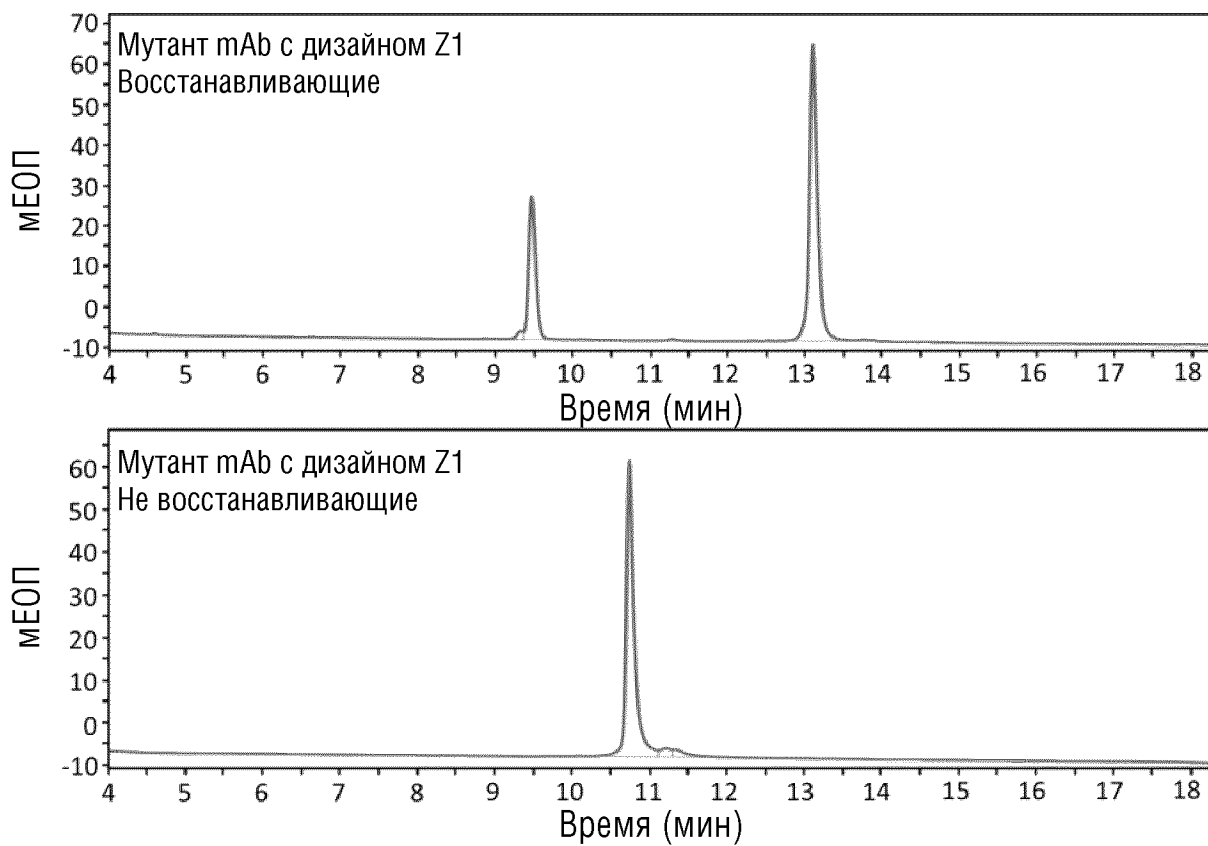
ФИГ.4А



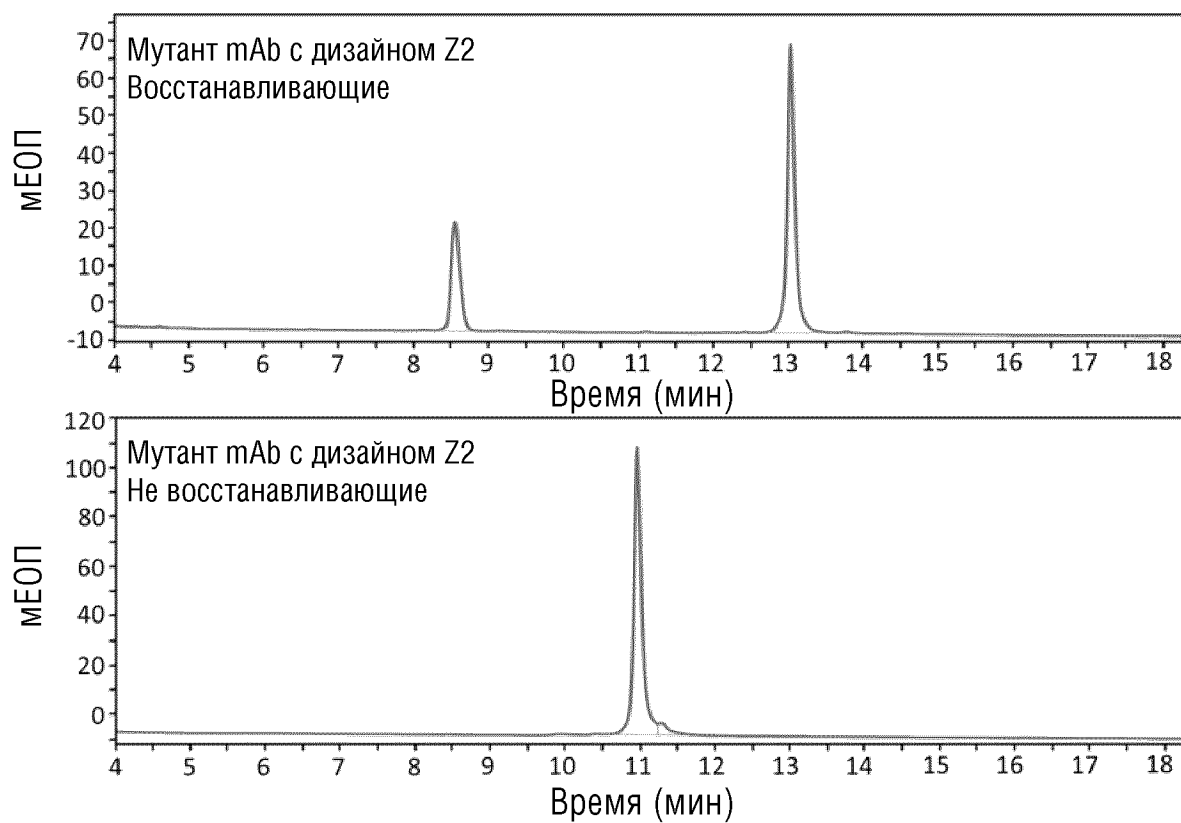
ФИГ.4В



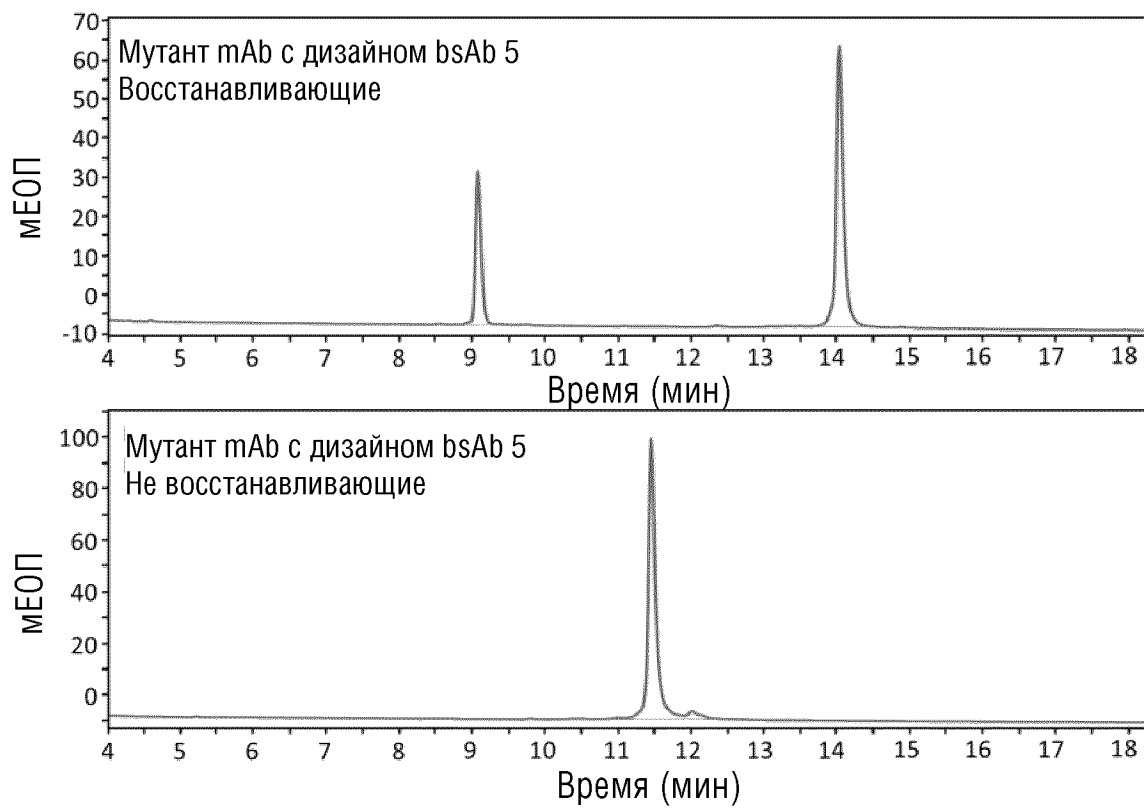
ФИГ.4С



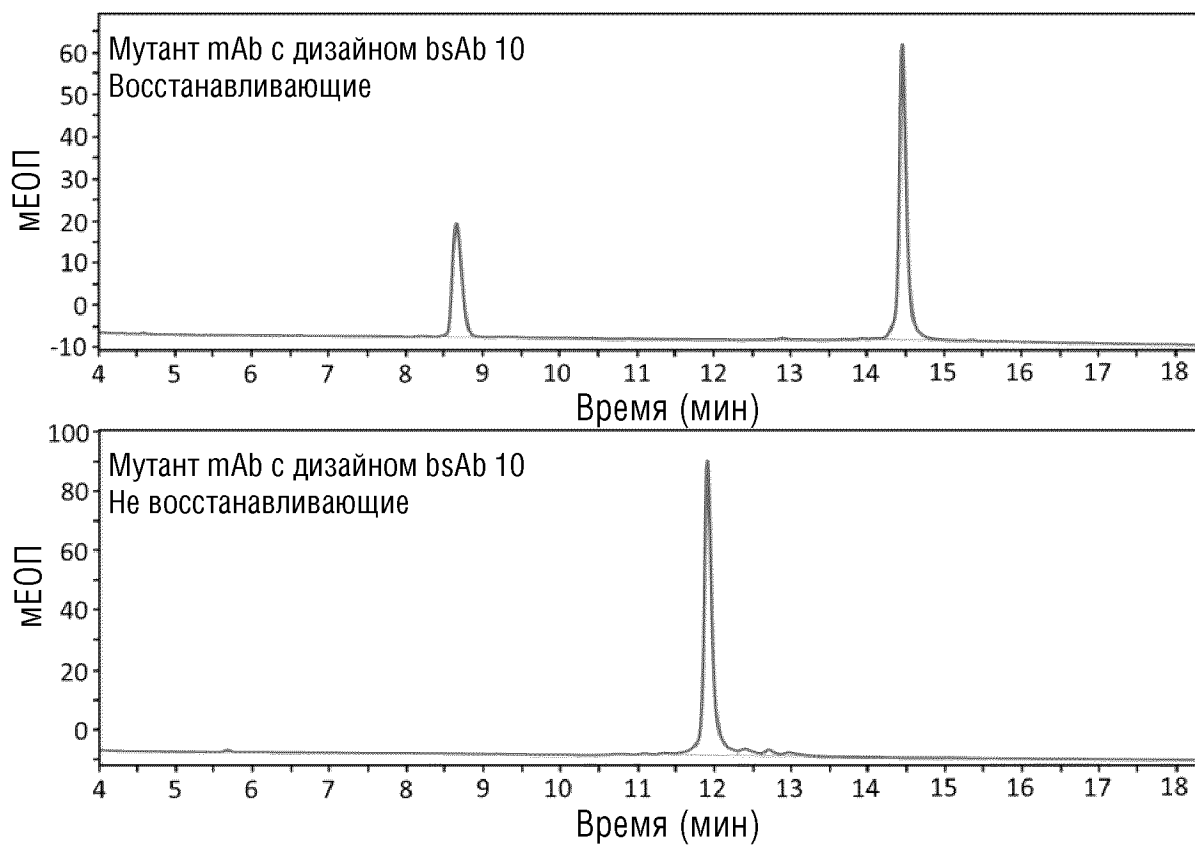
ФИГ.4D



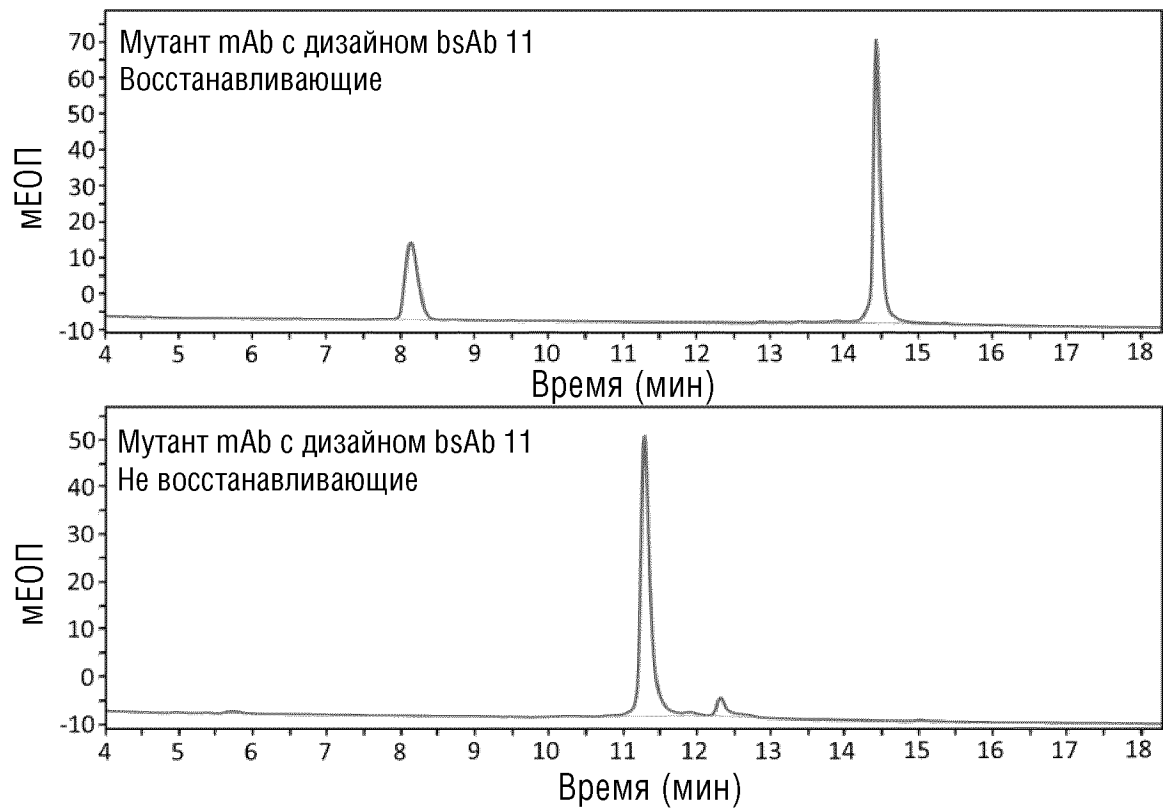
ФИГ.4Е



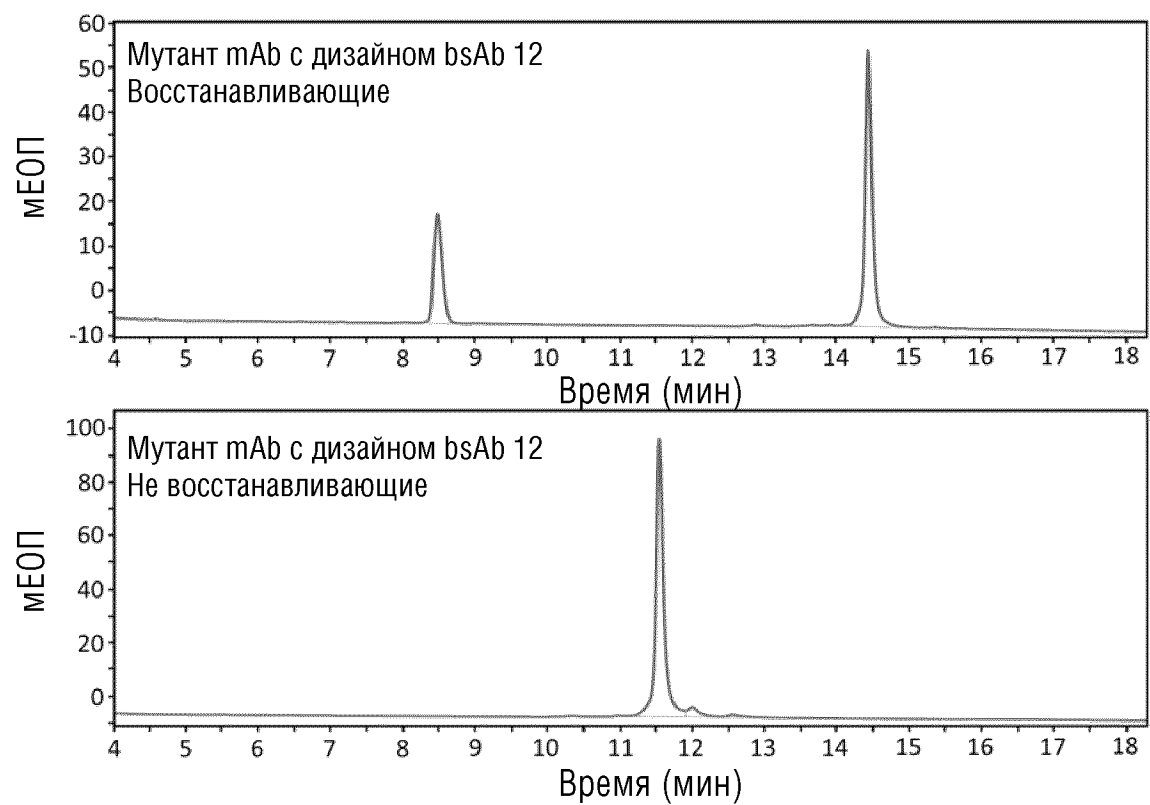
ФИГ.4F



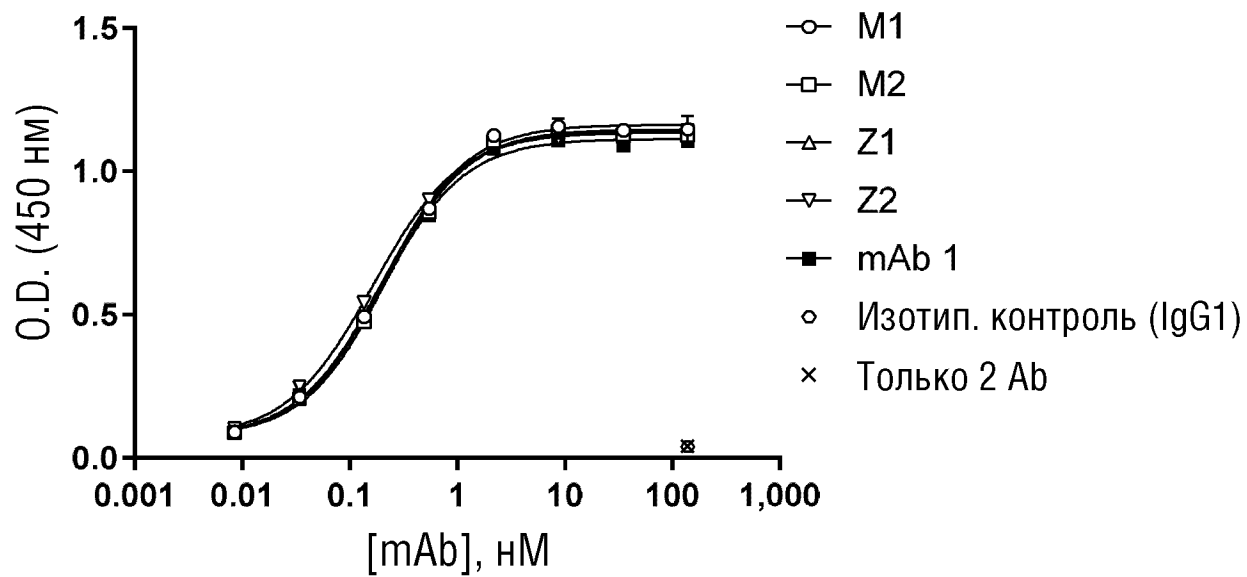
ФИГ.4G



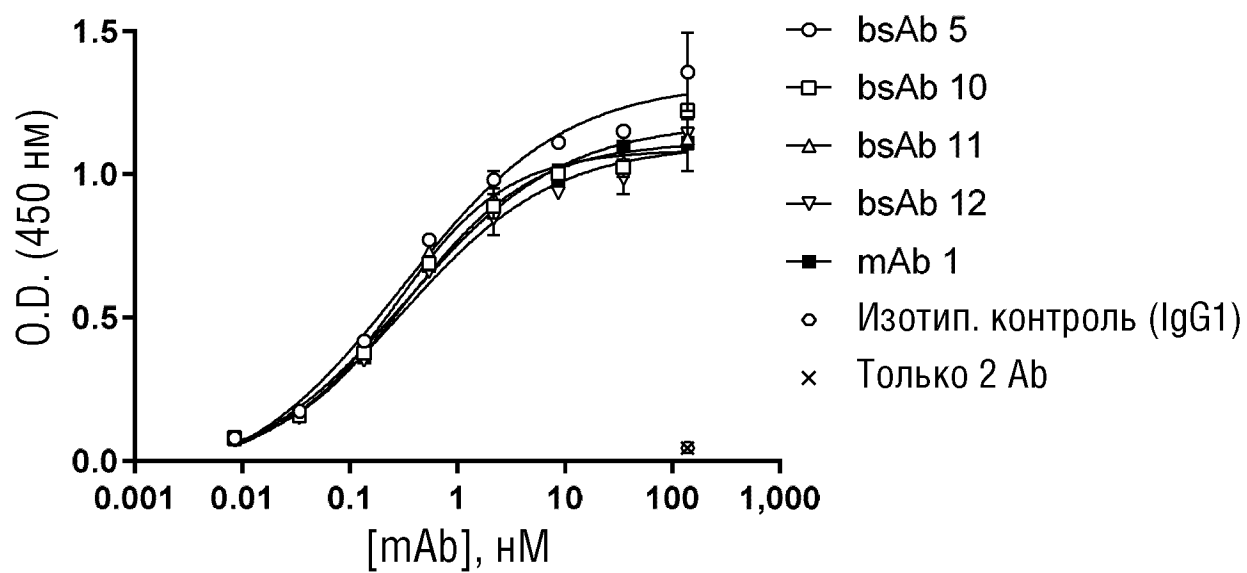
ФИГ.4H



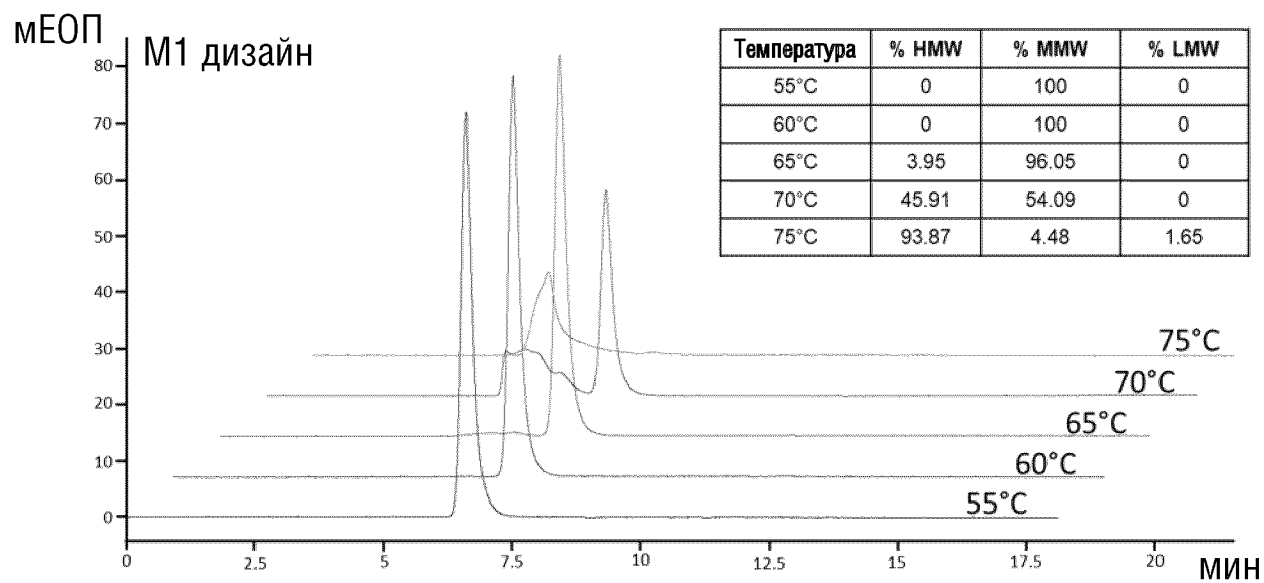
ФИГ.4I



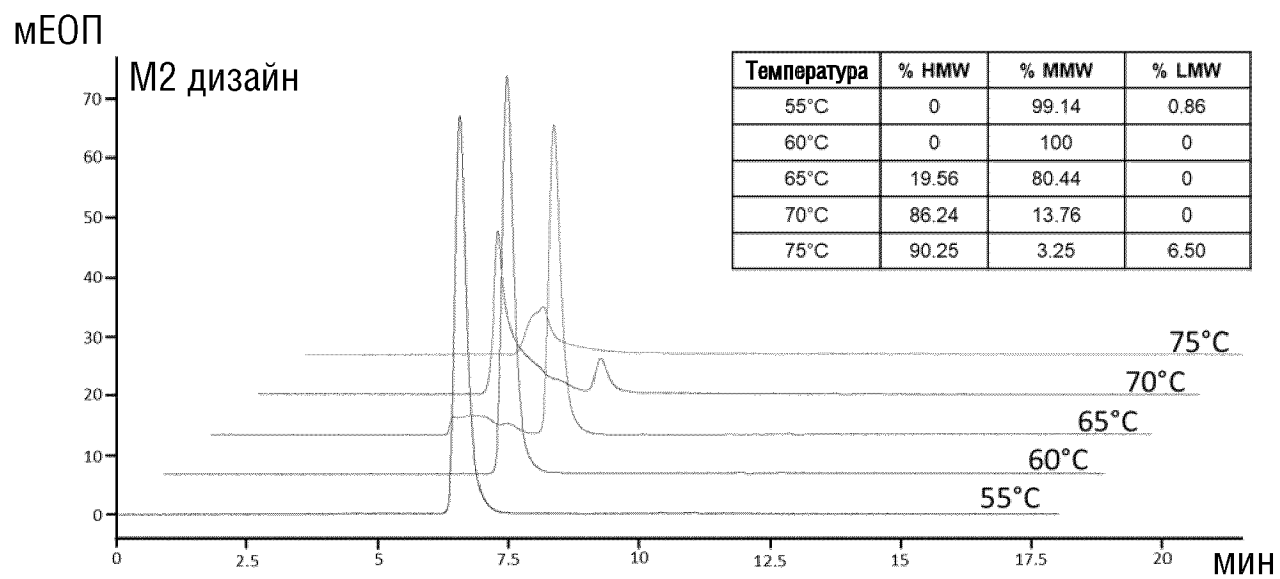
ФИГ.4J



ФИГ.5А



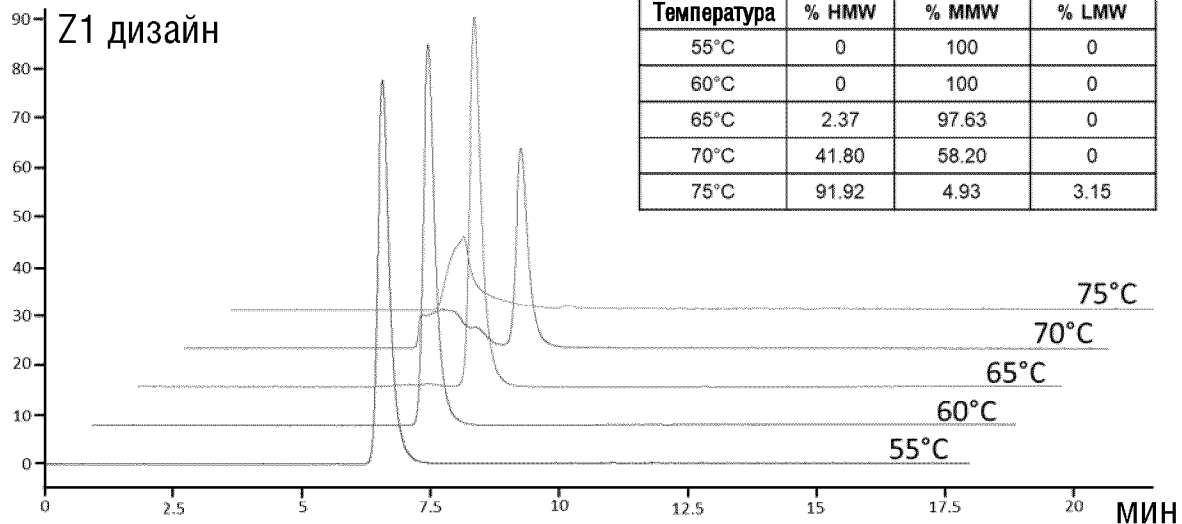
ФИГ.5В



ФИГ.5С

МЕОП

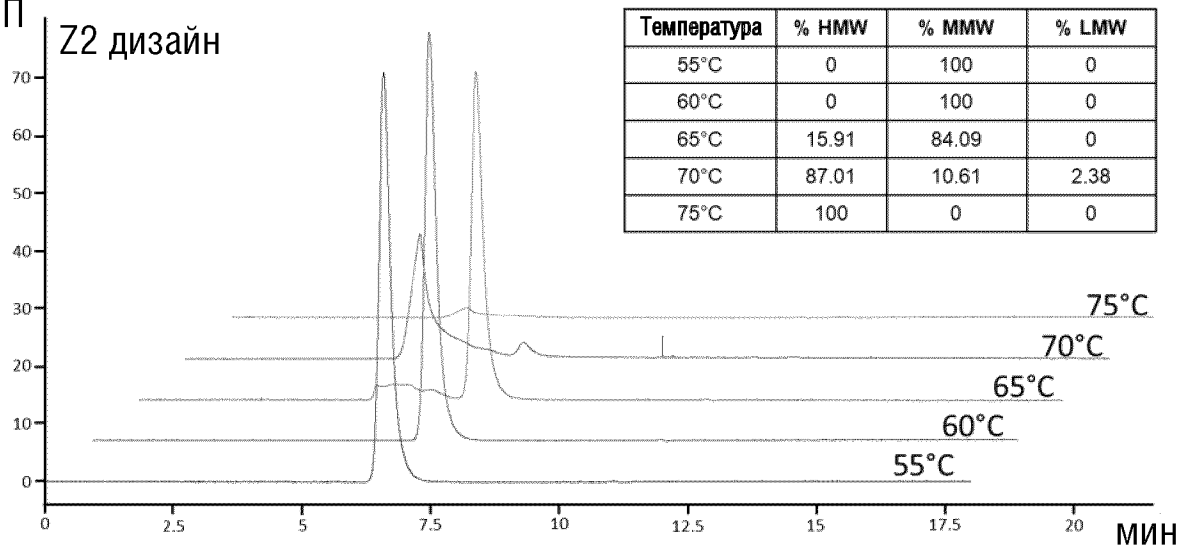
Z1 дизайн



ФИГ.5D

МЕОП

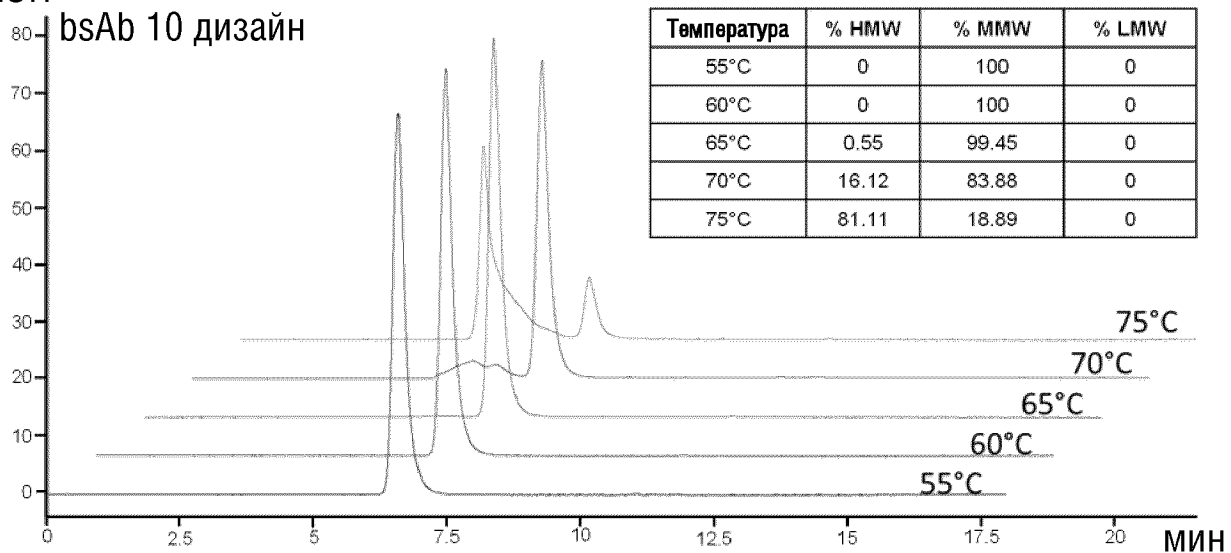
Z2 дизайн



ФИГ.5Е

МЕОП

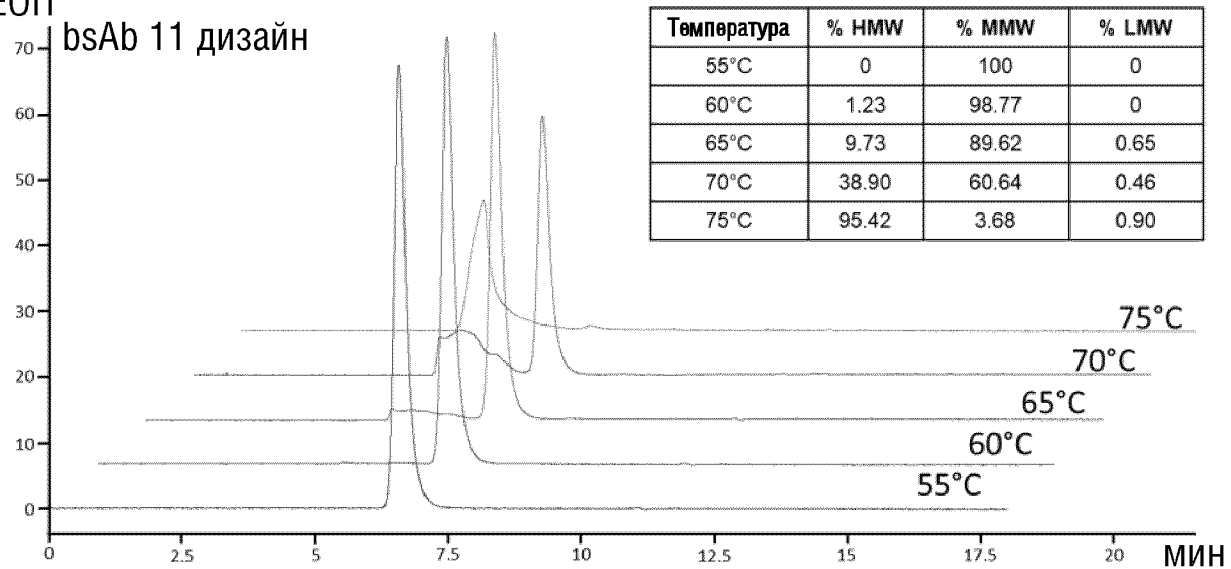
bsAb 10 дизайн



ФИГ.5F

МЕОП

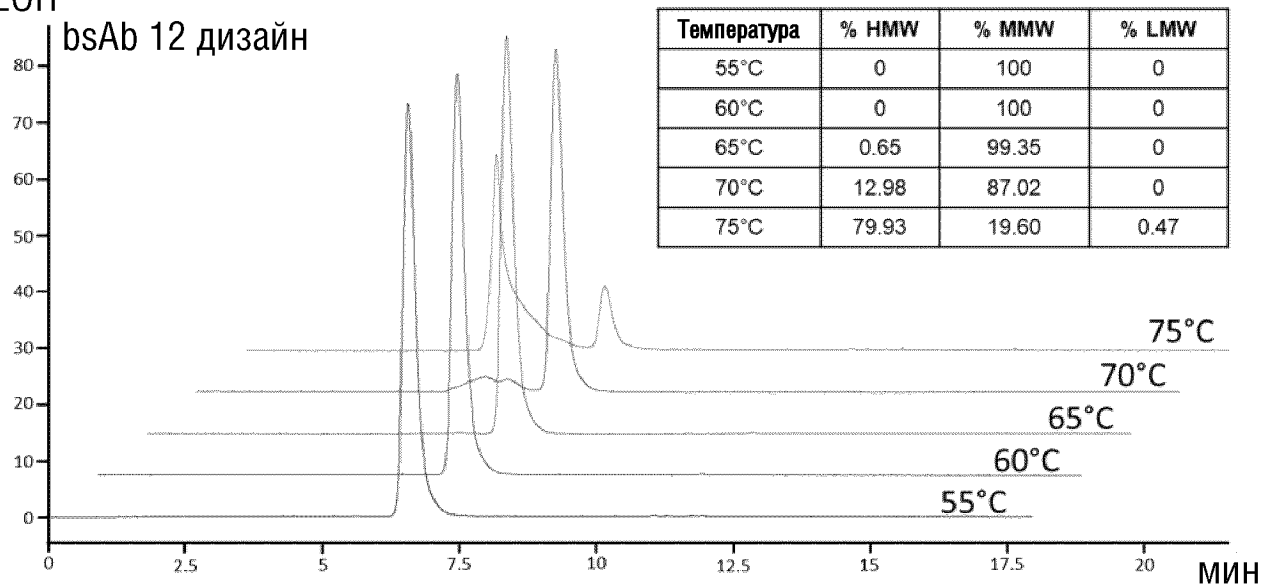
bsAb 11 дизайн



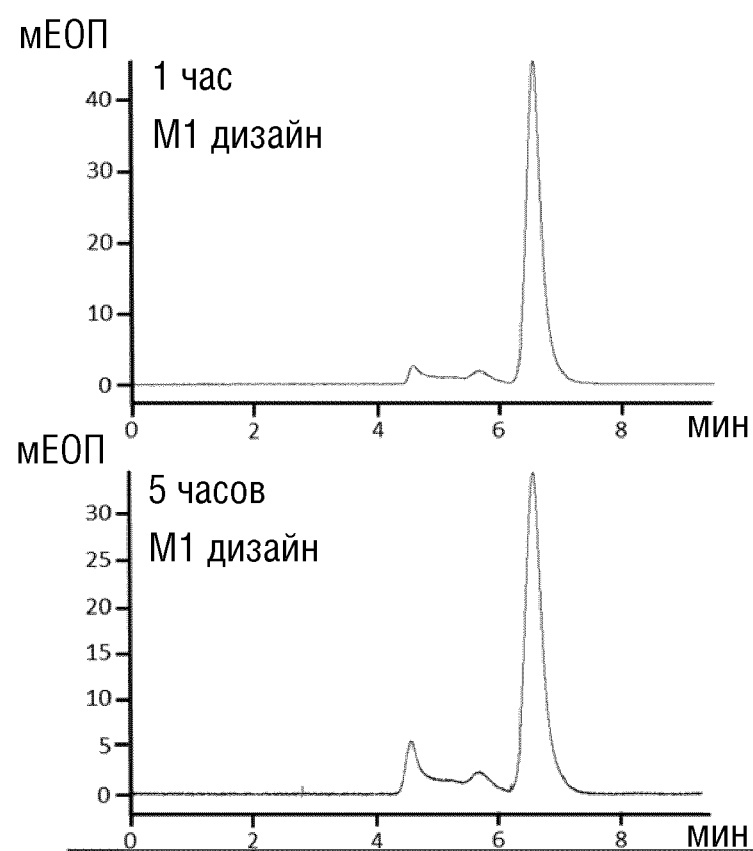
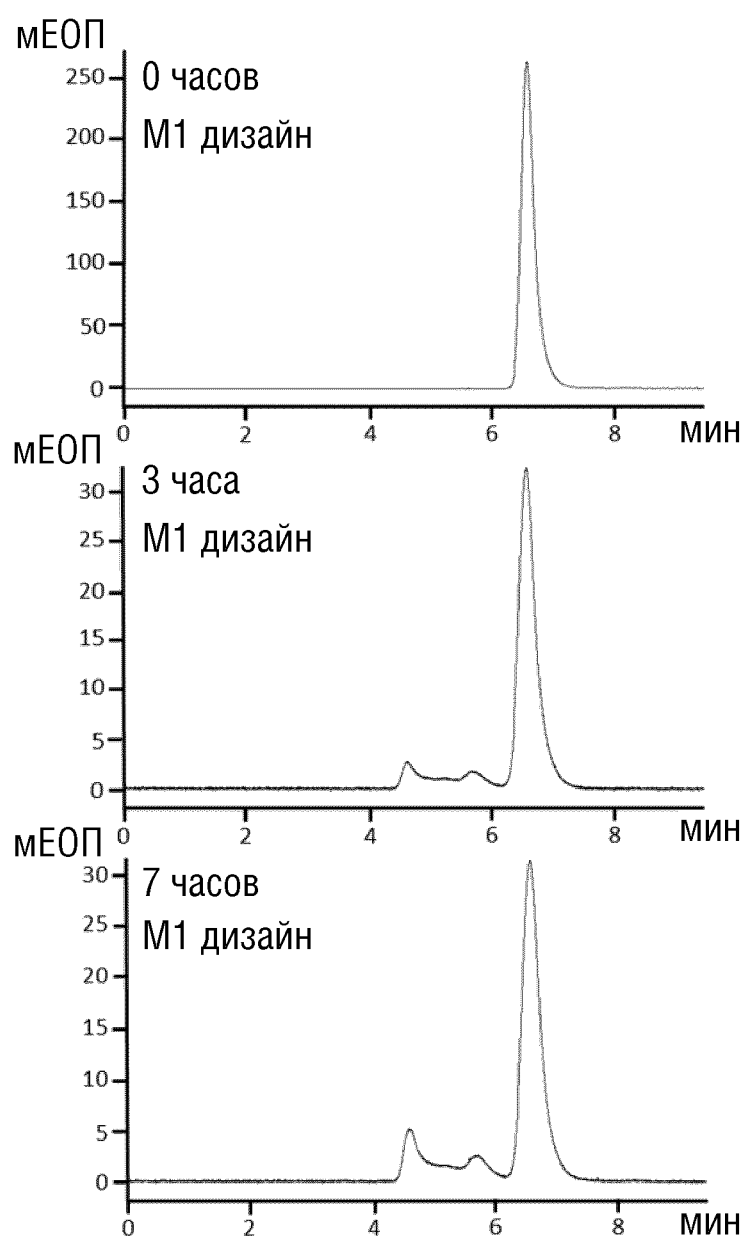
ФИГ.5G

МЕОП

bsAb 12 дизайн

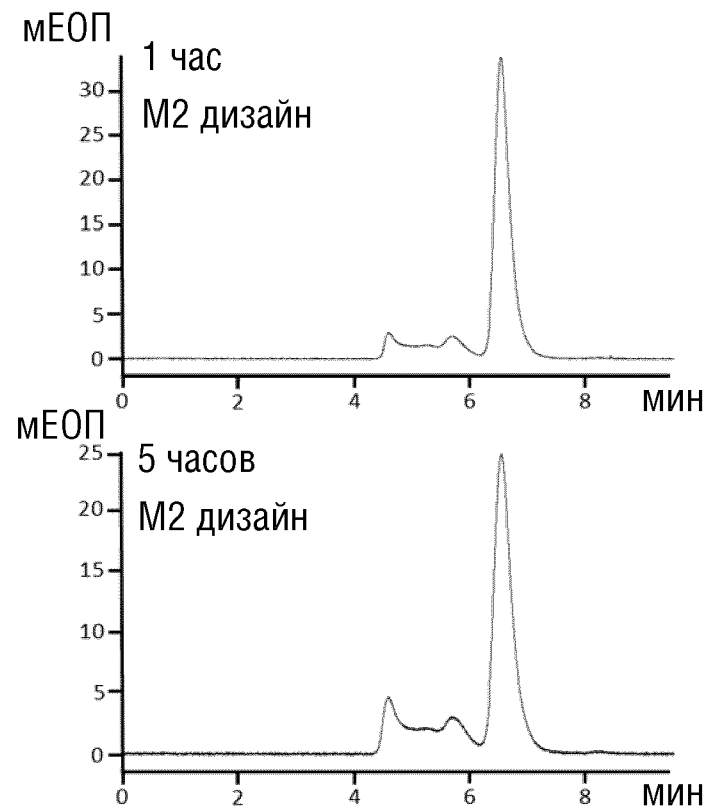
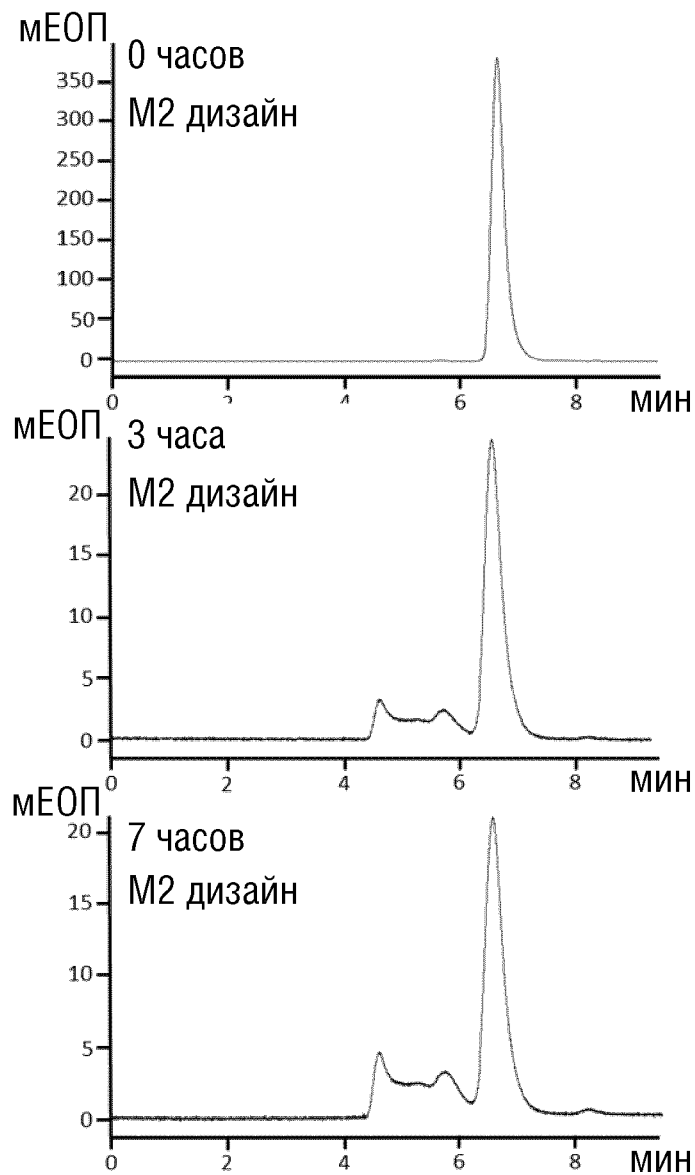


ФИГ.6А



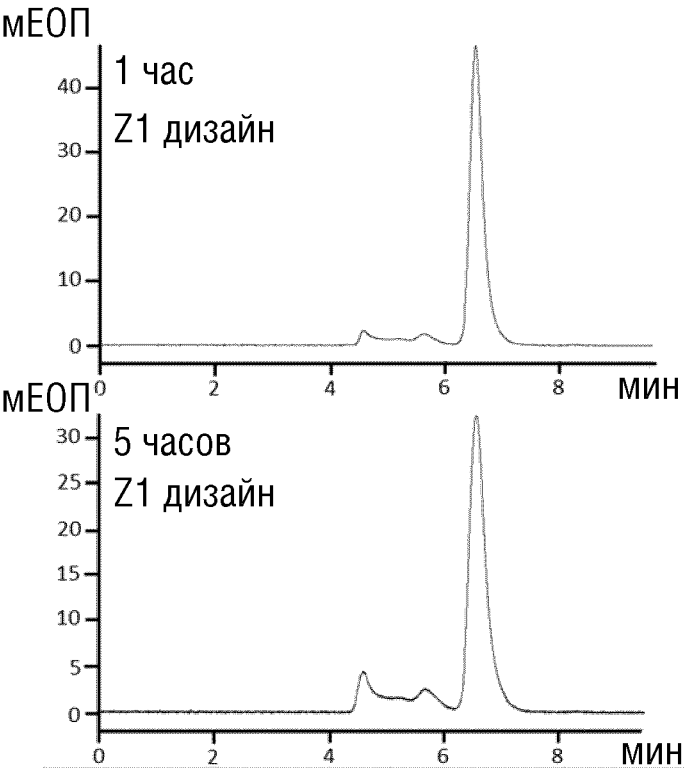
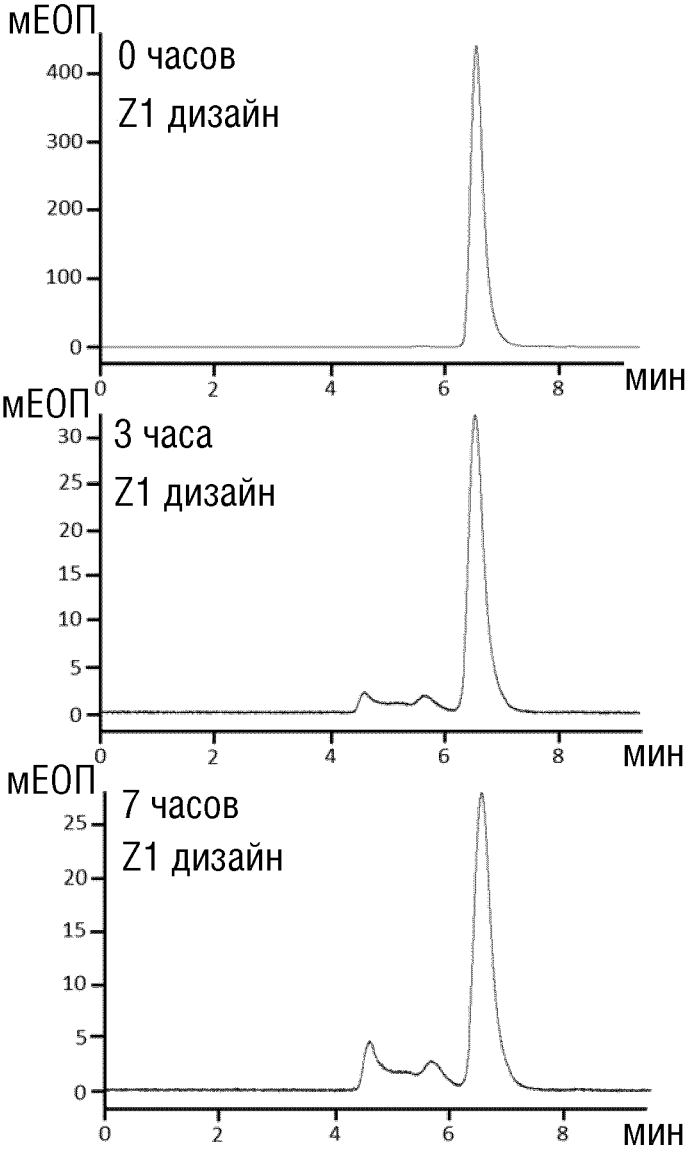
Время	% НМВ	% ММВ	% ЛМВ
0 часов	0	100	0
1 час	12.97	87.03	0
3 часа	16.62	83.38	0
5 часов	23.15	76.28	0.57
7 часов	25.81	74.19	0

ФИГ.6В



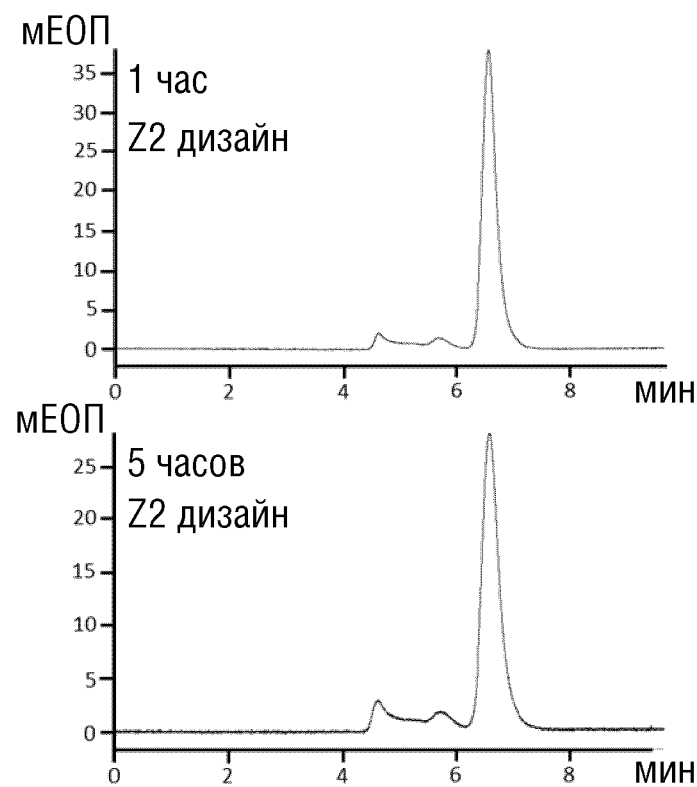
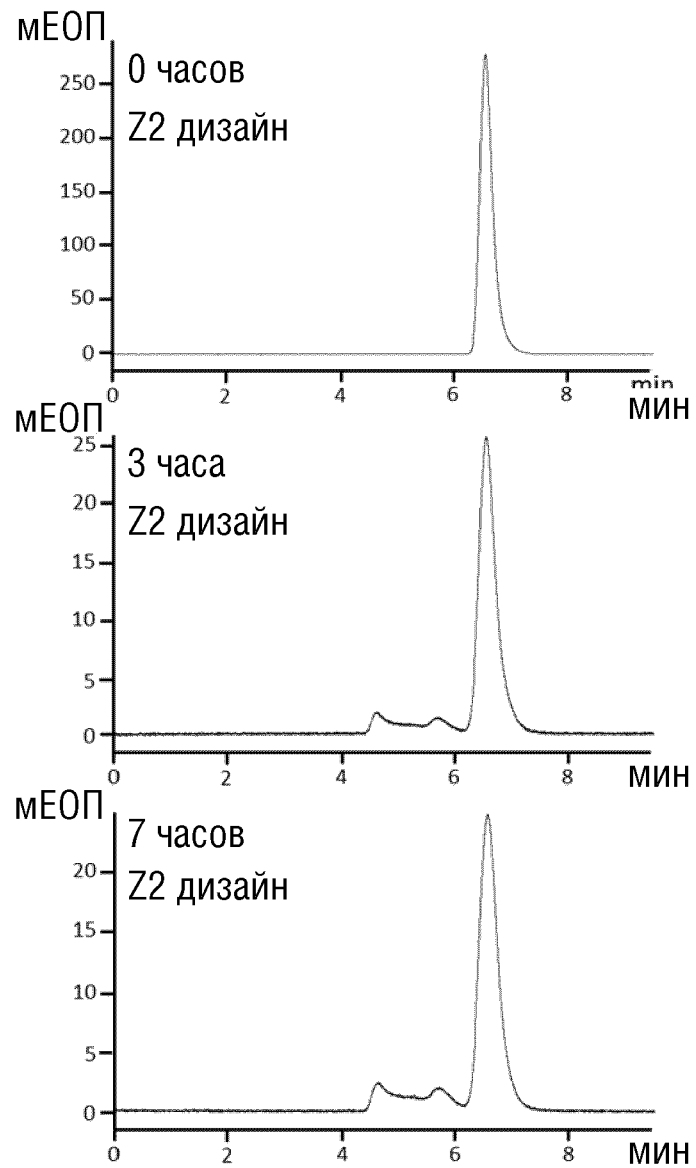
Время	% НМВ	% ММВ	% ЛМВ
0 часов	0	100	0
1 час	20.60	79.40	0
3 часа	25.97	73.21	0.82
5 часов	31.46	68.54	0
7 часов	34.84	63.59	1.57

ФИГ.6С



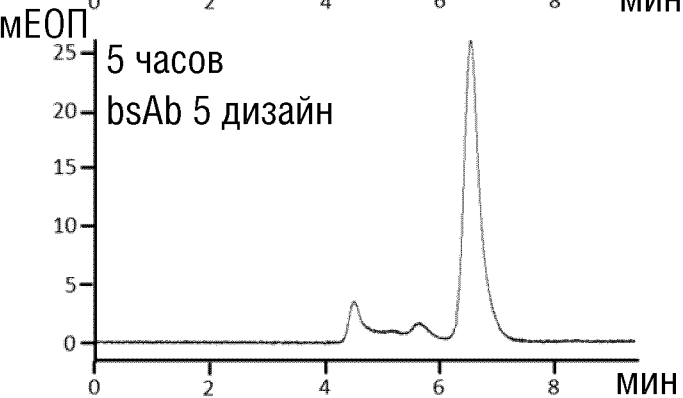
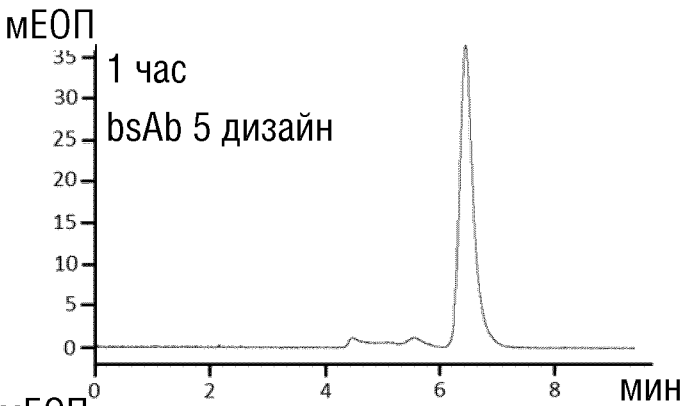
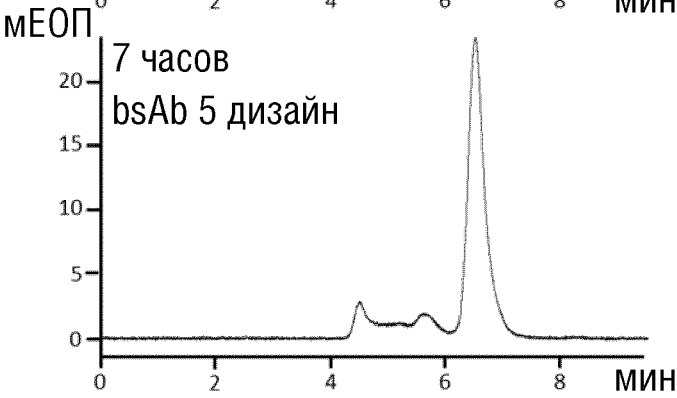
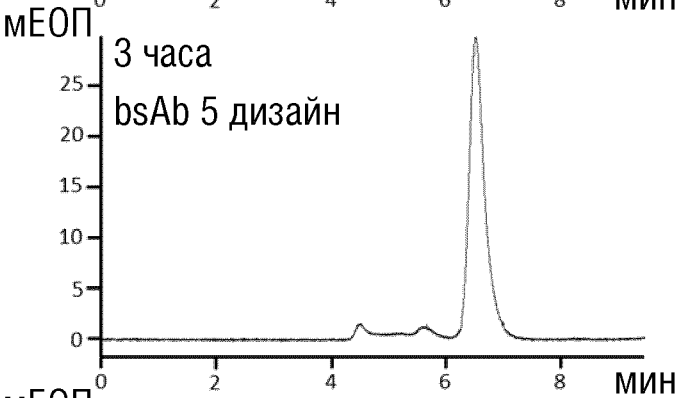
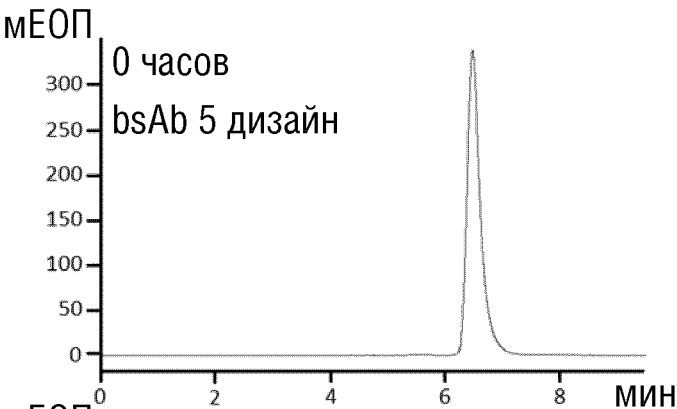
Время	% НМВ	% ММВ	% ЛМВ
0 часов	0.13	99.80	0.07
1 час	12.42	87.58	0
3 часа	16.93	83.07	0
5 часов	23.16	76.84	0
7 часов	26.09	72.07	1.84

ФИГ.6D



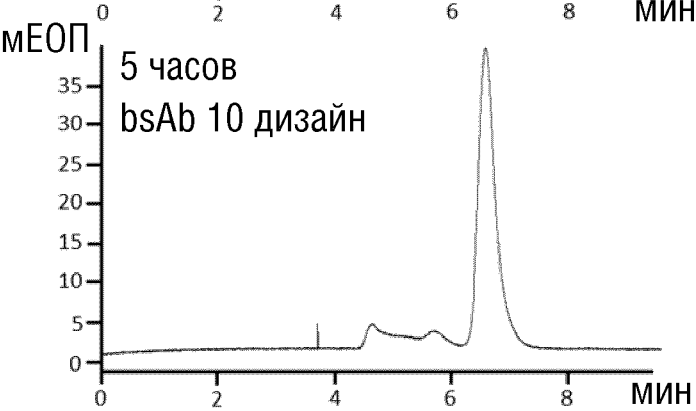
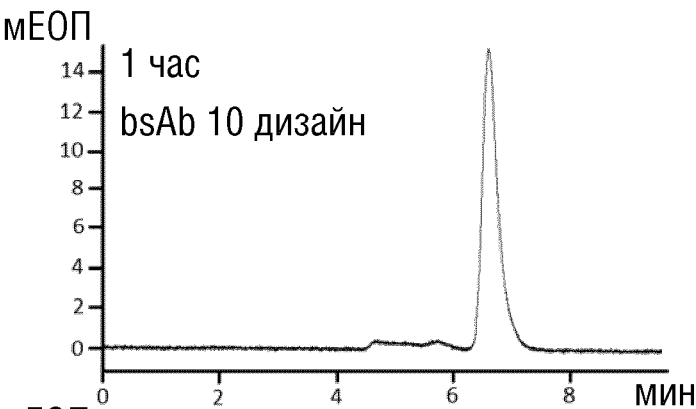
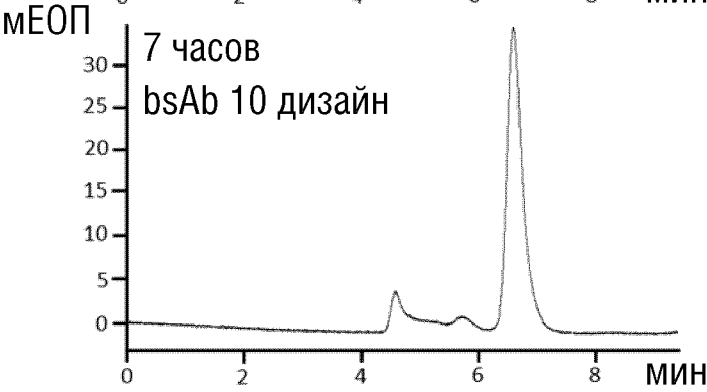
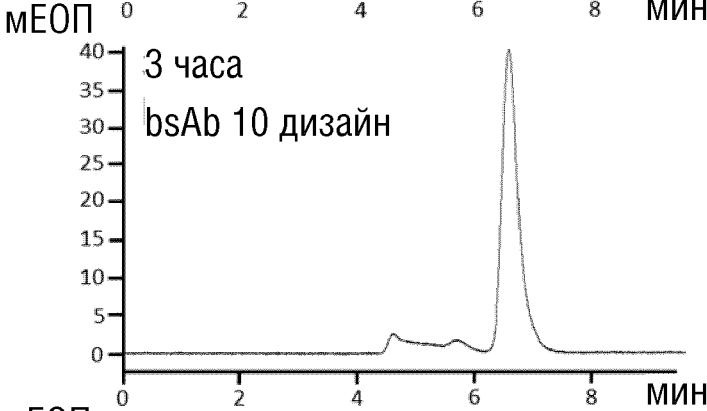
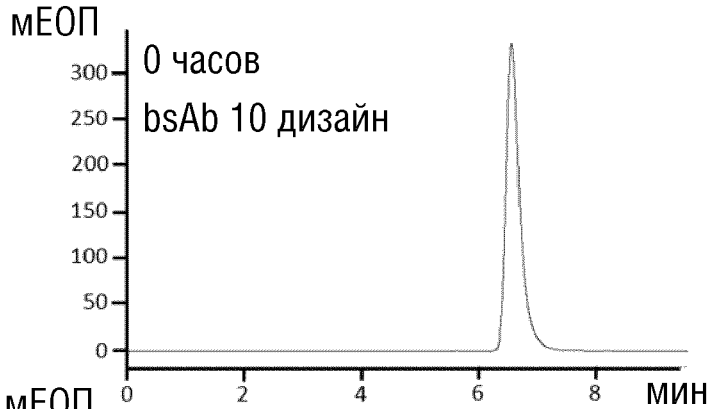
Время	% НМВ	% ММВ	% ЛМВ
0 часов	0.15	99.73	0.12
1 час	12.06	87.94	0
3 часа	15.55	84.45	0
5 часов	18.84	80.13	1.03
7 часов	20.51	79.49	0

ФИГ.6Е



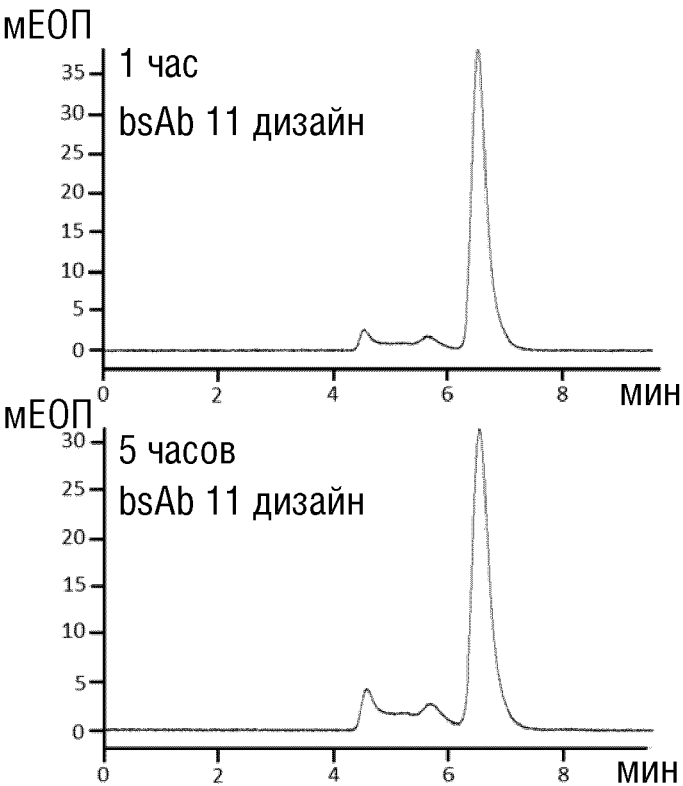
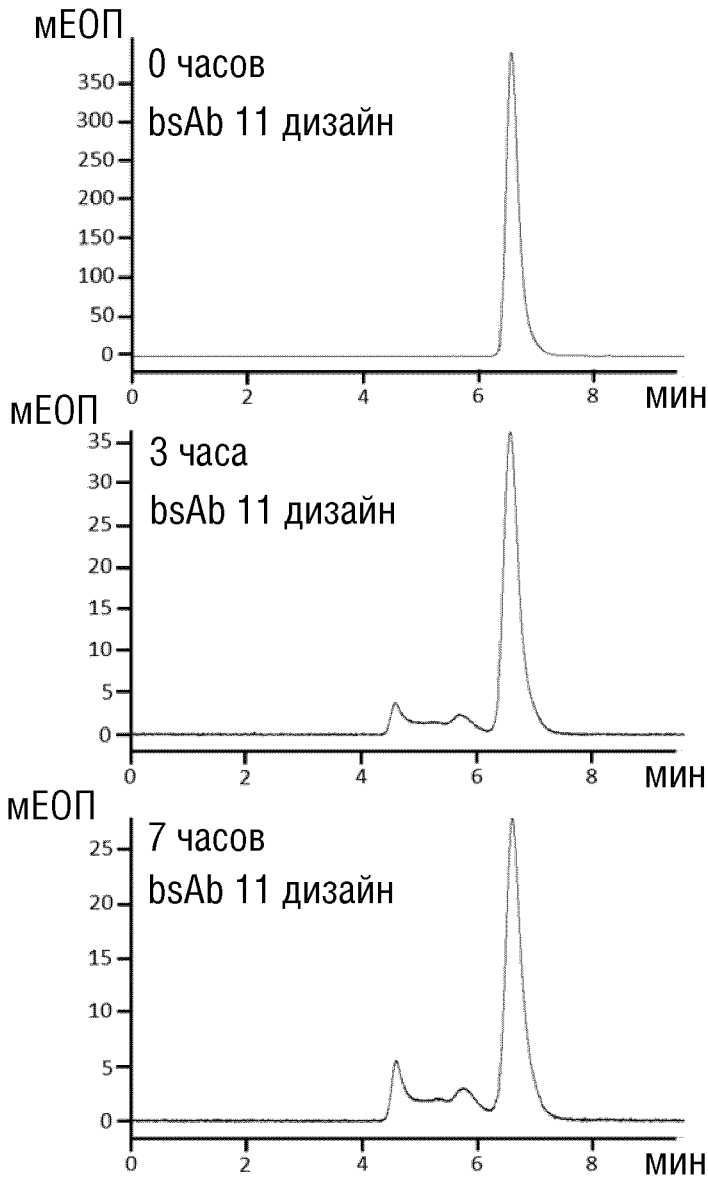
Время	% HMW	% MMW	% LMW
0 часов	0.10	99.90	0
1 час	10.41	89.59	0
3 часа	12.39	87.61	0
5 часов	22.26	77.74	0
7 часов	23.02	76.98	0

ФИГ.6F



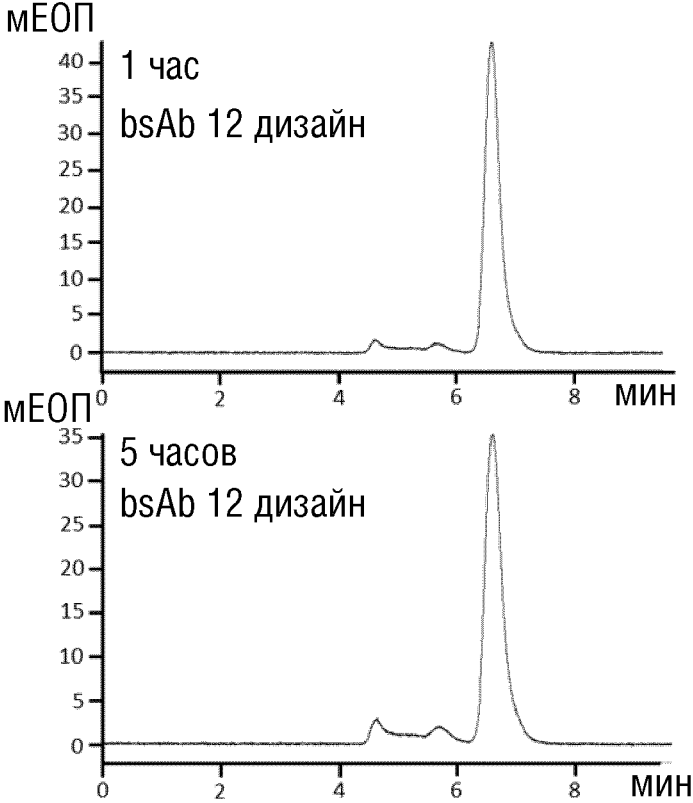
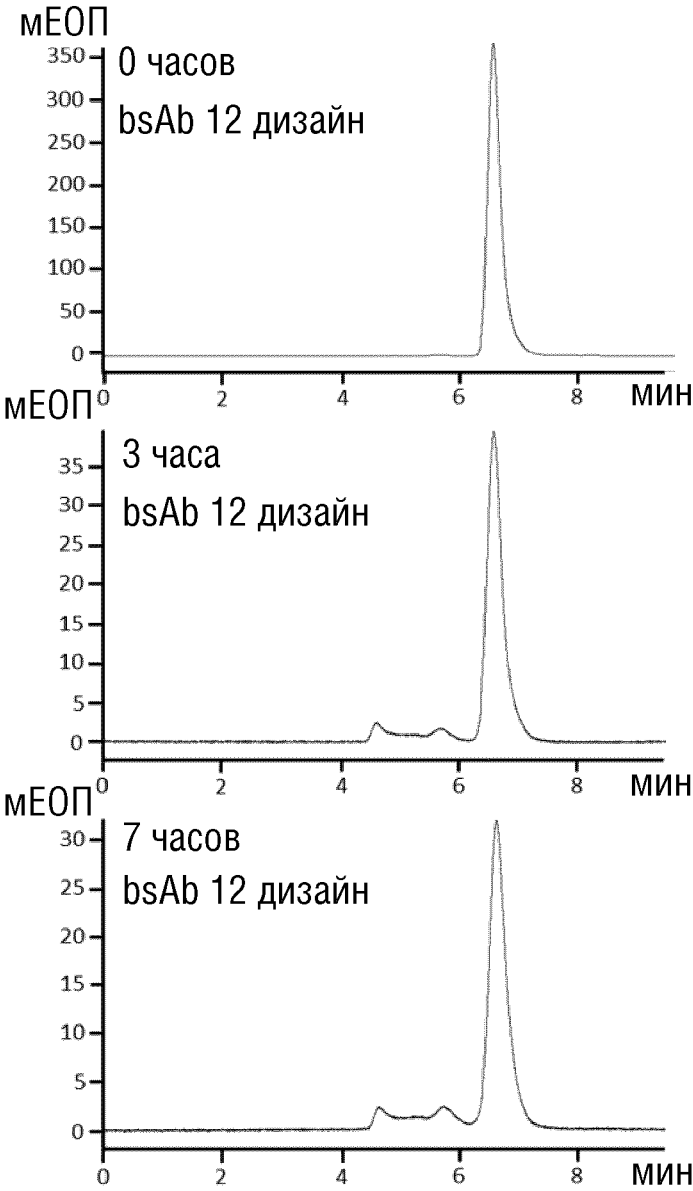
Время	% НМВ	% ММВ	% ЛМВ
0 часов	0	100	0
1 час	11.43	88.57	0
3 часа	15.48	84.52	0
5 часов	19.38	80.62	0
7 часов	19.94	80.06	0

ФИГ.6G



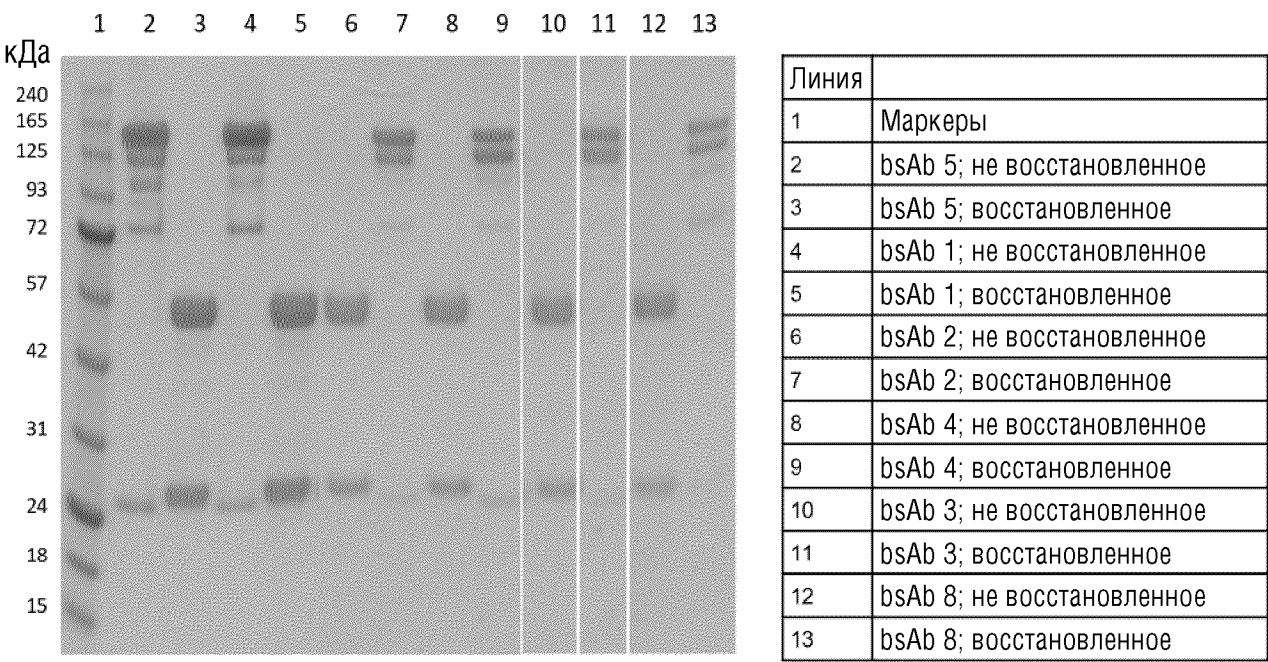
Время	% HMW	% MMW	% LMW
0 часов	0.09	99.91	0
1 час	14.73	85.27	0
3 часа	20.19	79.81	0
5 часов	24.84	75.16	0
7 часов	30.46	69.54	0

ФИГ.6Н

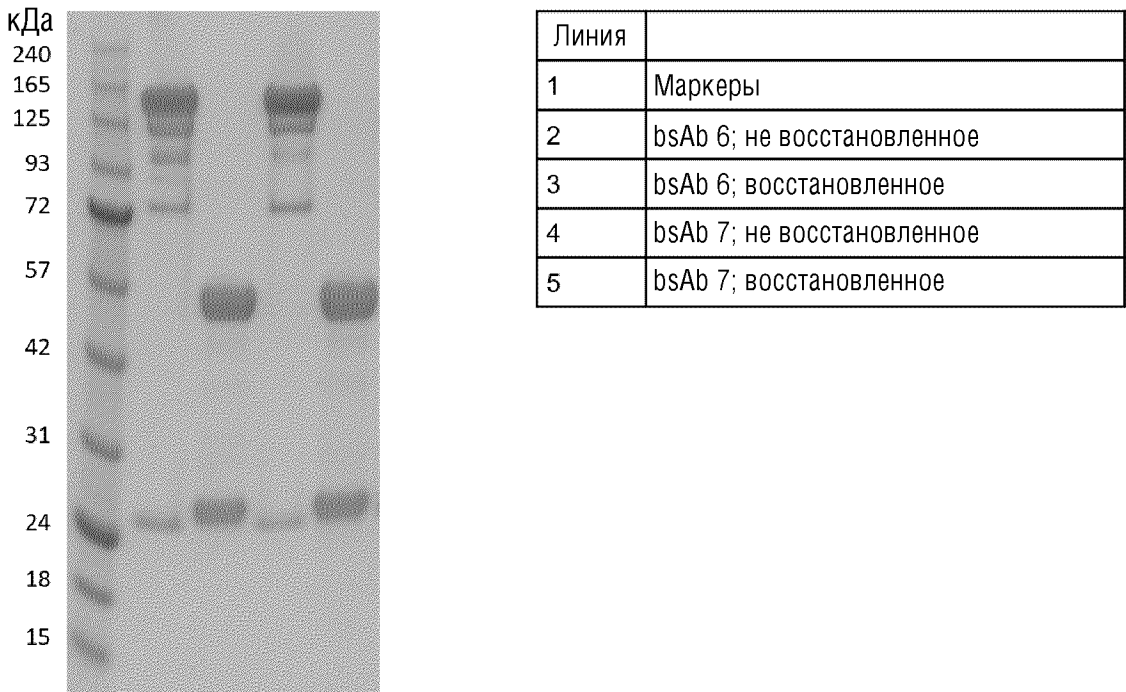


Время	% НМВ	% ММВ	% ЛМВ
0 часов	0.10	99.78	0.12
1 час	9.96	90.04	0
3 часа	13.39	86.61	0
5 часов	15.78	84.22	0
7 часов	18.77	81.23	0

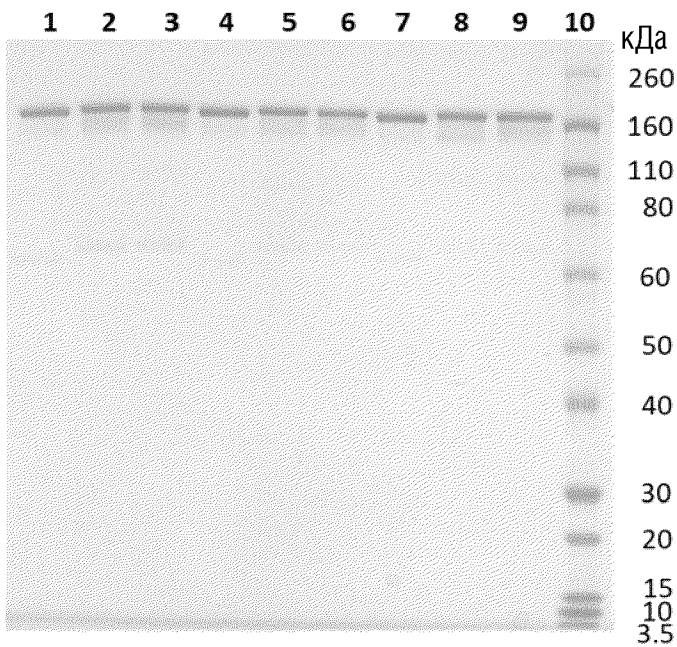
ФИГ.7А



ФИГ.7В

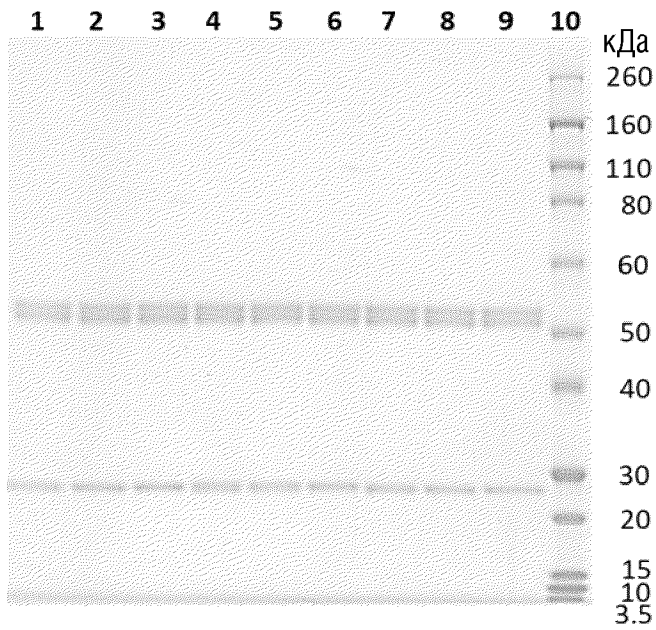


ФИГ.7С



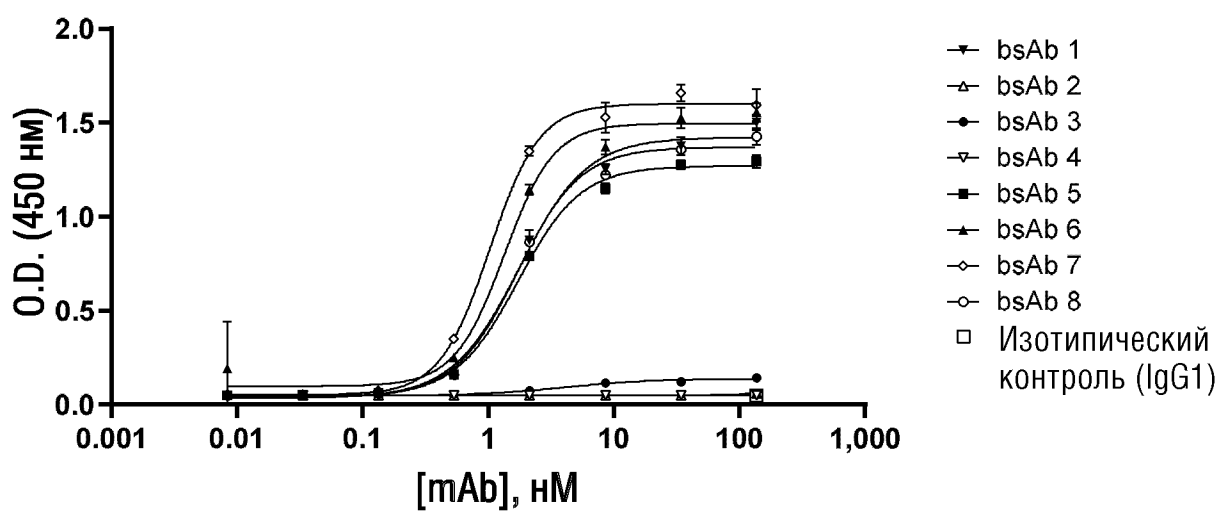
Линия	
1	bsAb 5b (E/K)
2	bsAb 10 (E/K)
3	bsAb 12 (E/K)
4	bsAb 5b (K/E)
5	bsAb 10 (K/E)
6	bsAb 12 (K/E)
7	bsAb 5b
8	bsAb 10
9	bsAb 12
10	Маркеры

ФИГ.7D

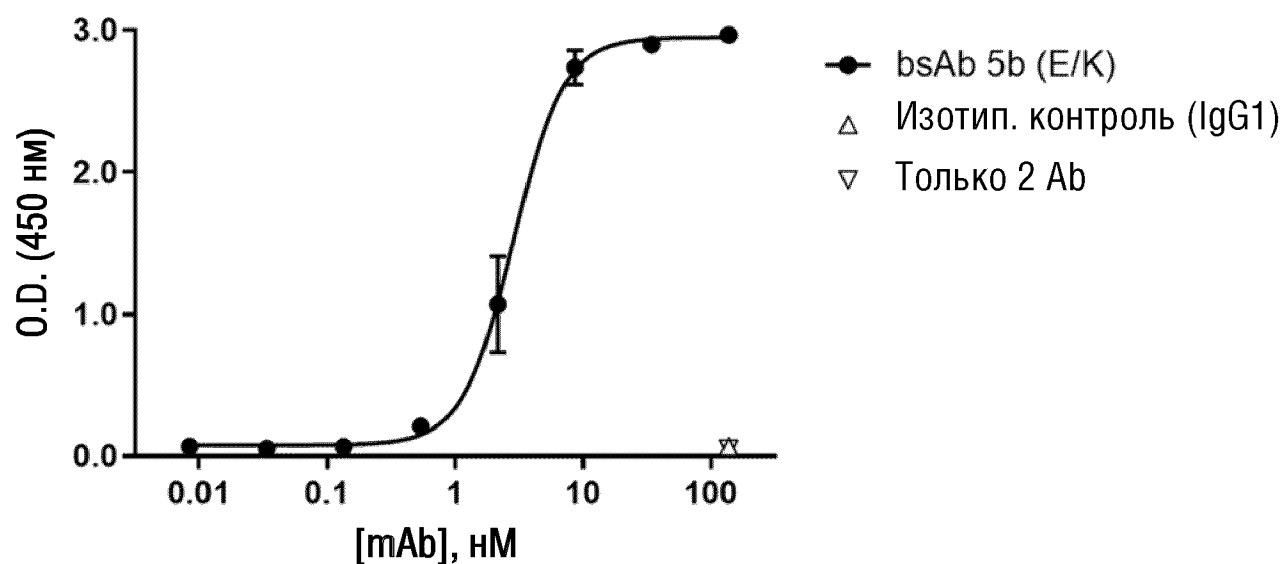


Линия	
1	bsAb 5b (E/K)
2	bsAb 10 (E/K)
3	bsAb 12 (E/K)
4	bsAb 5b (K/E)
5	bsAb 10 (K/E)
6	bsAb 12 (K/E)
7	bsAb 5b
8	bsAb 10
9	bsAb 12
10	Маркеры

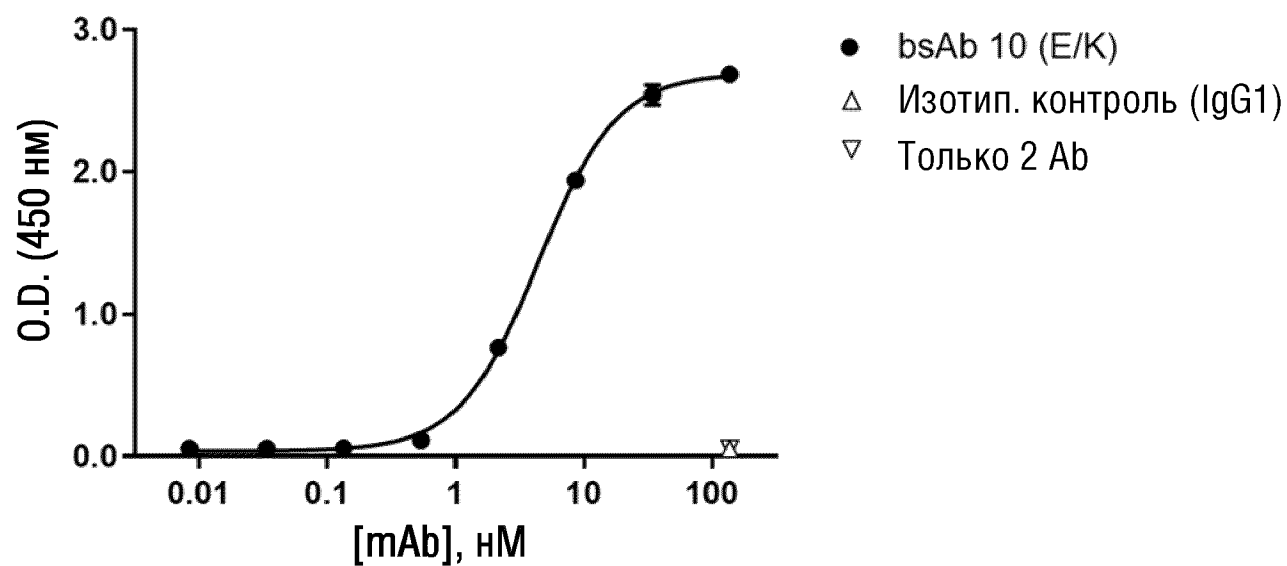
ФИГ.8А



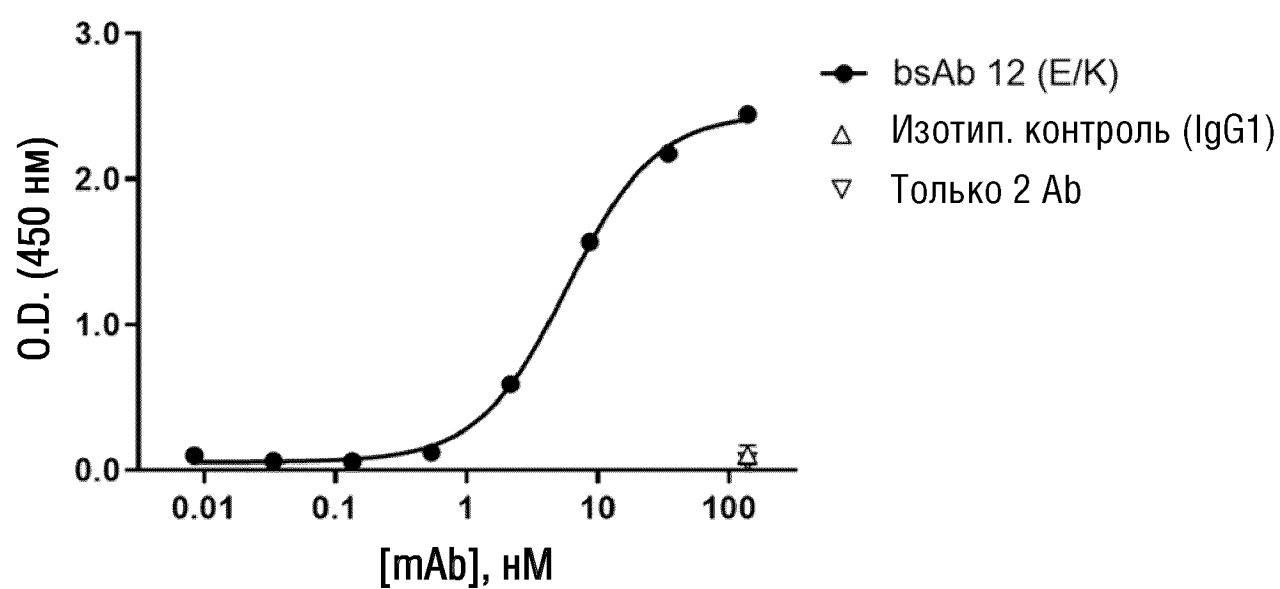
ФИГ.8В



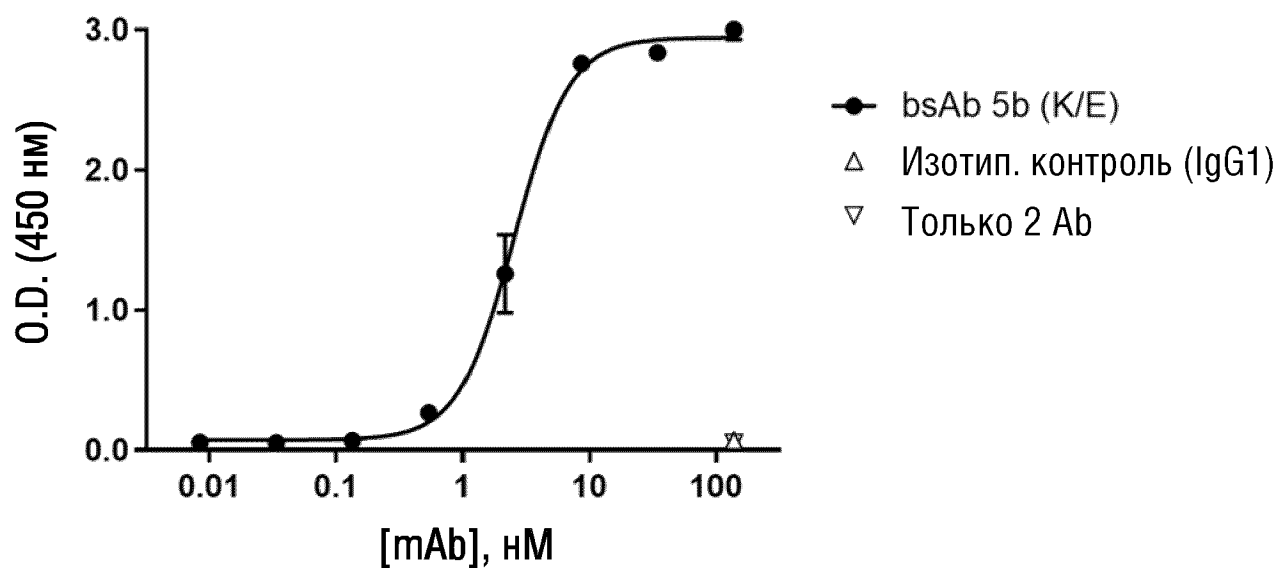
ФИГ.8С



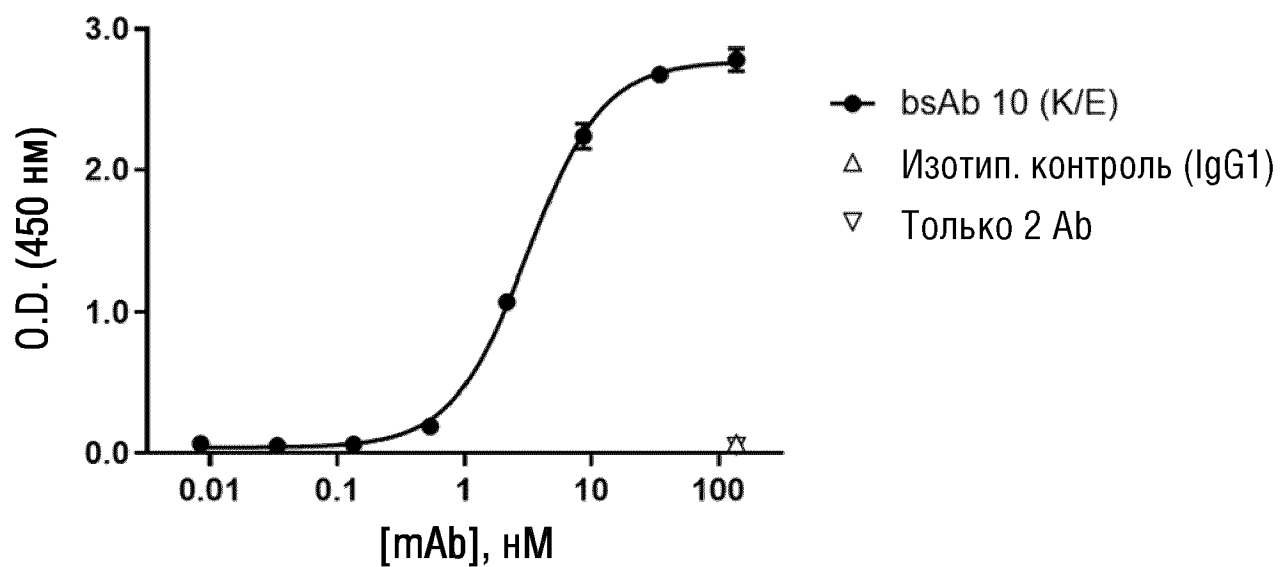
ФИГ.8D



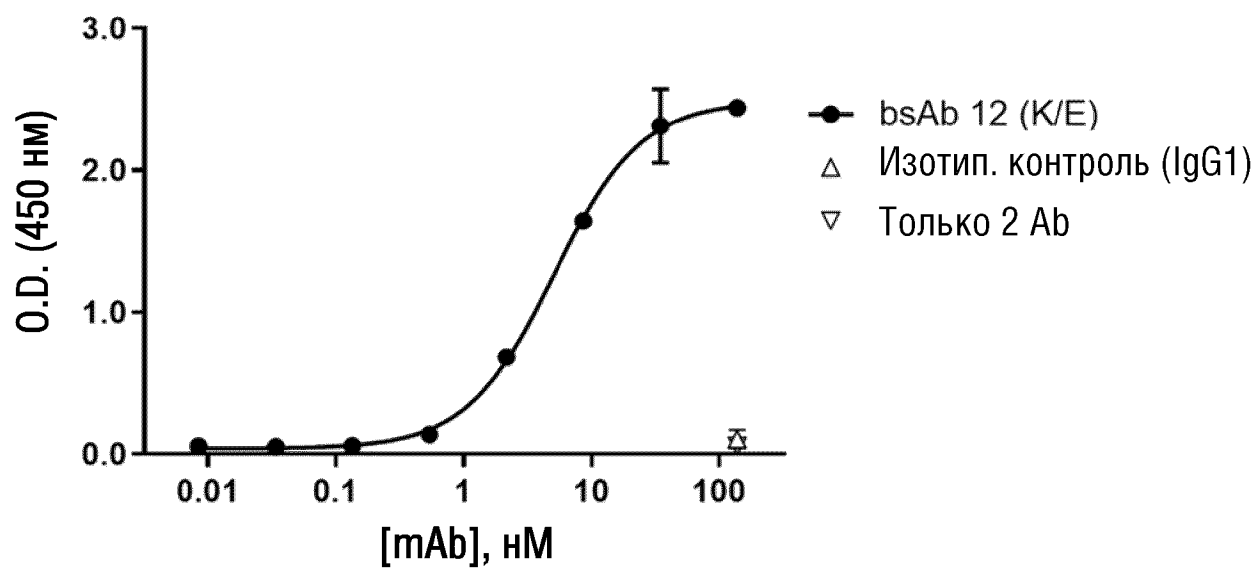
ФИГ.8Е



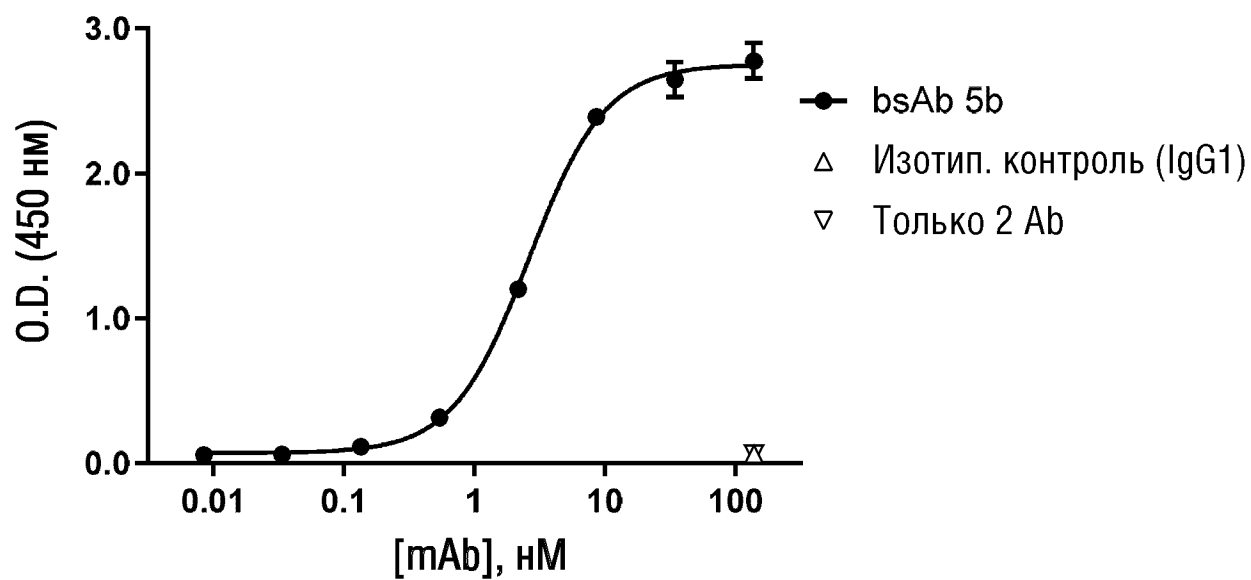
ФИГ.8F



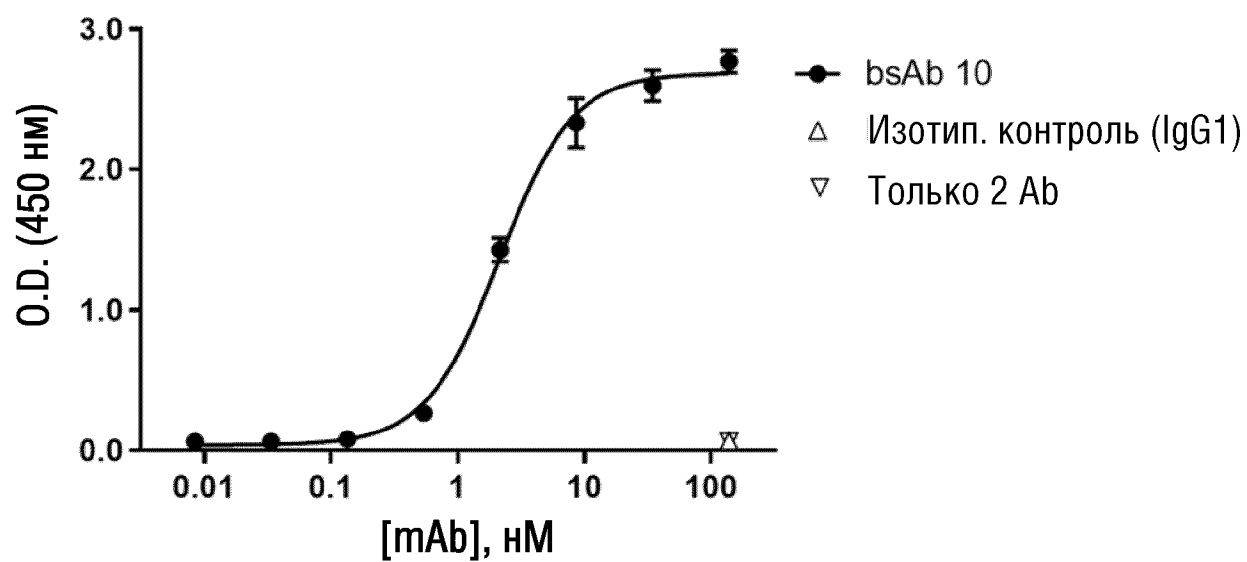
ФИГ.8G



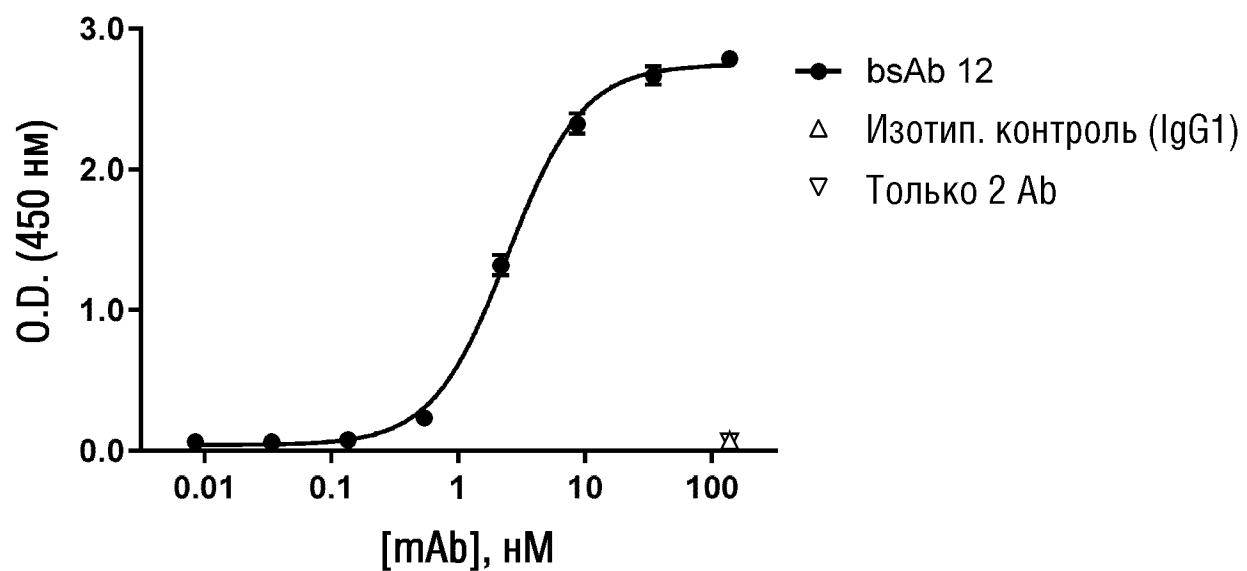
ФИГ.8H



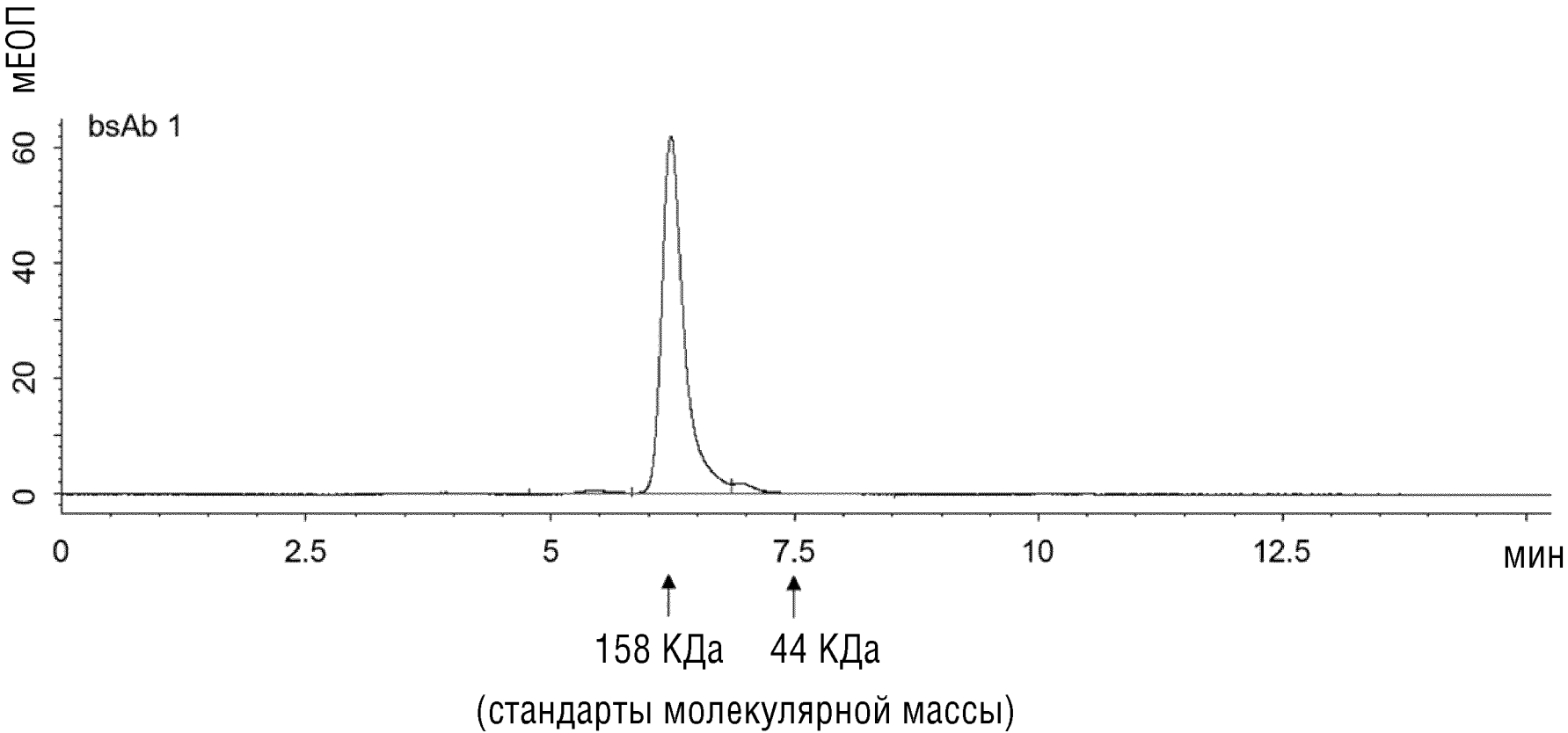
ФИГ.8I



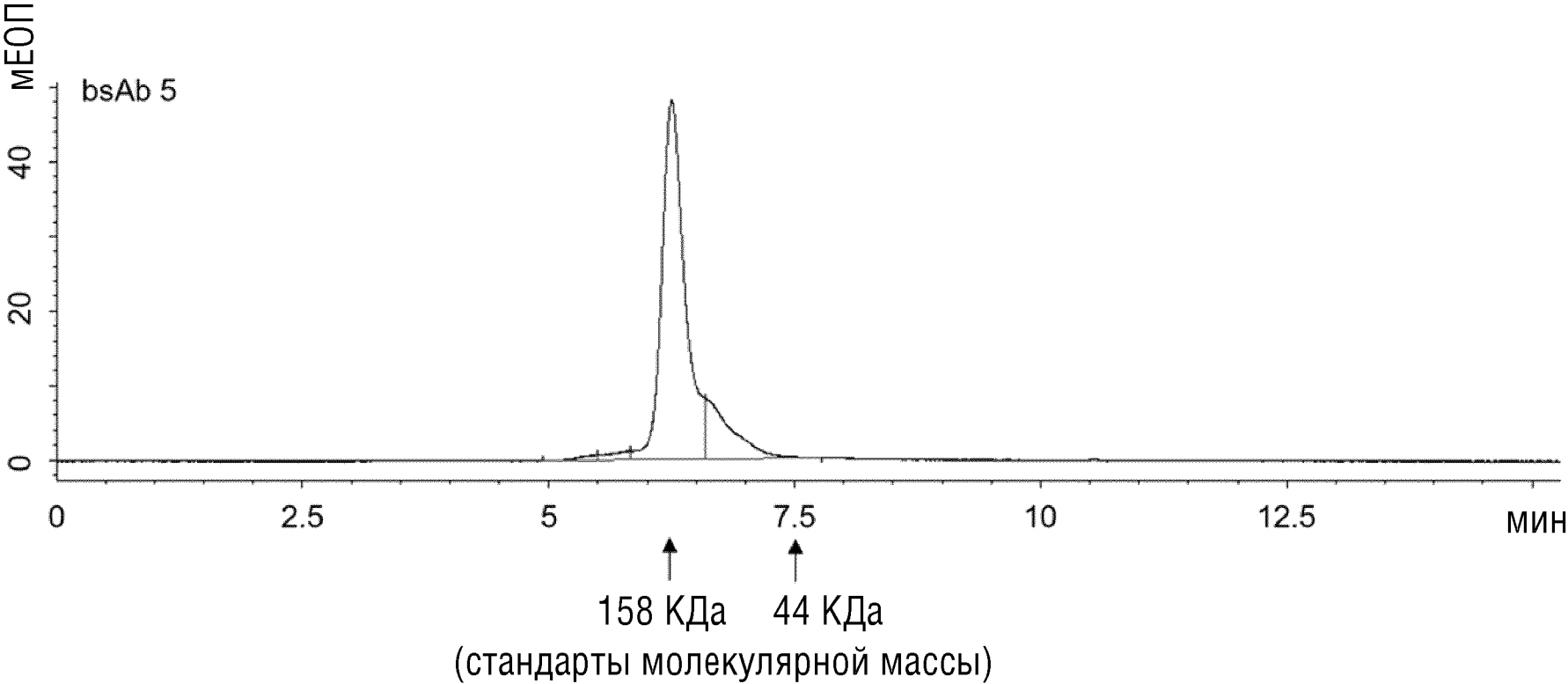
ФИГ.8J



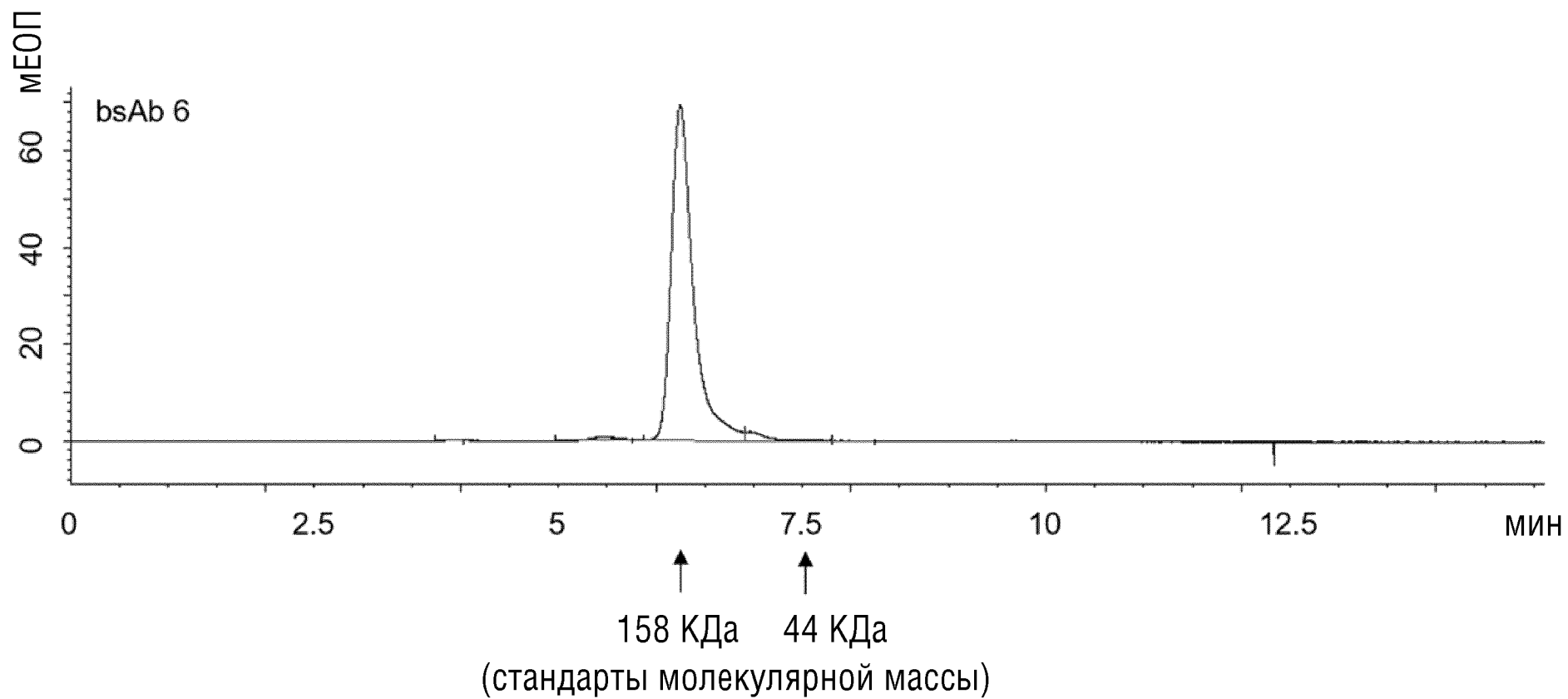
ФИГ.9А



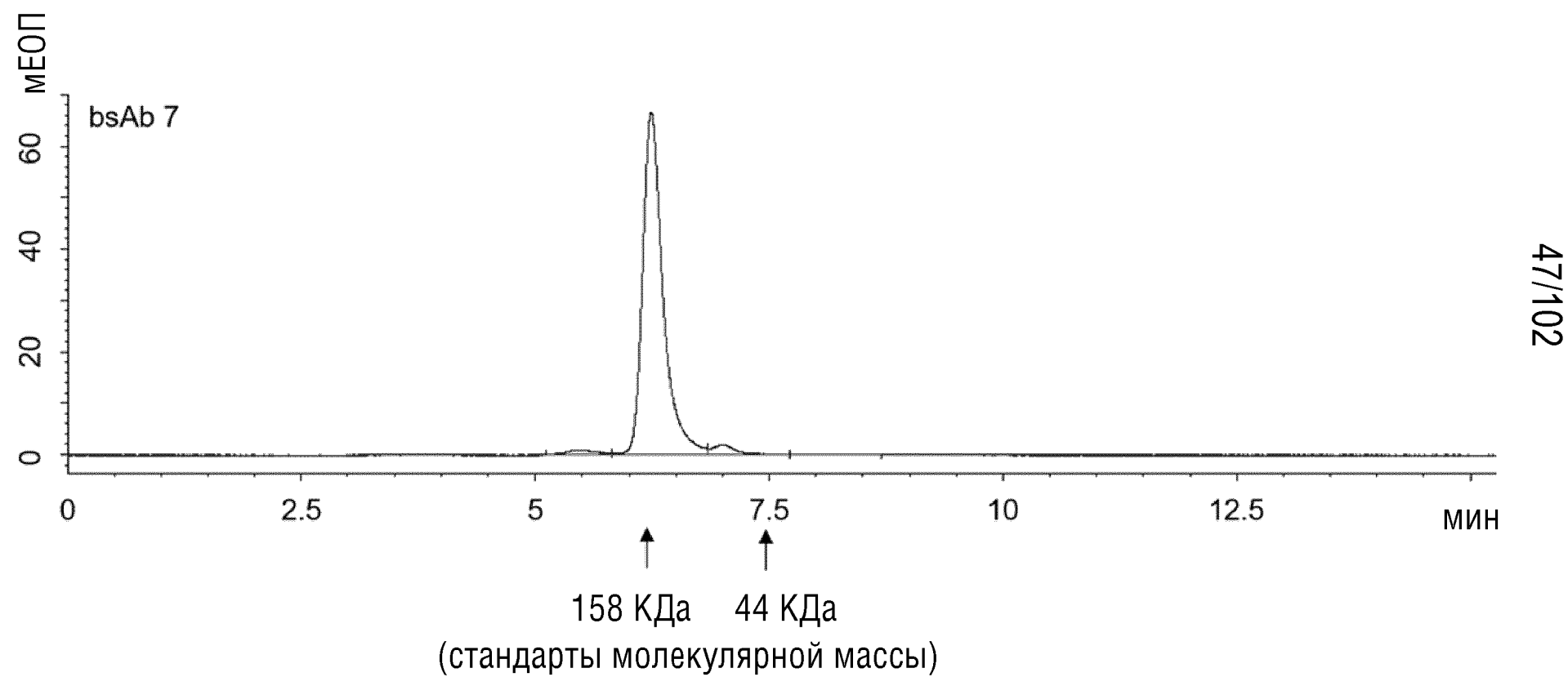
ФИГ.9В



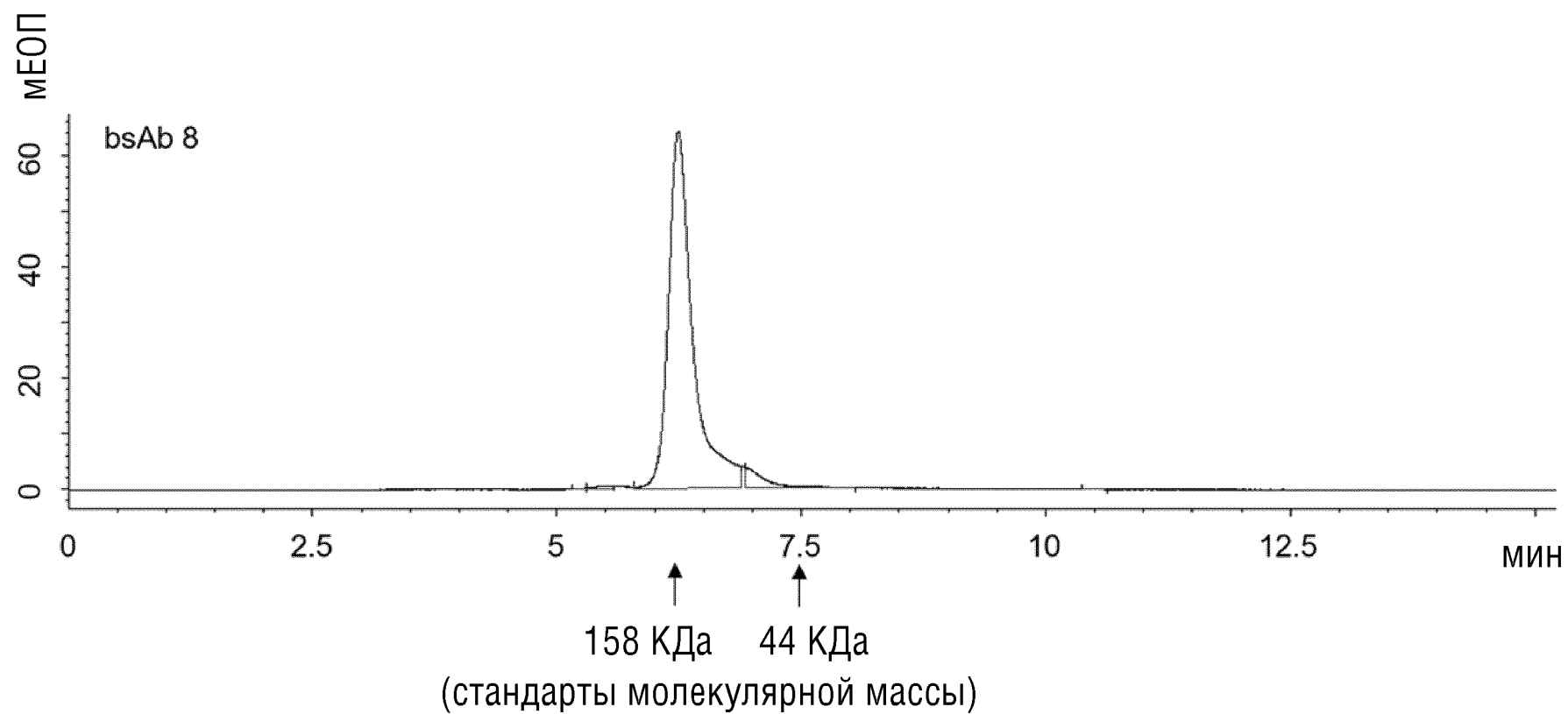
ФИГ.9С



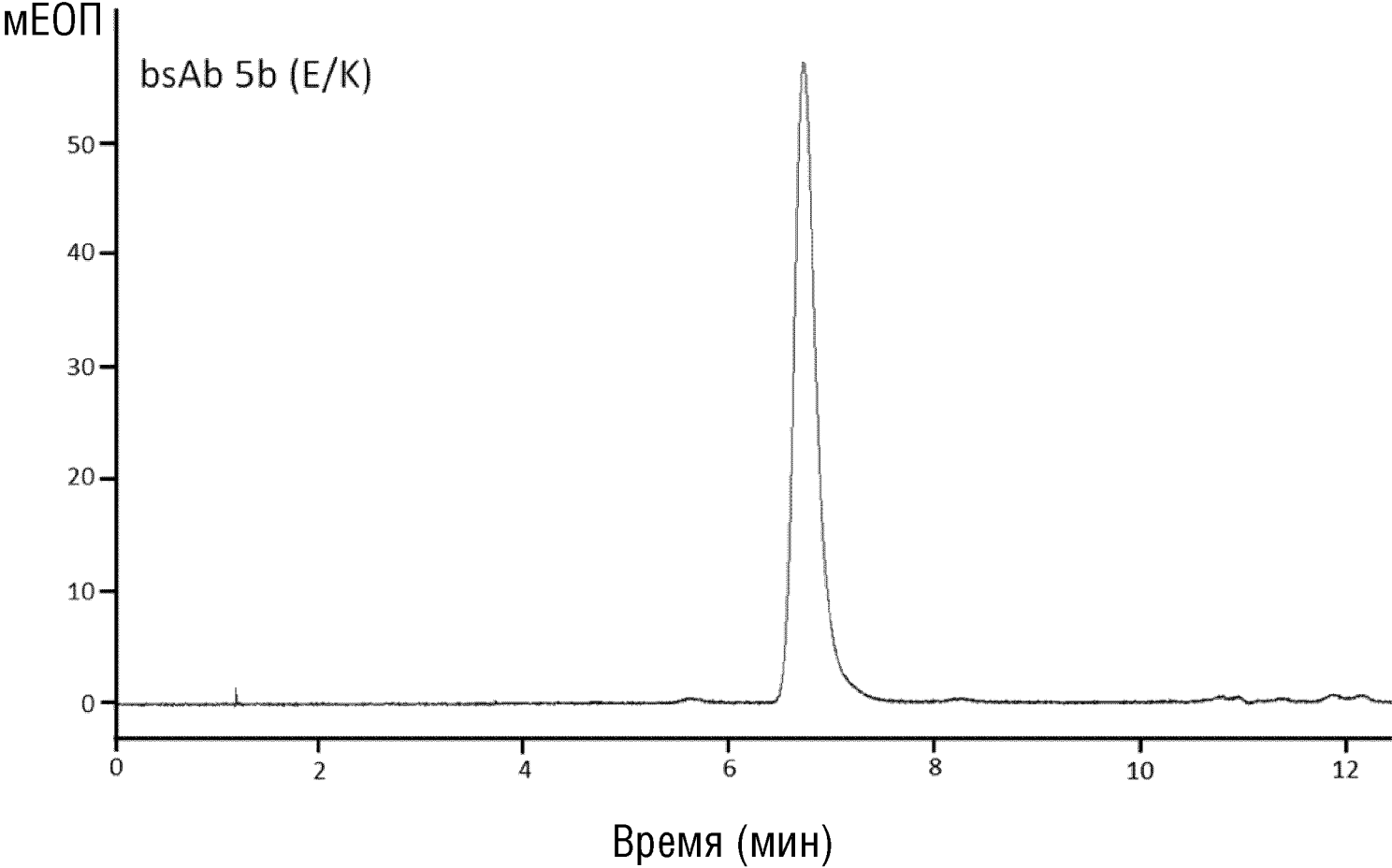
ФИГ.9D



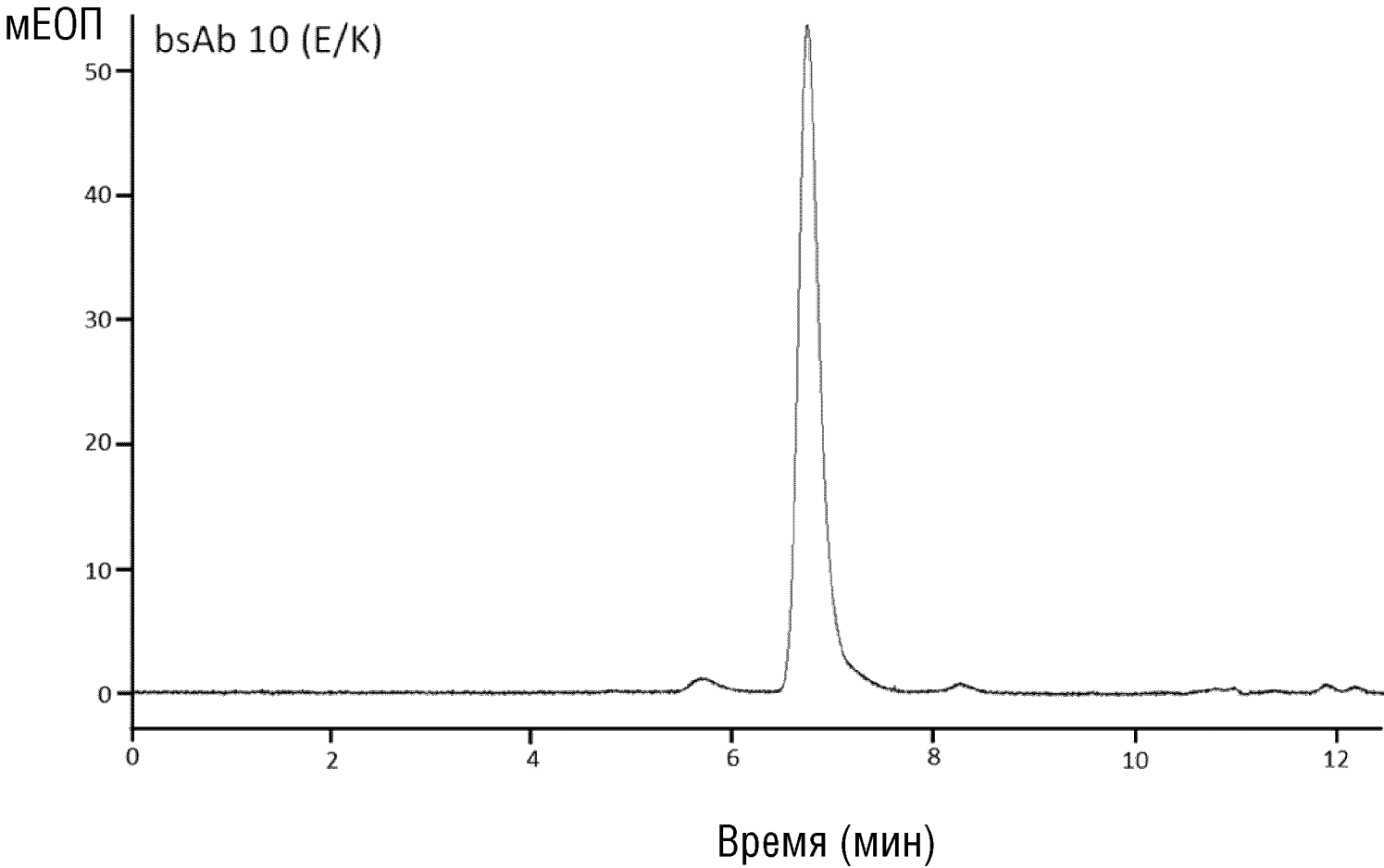
ФИГ.9Е



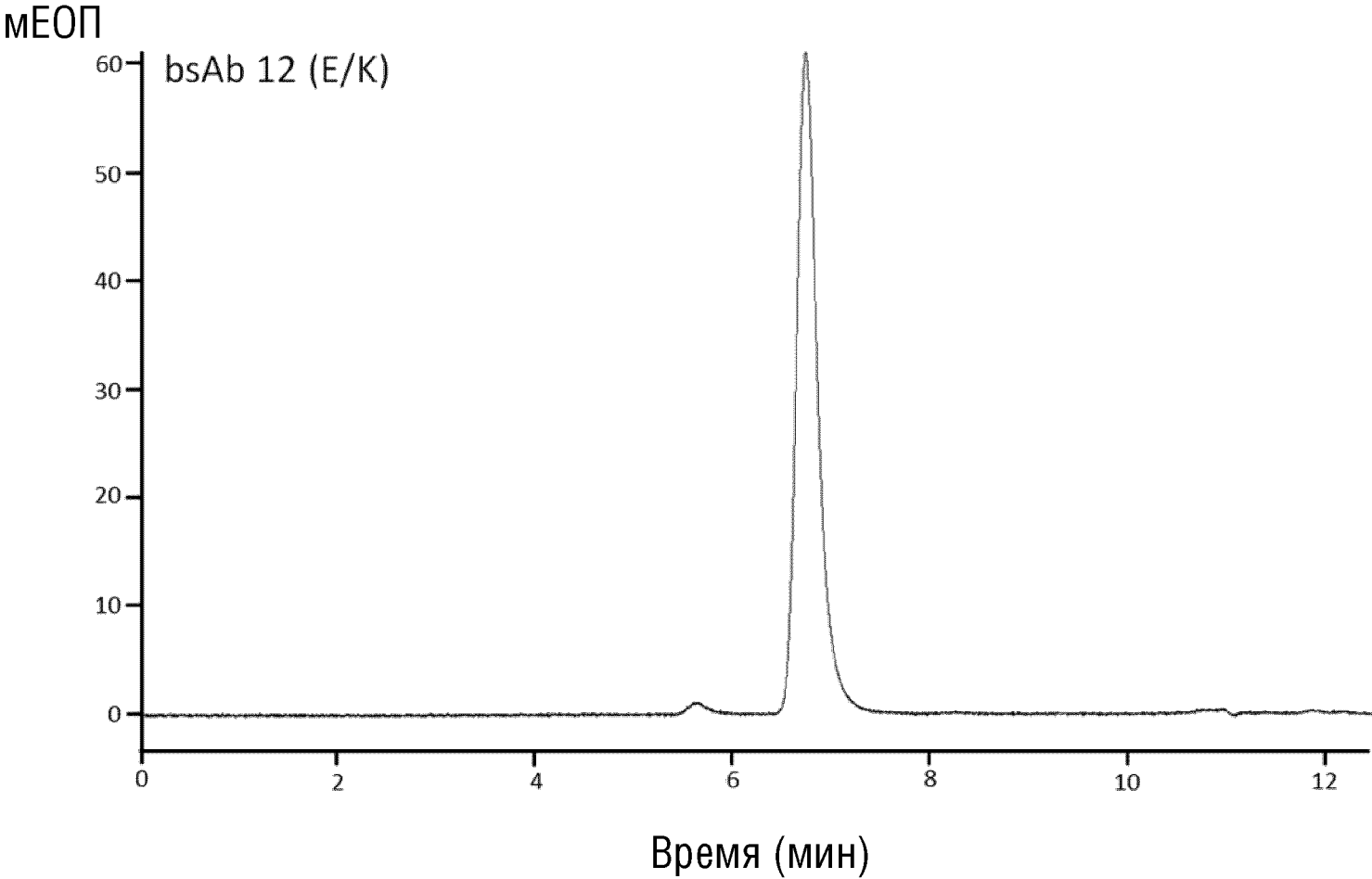
ФИГ.9F



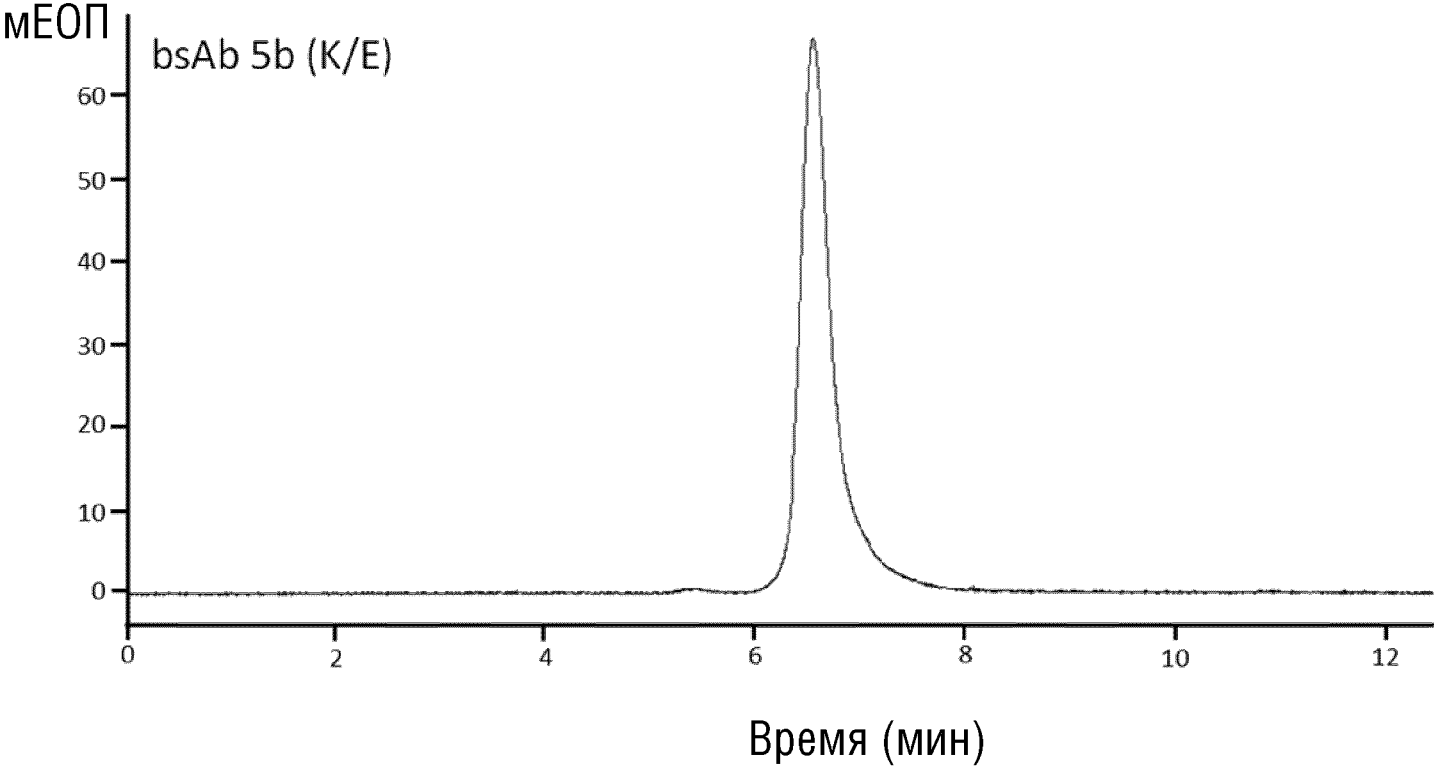
ФИГ.9G



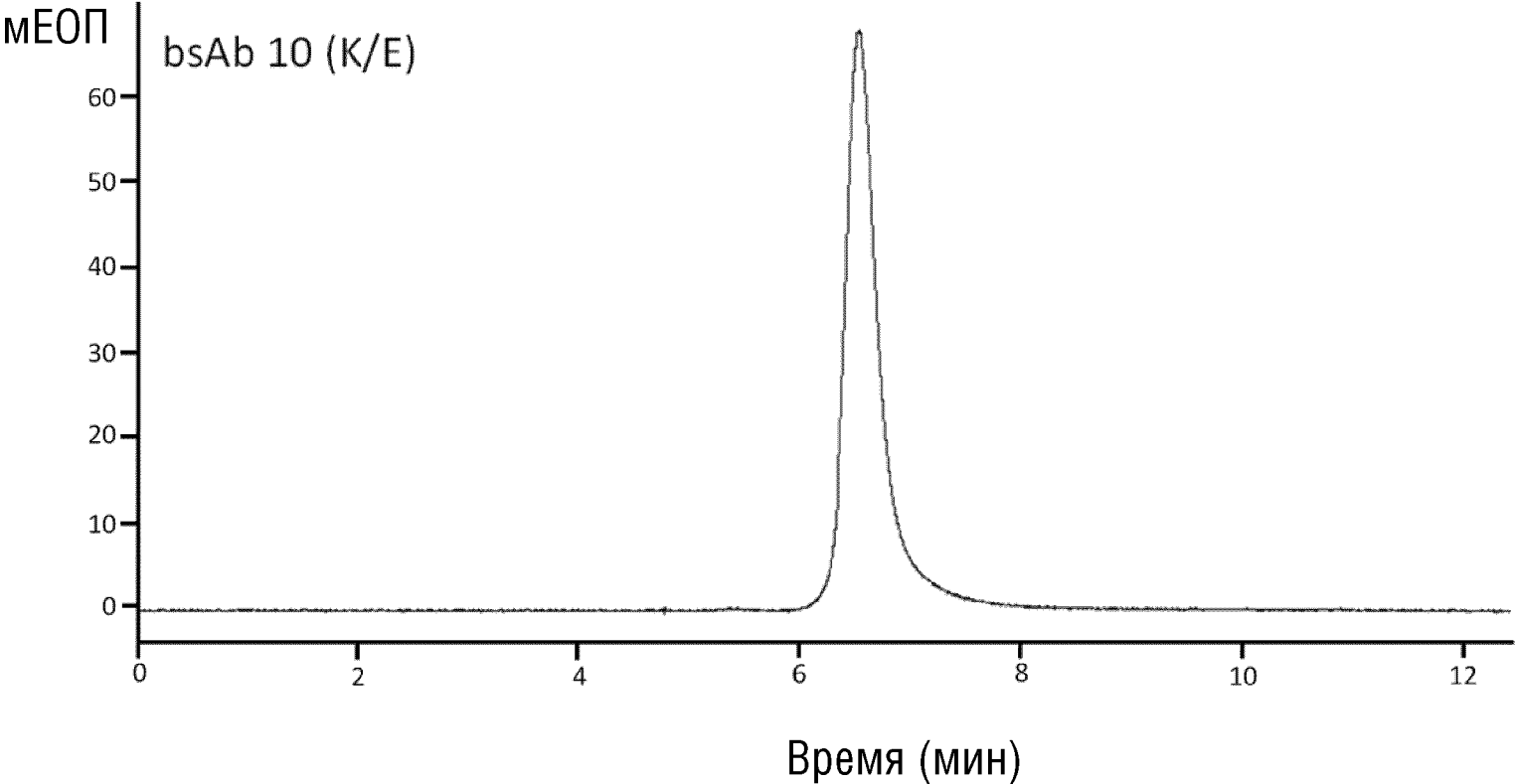
ФИГ.9Н



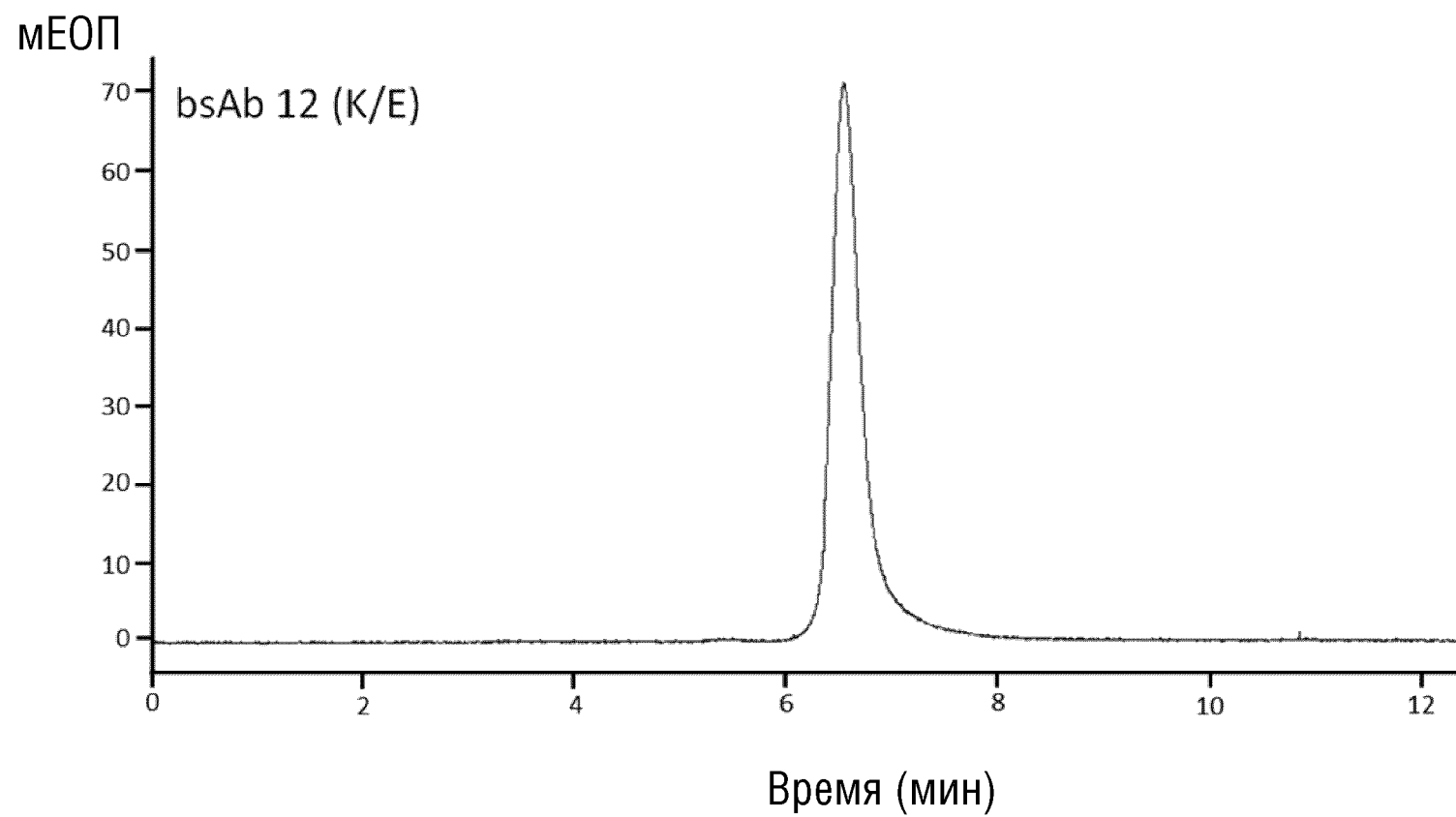
ФИГ.9I



ФИГ.9J

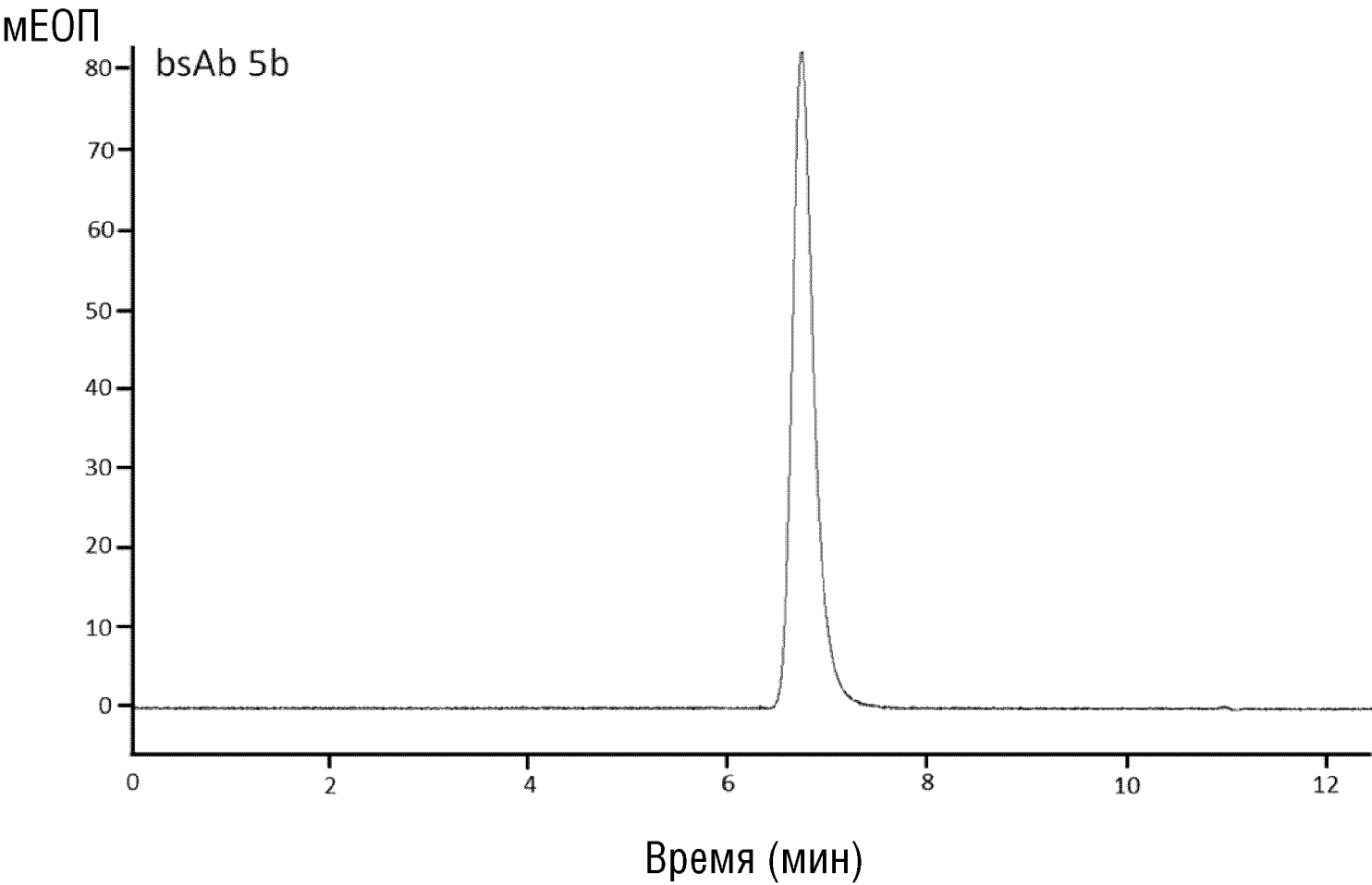


ФИГ.9К

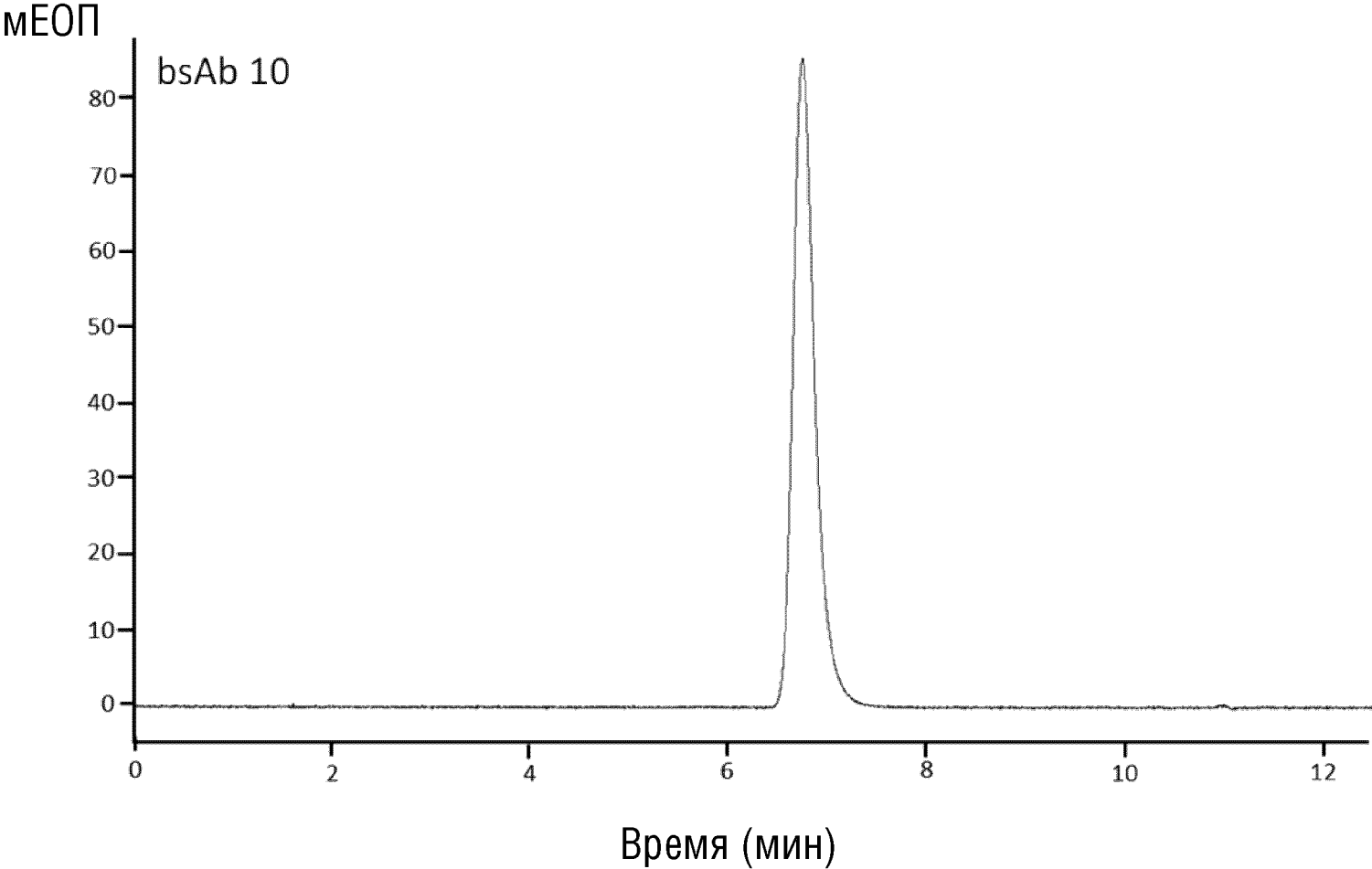


54/102

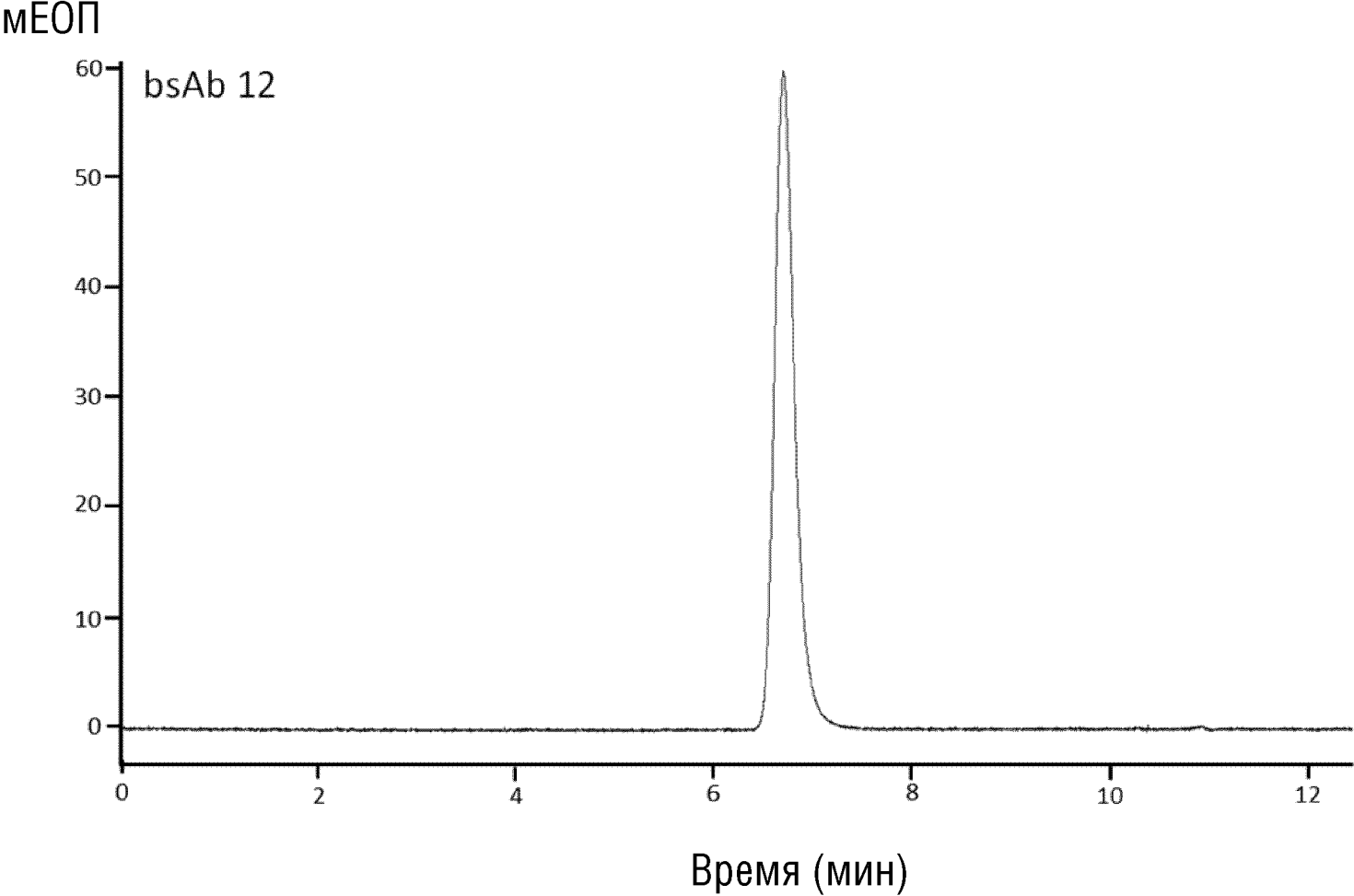
ФИГ.9L



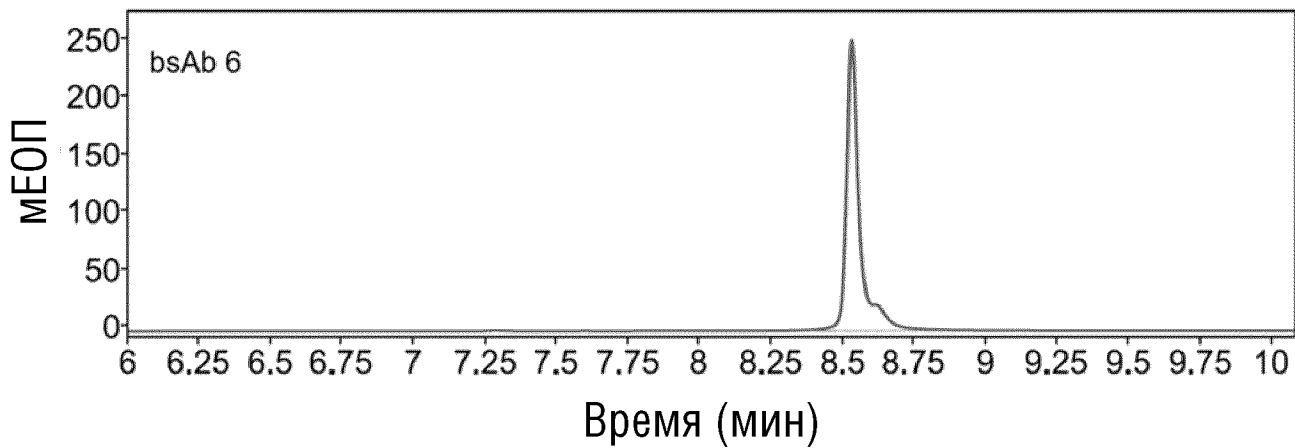
ФИГ.9М



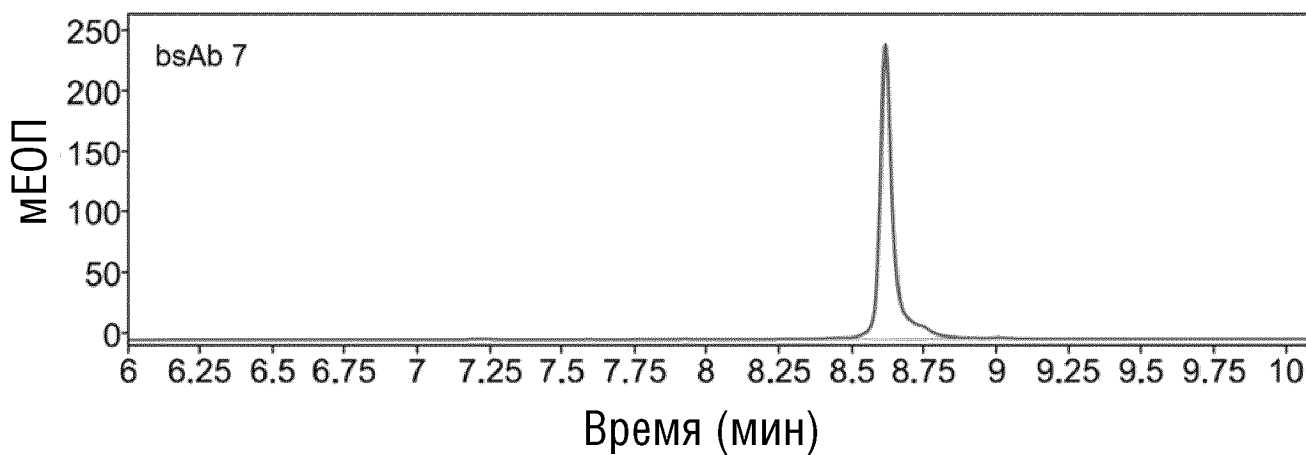
ФИГ.9N



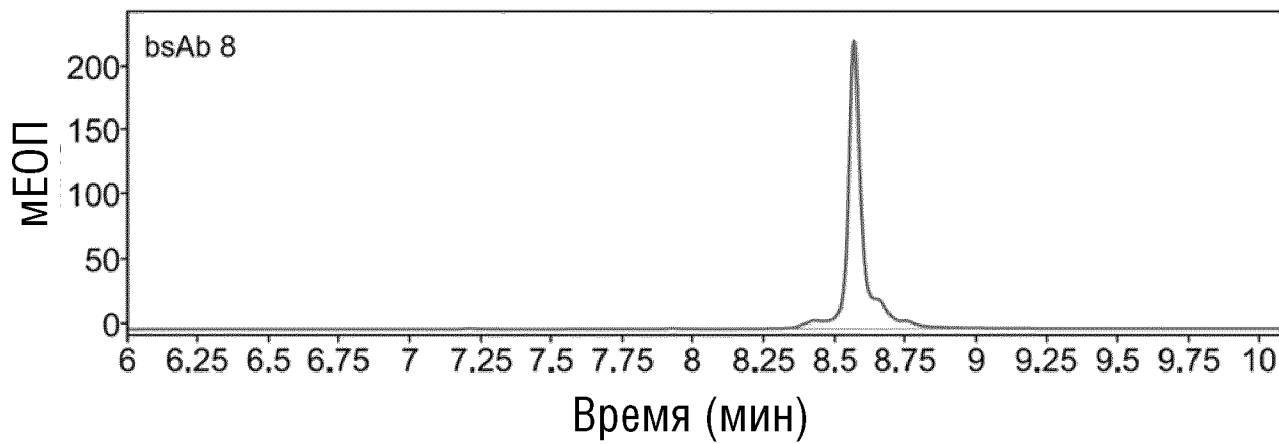
ФИГ.10А



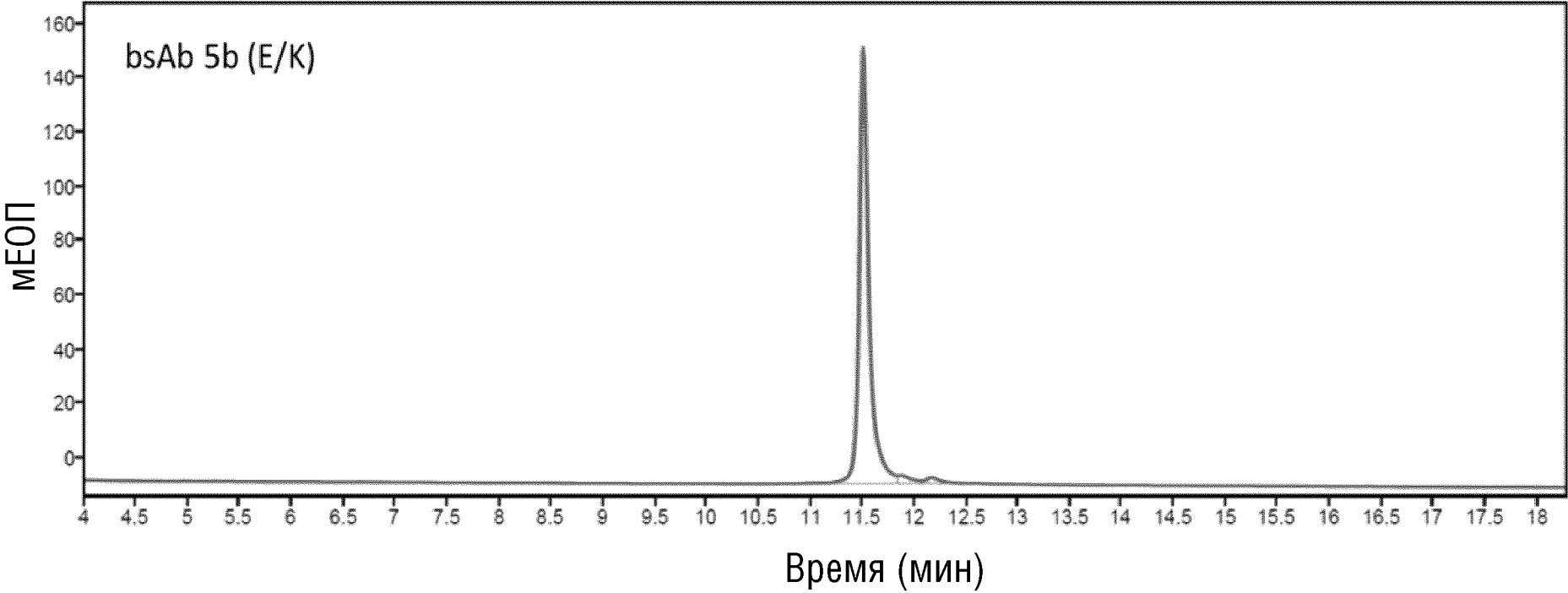
ФИГ.10В



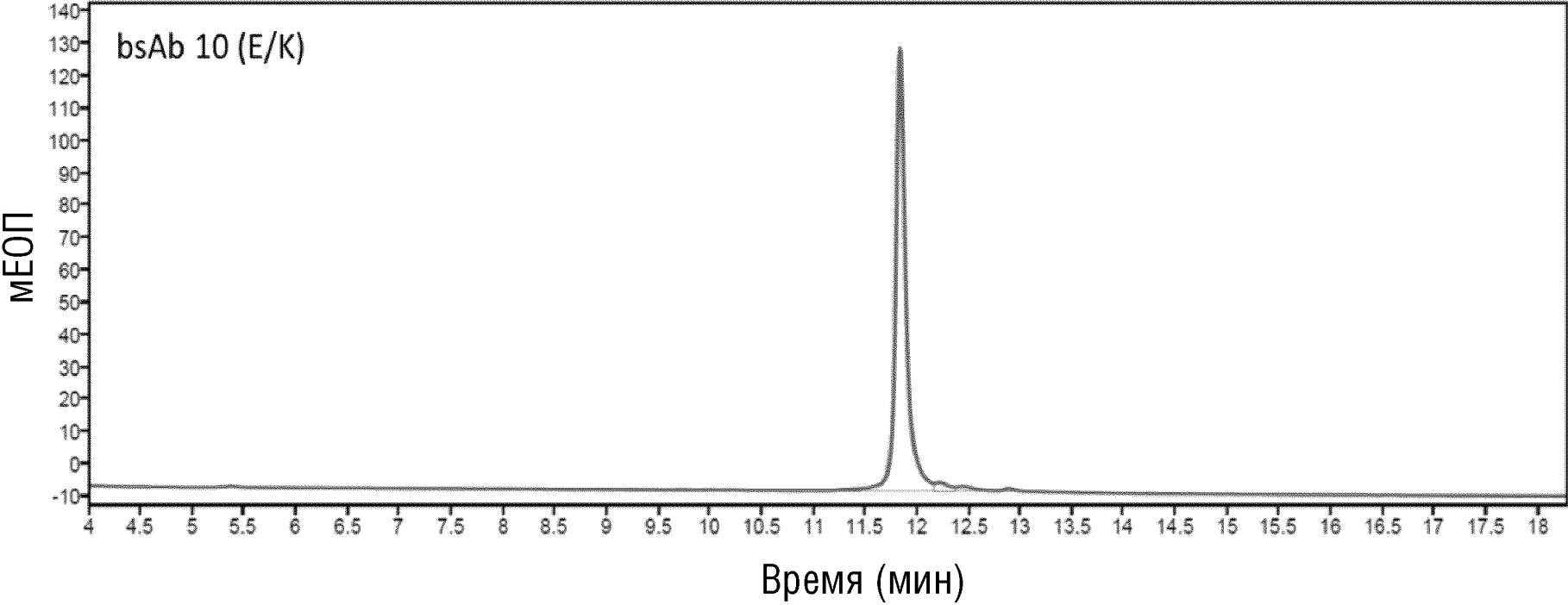
ФИГ.10С



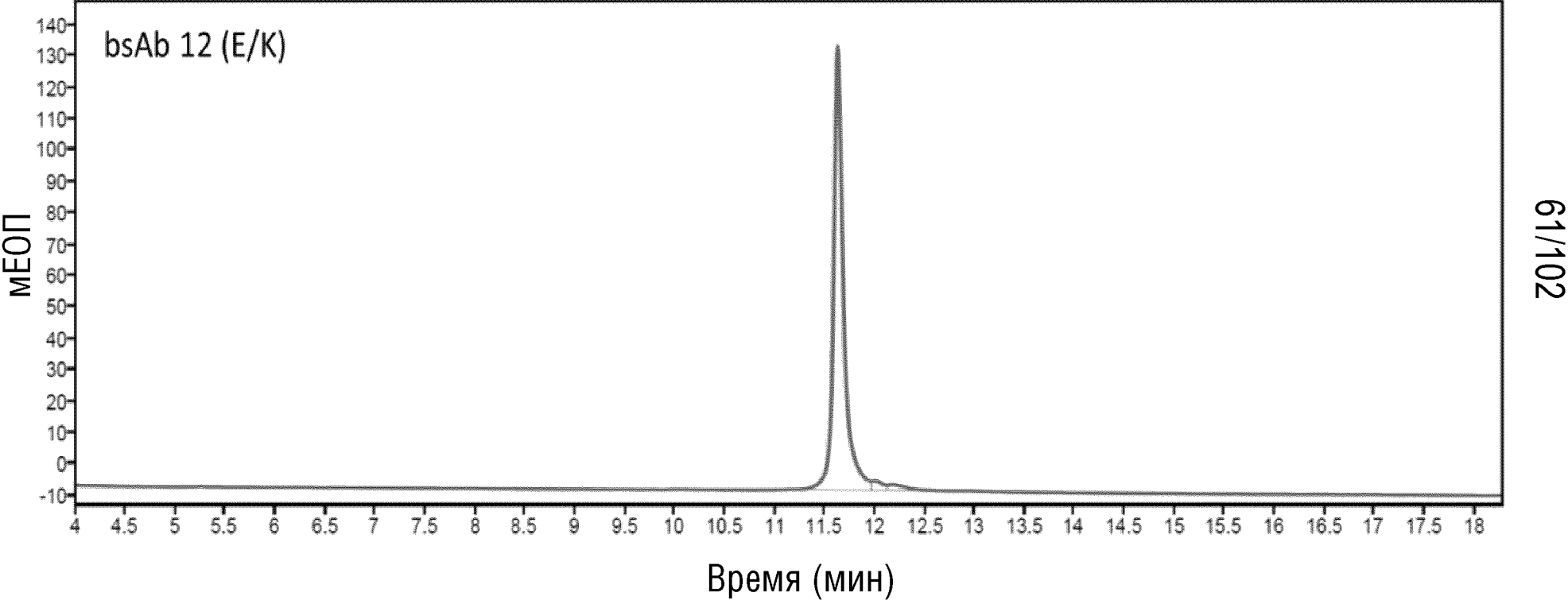
ФИГ.10D



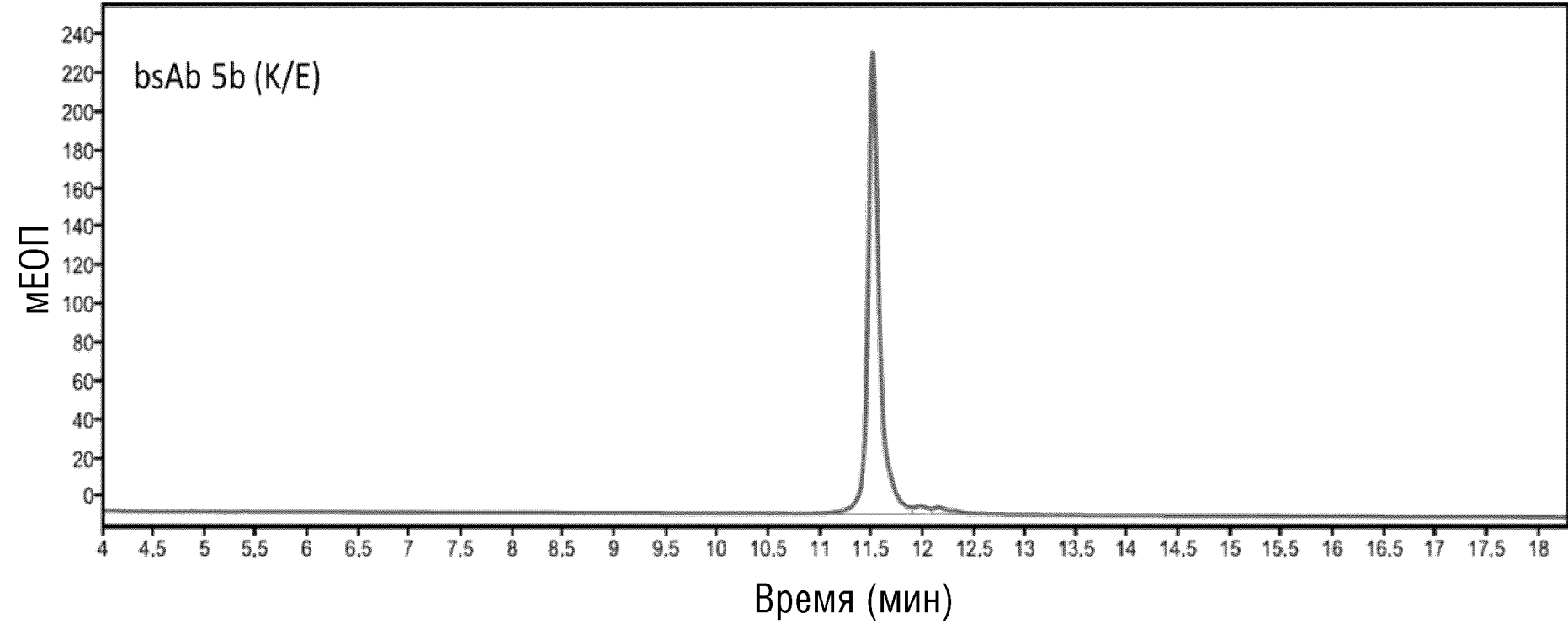
ФИГ.10Е



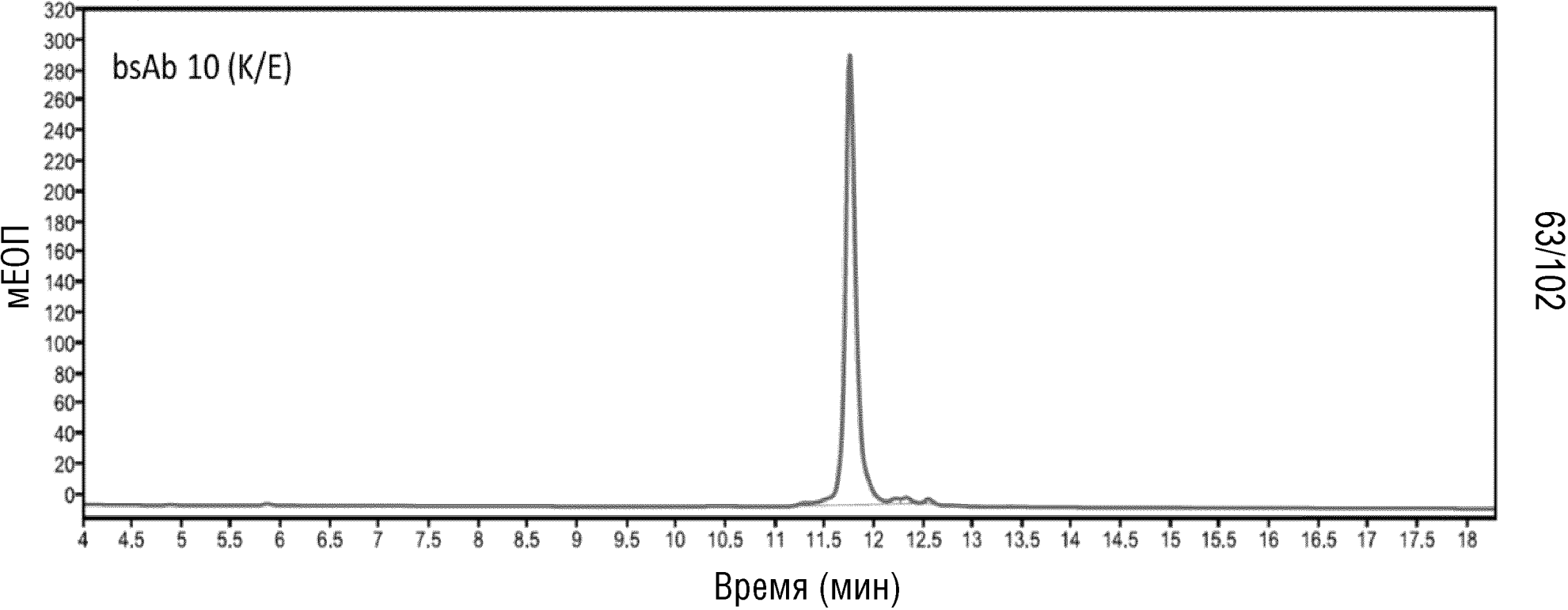
ФИГ.10F



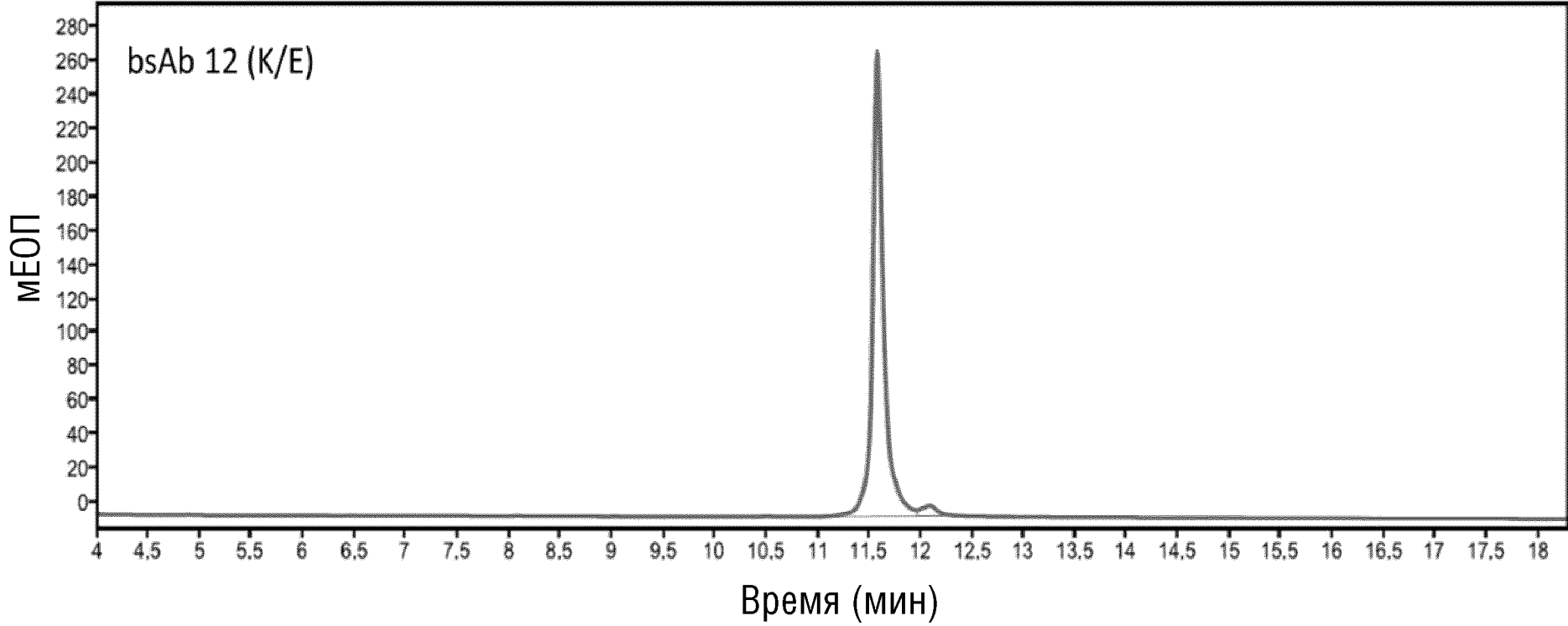
ФИГ.10G



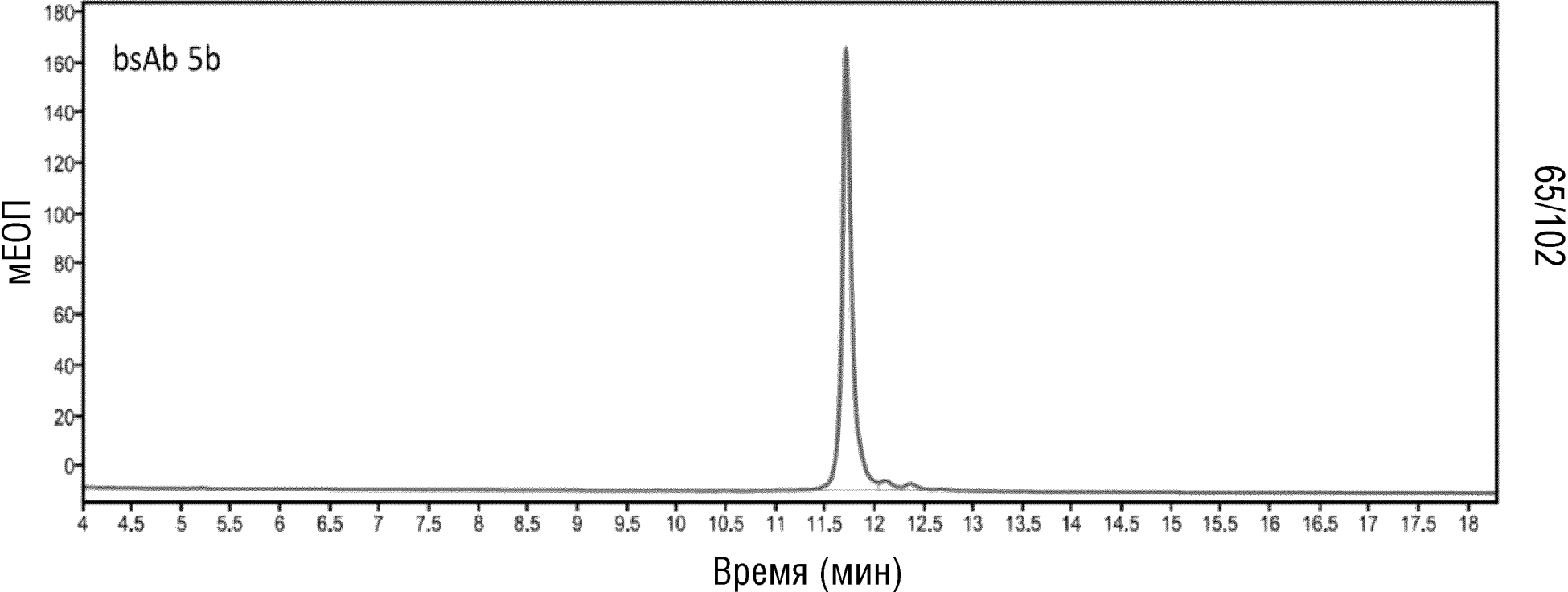
ФИГ.10Н



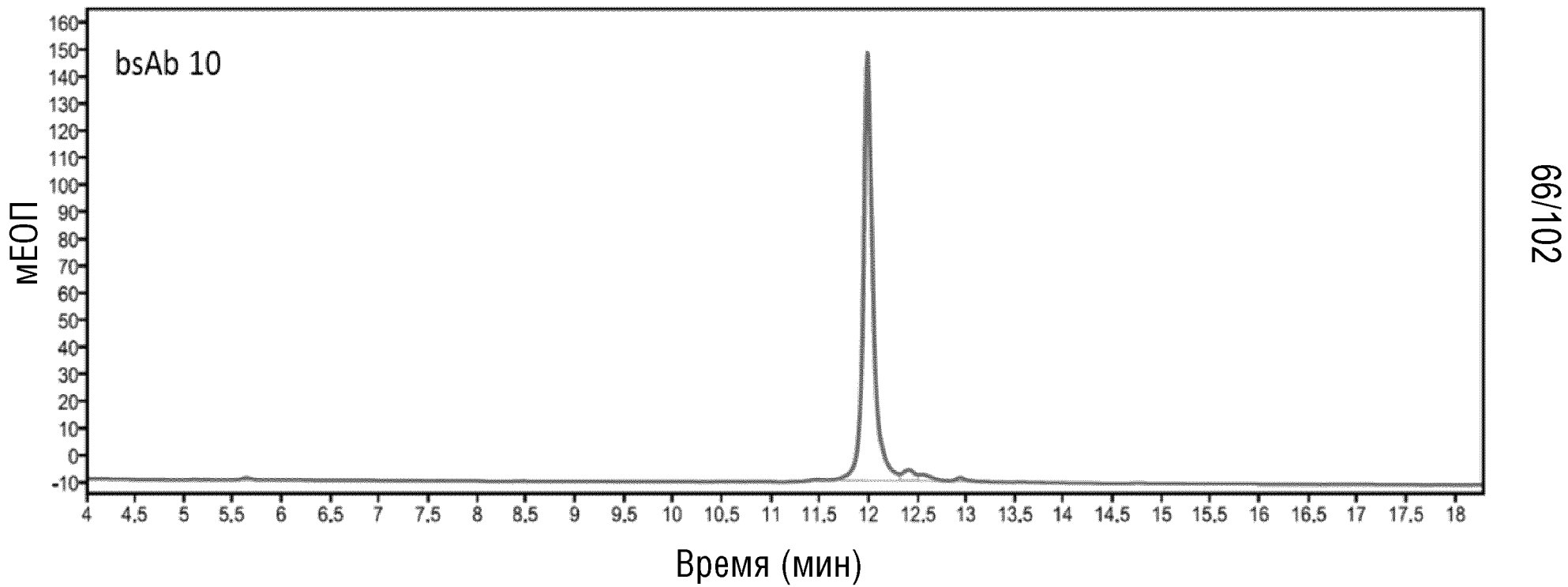
ФИГ.101



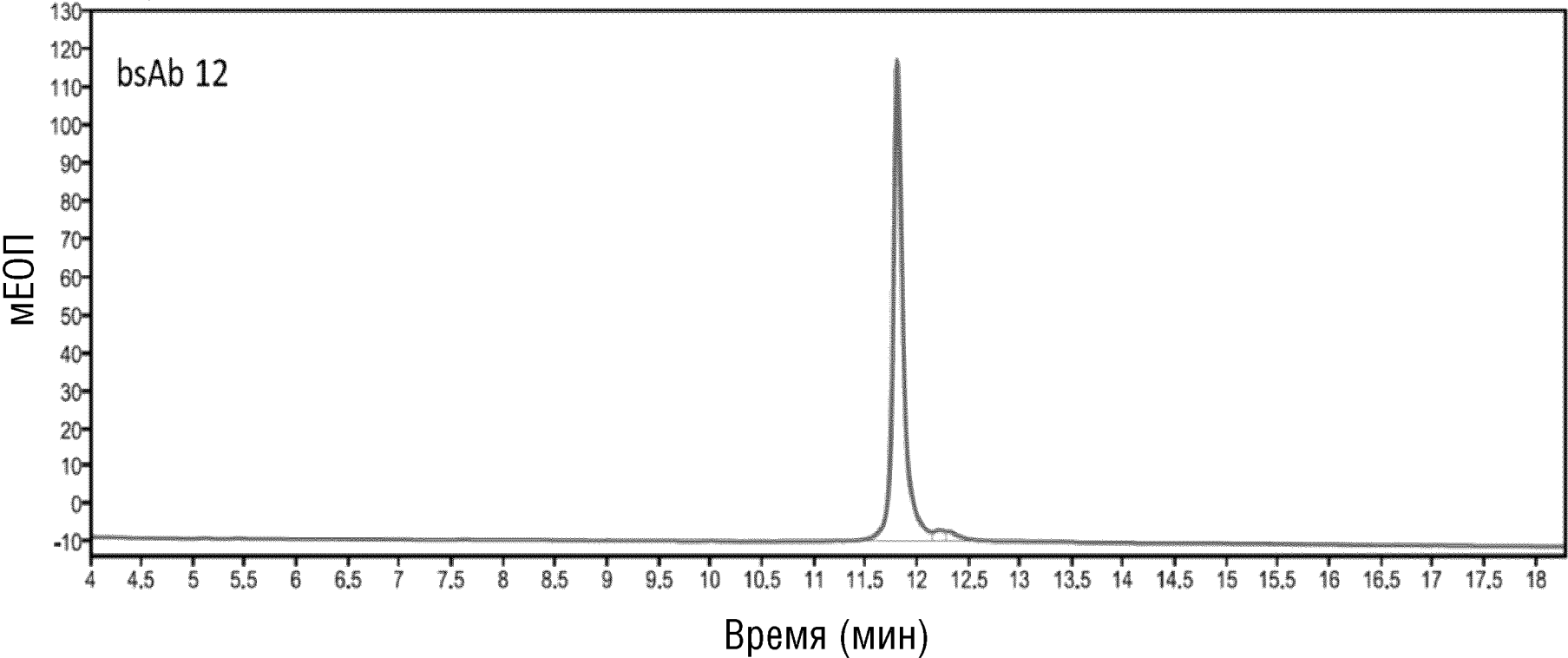
ФИГ.10J



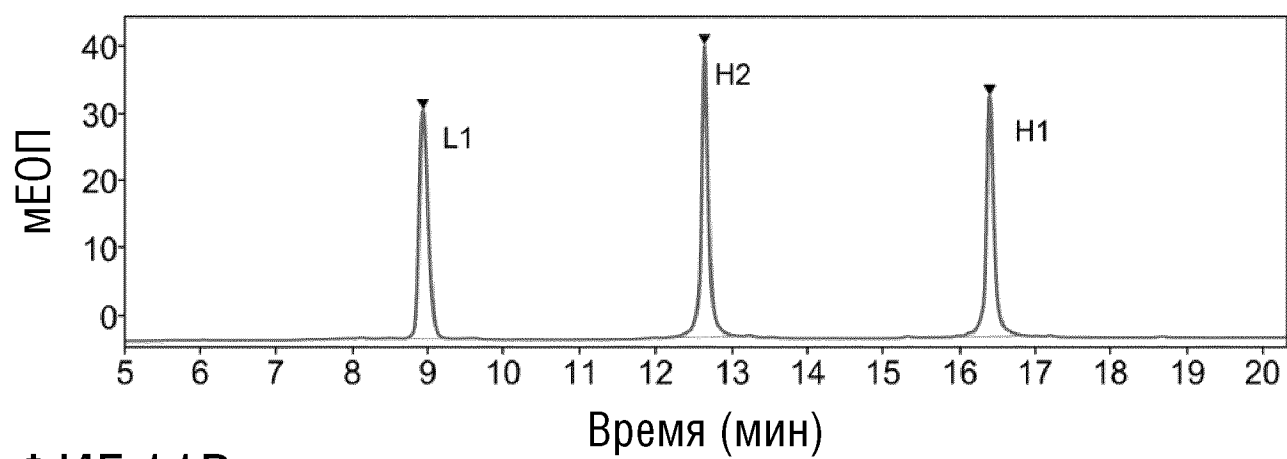
ФИГ.10К



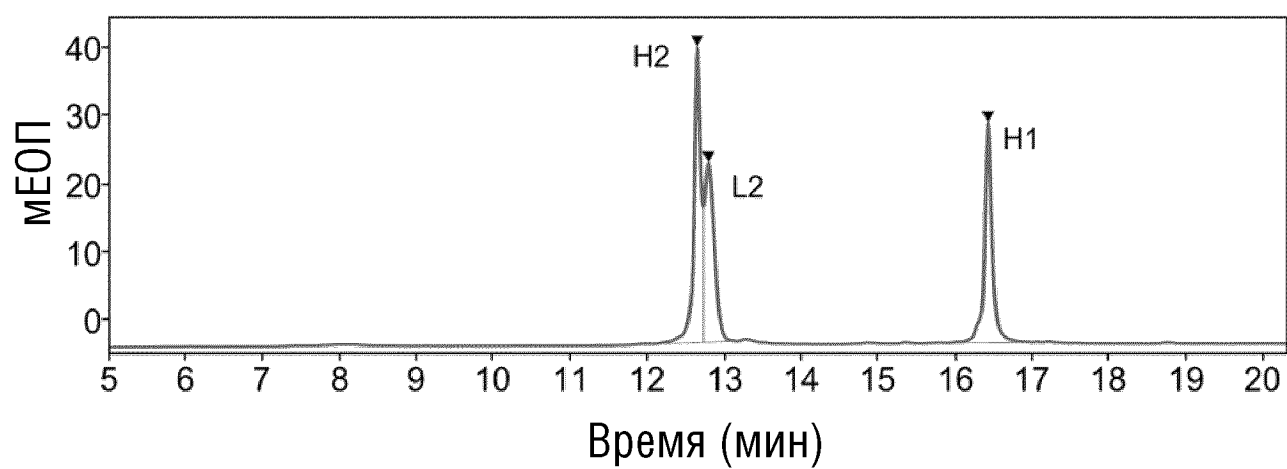
ФИГ.10L



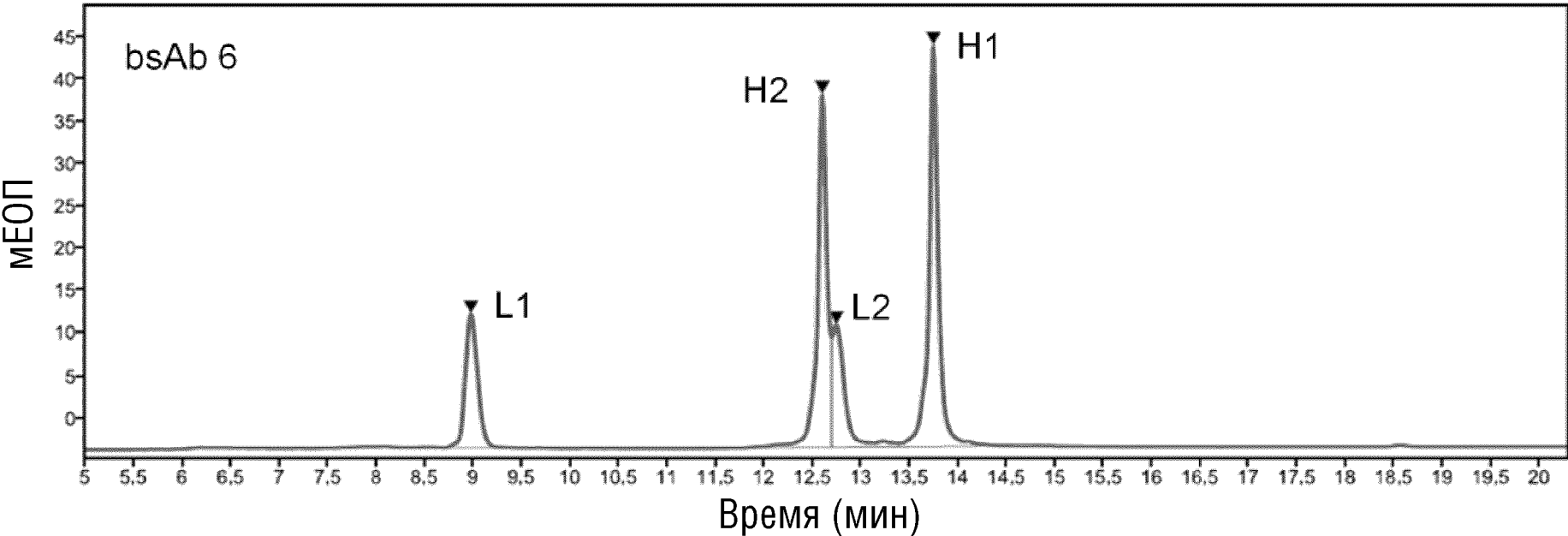
ФИГ.11А



ФИГ.11В

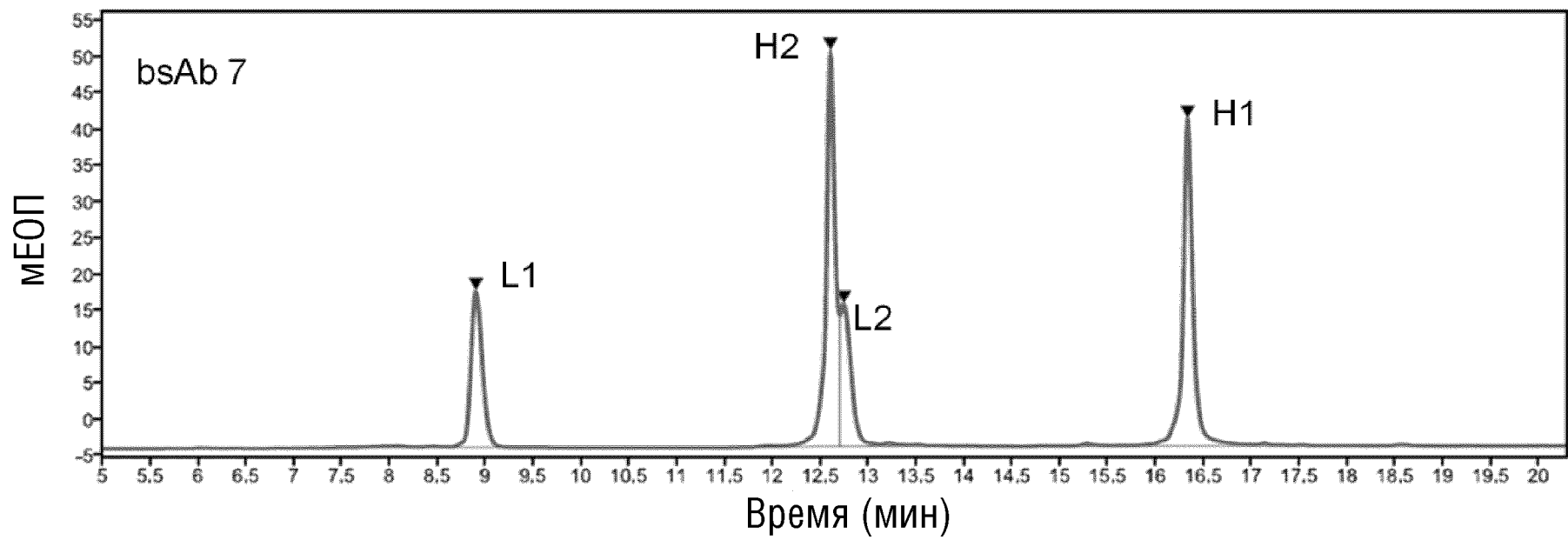


ФИГ.11С



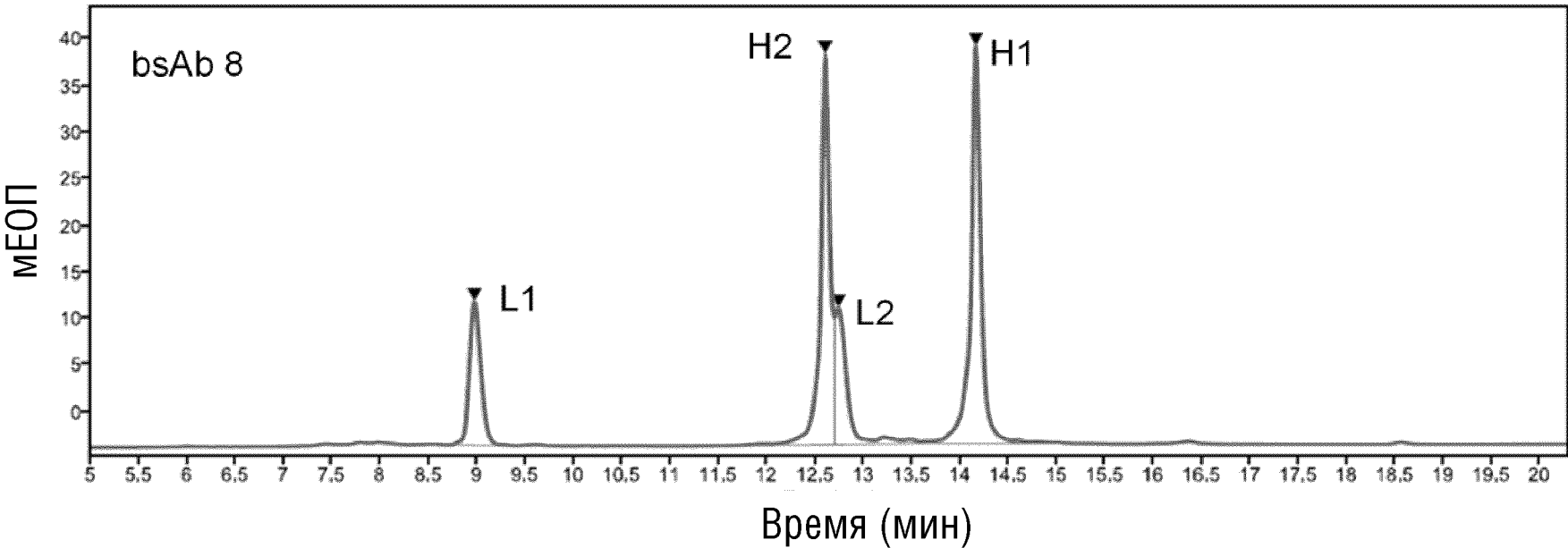
Цепь	% площади	% ожидаемой площади
L1	15.52%	13.54%
H2	32.33%	36.36%
L2	14.64%	12.40%
H1	37.51%	37.71%

ФИГ.11D



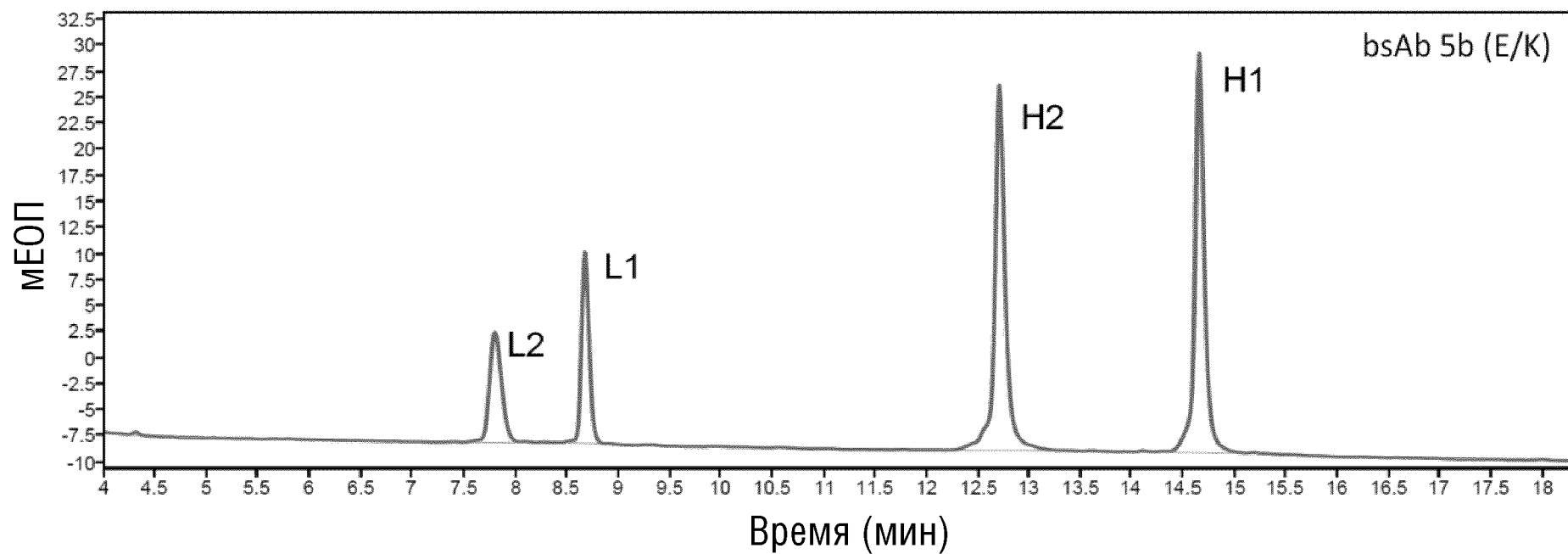
Цепь	% площади	% ожидаемой площади
L1	16.89%	13.54%
H2	35.06%	36.36%
L2	15.40%	12.40%
H1	32.66%	37.71%

ФИГ.11Е



Цепь	% площади	% ожидаемой площади
L1	14.62%	13.54%
H2	33.13%	36.36%
L2	14.96%	12.40%
H1	37.29%	37.71%

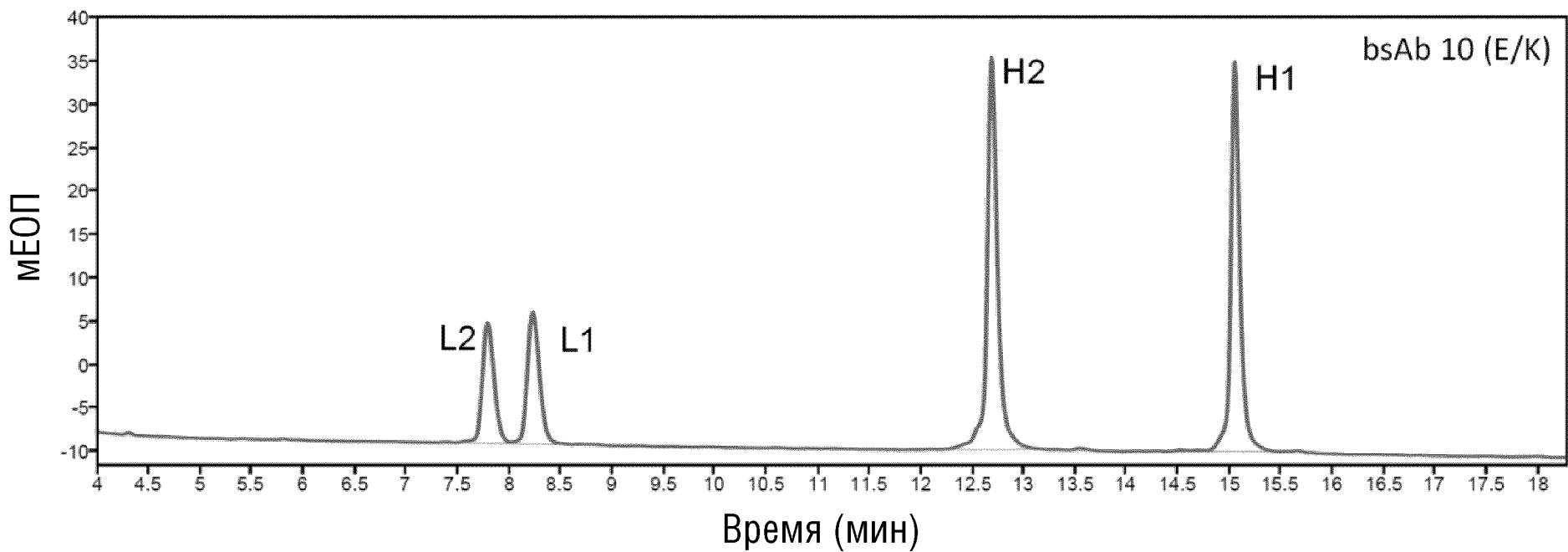
ФИГ.11F



72/102

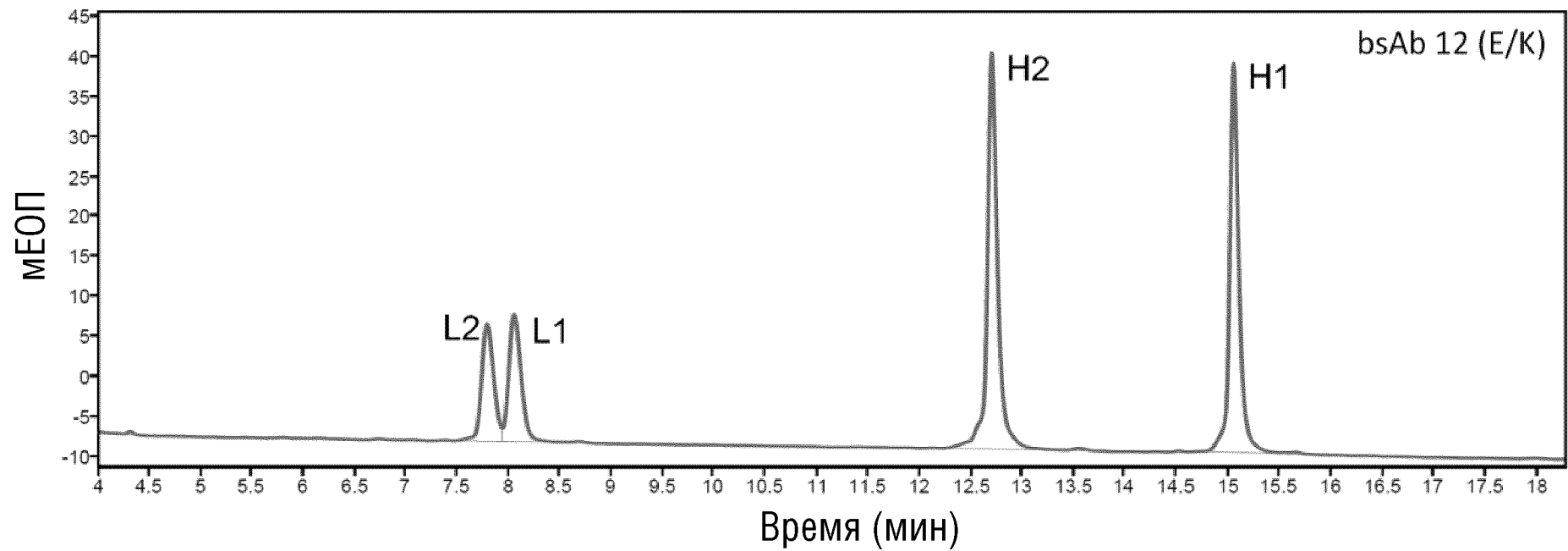
Цепь	% площади	% ожидаем. площади
H1	35.42	37.71
L1	14.11	13.54
H2	37.71	36.36
L2	12.76	12.40

ФИГ.11G



Цепь	% площади	% ожидаемой площади
H1	33.54	37.71
L1	14.80	13.54
H2	38.41	36.36
L2	13.26	12.40

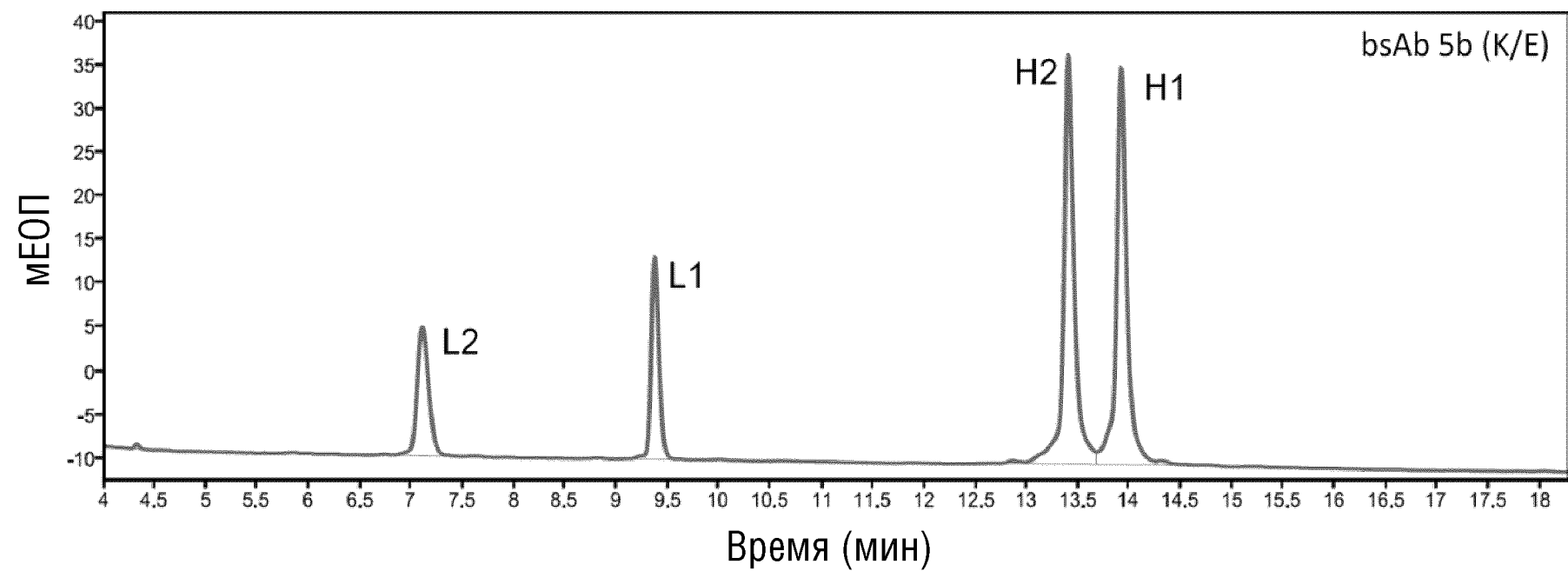
ФИГ.11Н



74/102

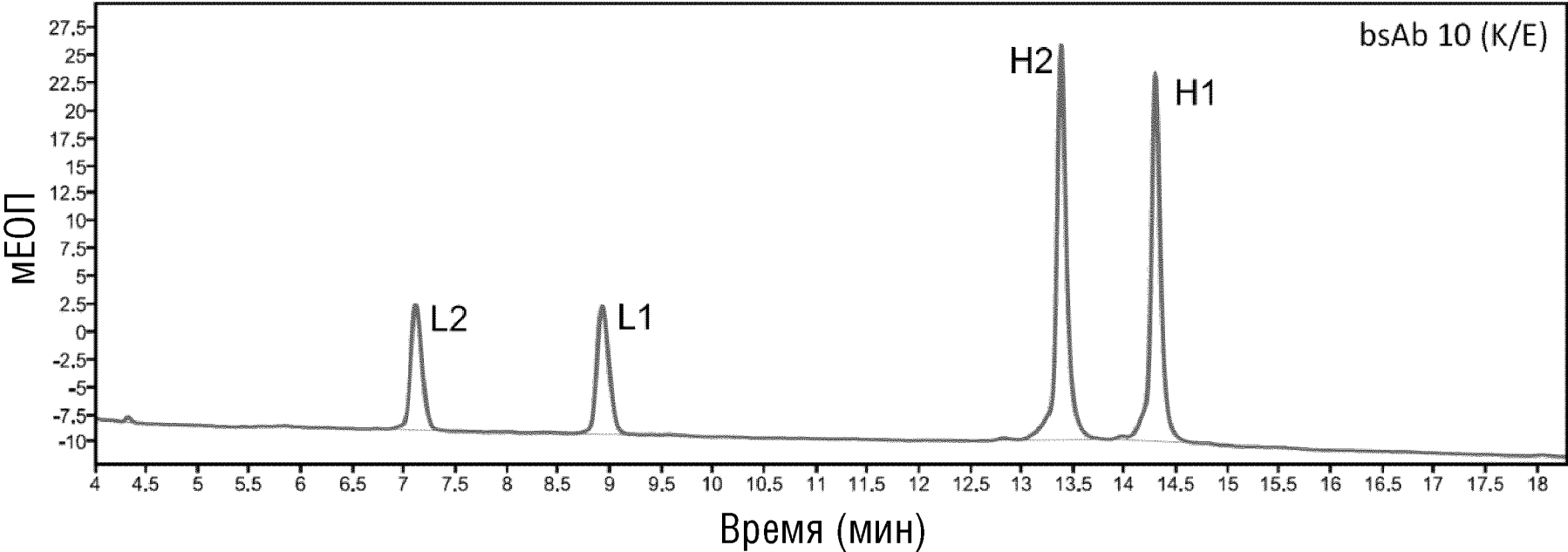
Цепь	% площади	% ожидаемой площади
H1	33.90	37.71
L1	14.49	13.54
H2	38.35	36.36
L2	13.26	12.40

ФИГ.111



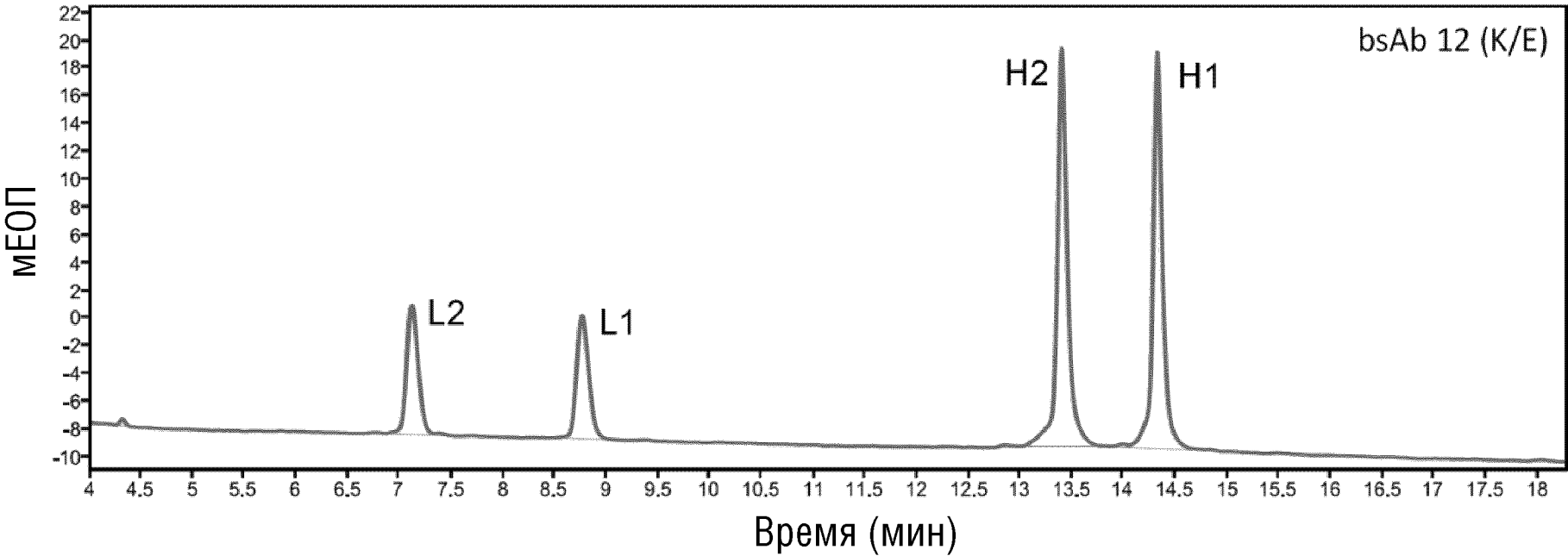
Цепь	% площади	% ожидаемой площади
H1	35.87	37.71
L1	13.73	13.54
H2	37.63	36.36
L2	12.77	12.40

ФИГ.11J



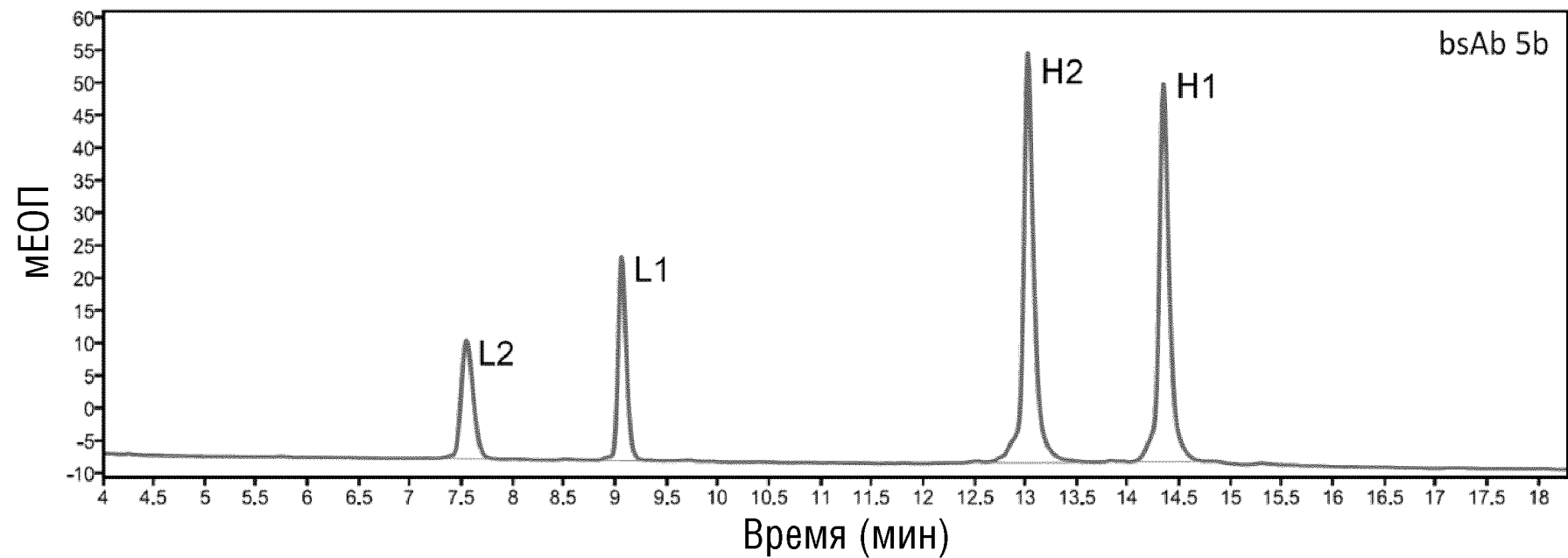
Цепь	% площади	% ожидаем. площади
H1	34.02	37.71
L1	14.49	13.54
H2	37.99	36.36
L2	13.50	12.40

ФИГ.11К



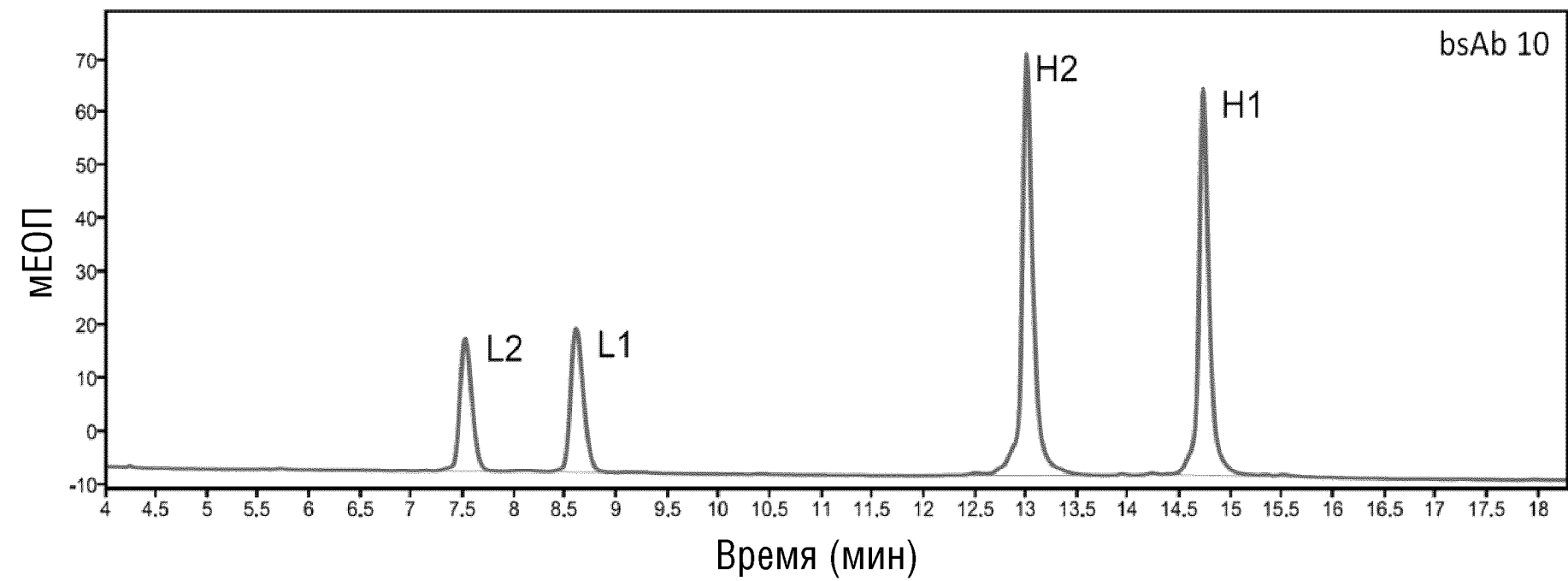
Цепь	% площади	% ожидаемой площади
H1	35.08	37.71
L1	13.80	13.54
H2	37.83	36.36
L2	13.29	12.40

ФИГ.11L



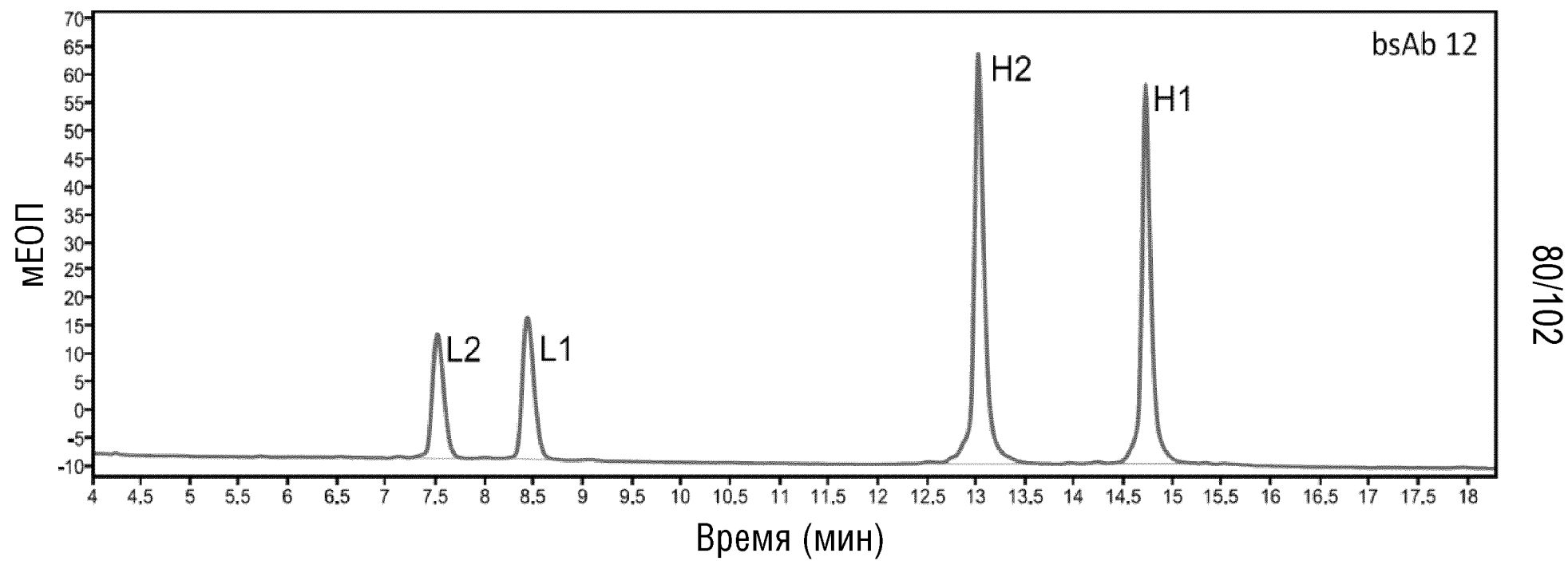
Цепь	% площади	% ожидаем. площади
H1	34.74	37.71
L1	14.71	13.54
H2	38.01	36.36
L2	12.54	12.40

ФИГ.11М



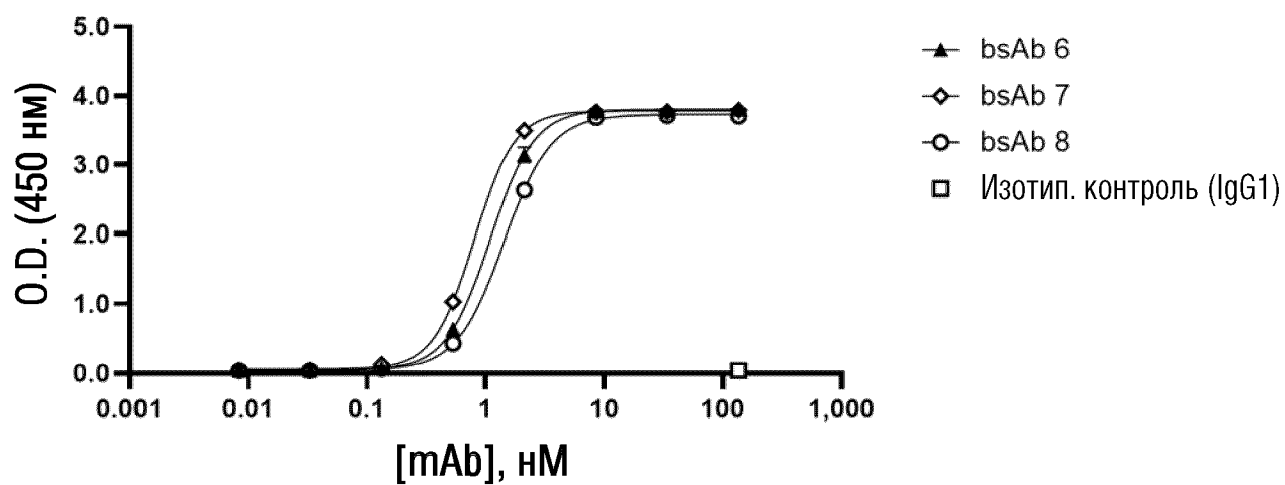
Цепь	% площади	% ожидаемой площади
H1	33.04	37.71
L1	15.06	13.54
H2	38.80	36.36
L2	13.09	12.40

ФИГ.11N

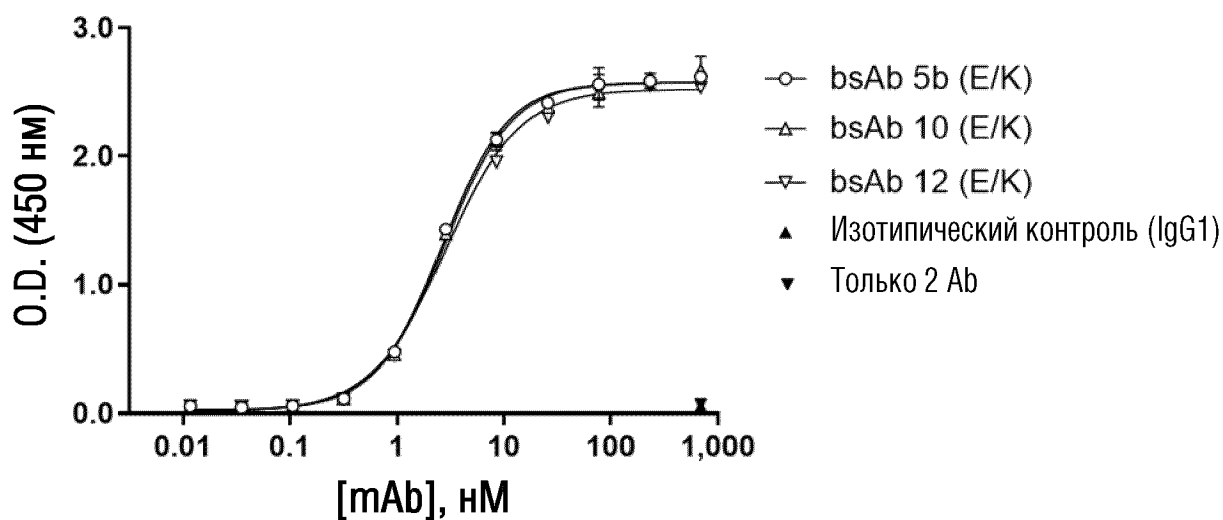


Цепь	% площади	% ожидаемой площади
H1	33.64	37.71
L1	14.74	13.54
H2	38.77	36.36
L2	12.86	12.40

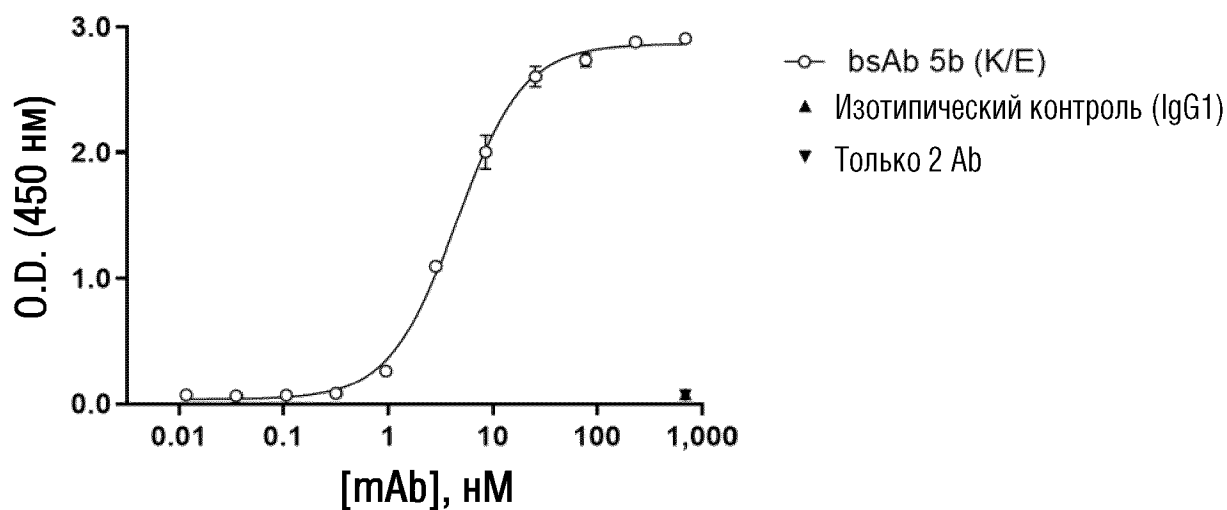
ФИГ.12А



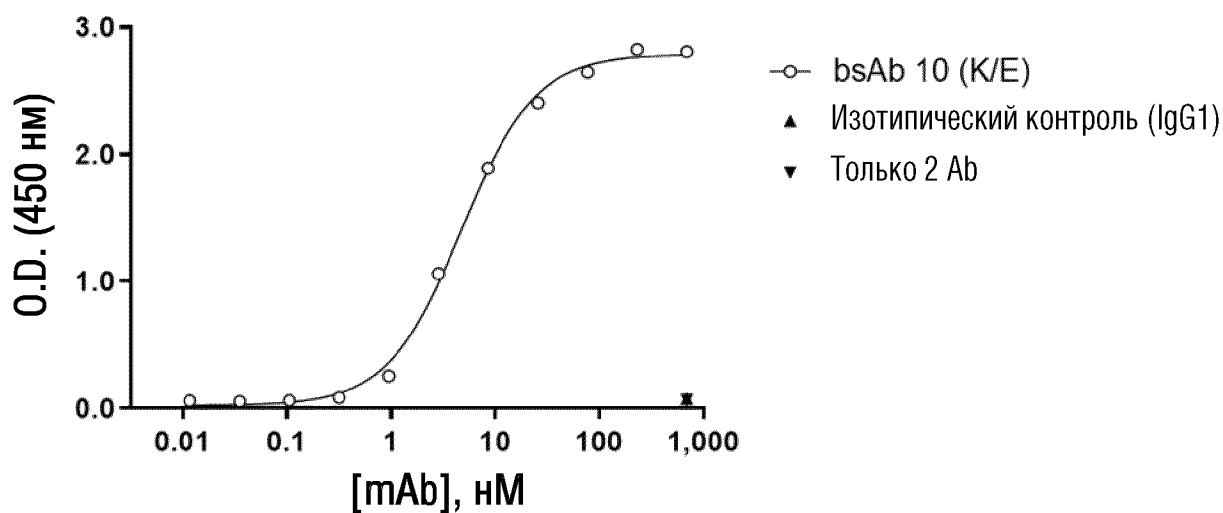
ФИГ.12В



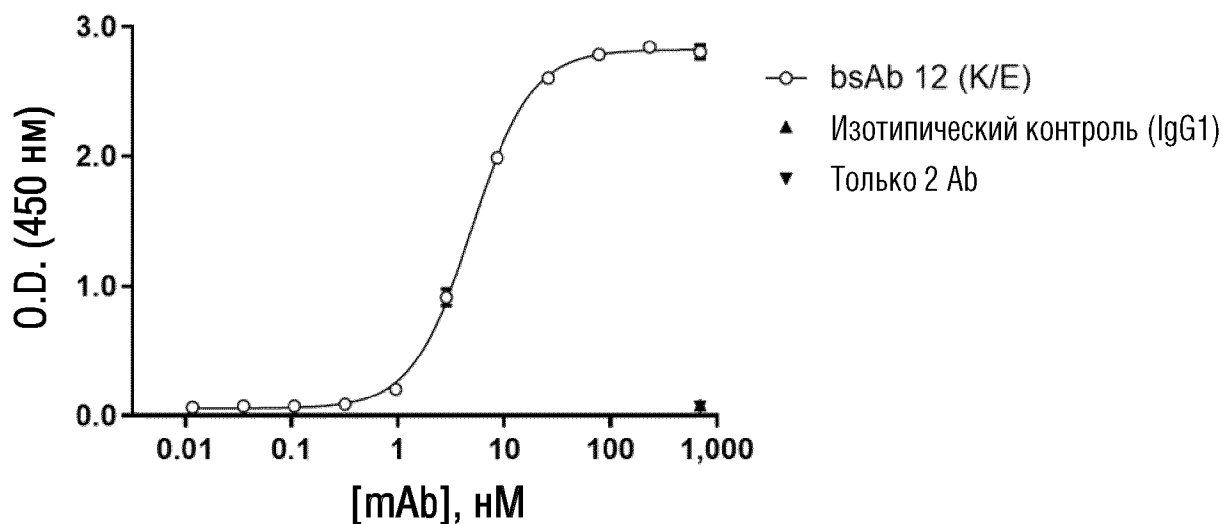
ФИГ.12С



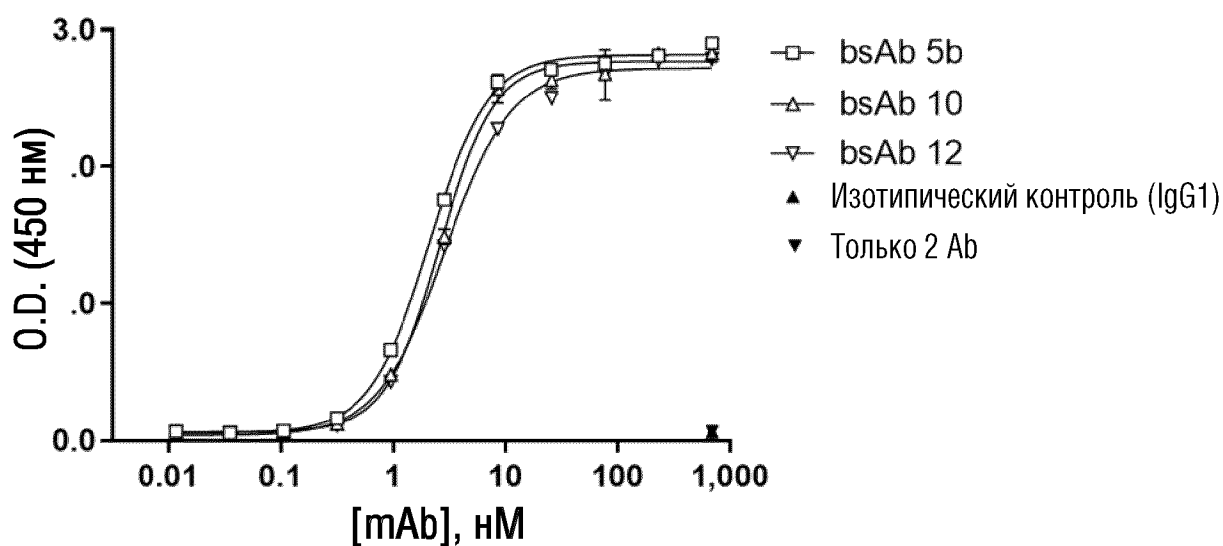
ФИГ.12D



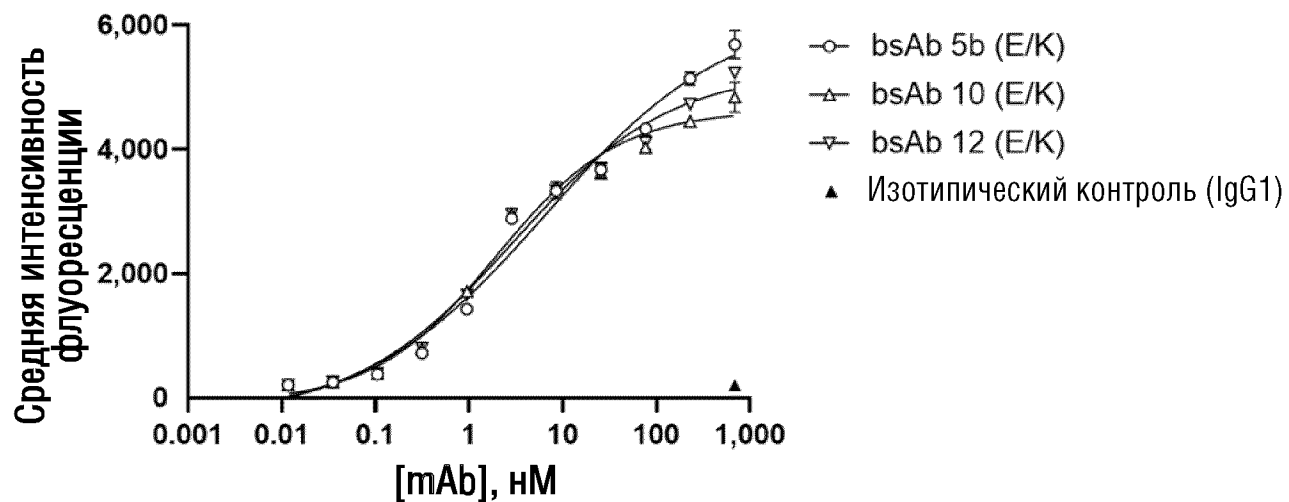
ФИГ.12E



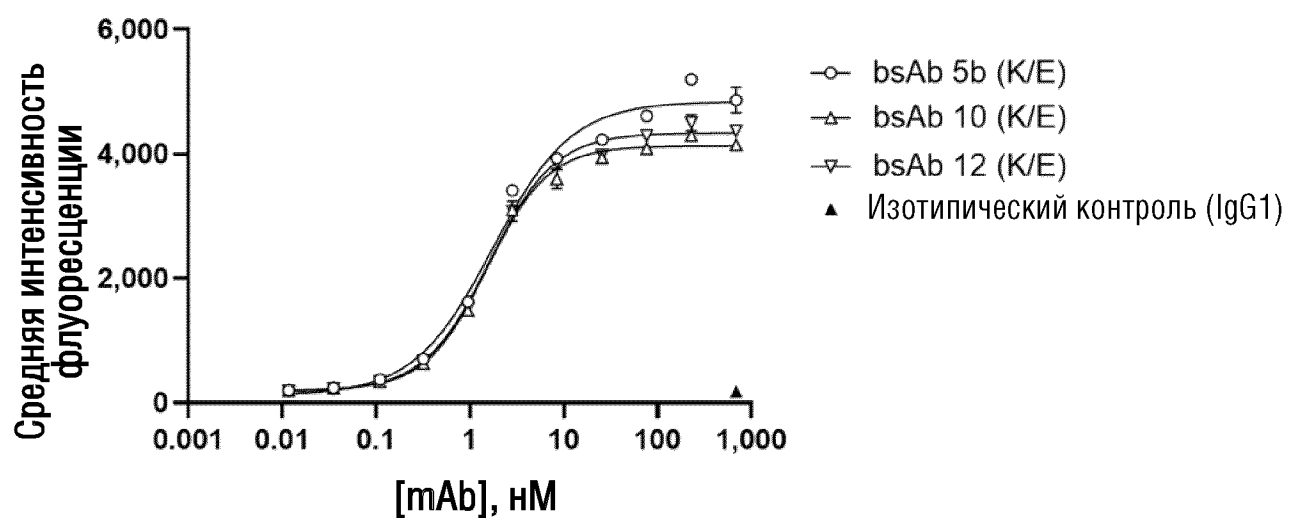
ФИГ.12F



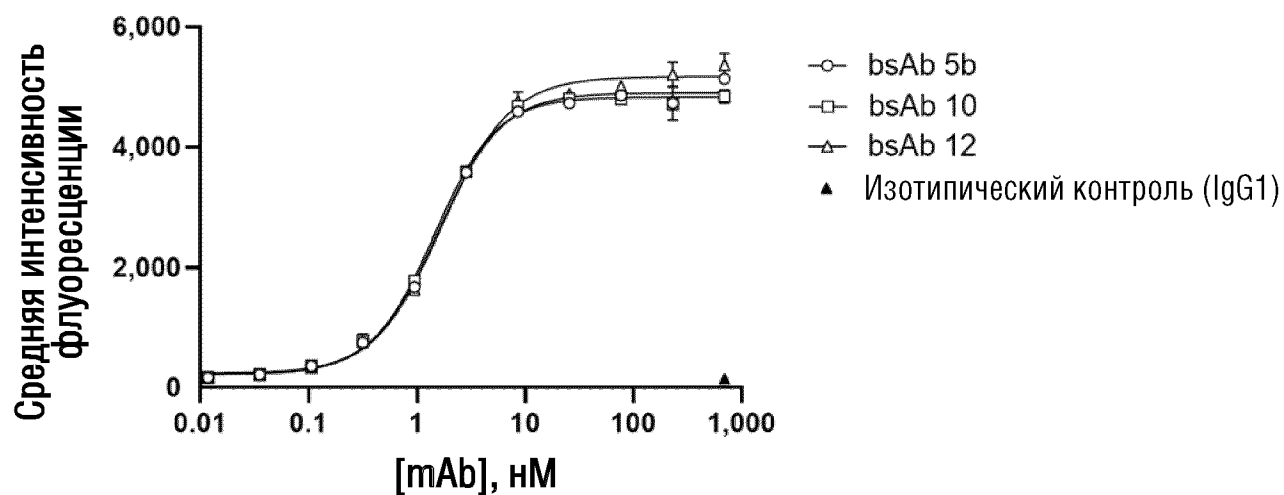
ФИГ.13А



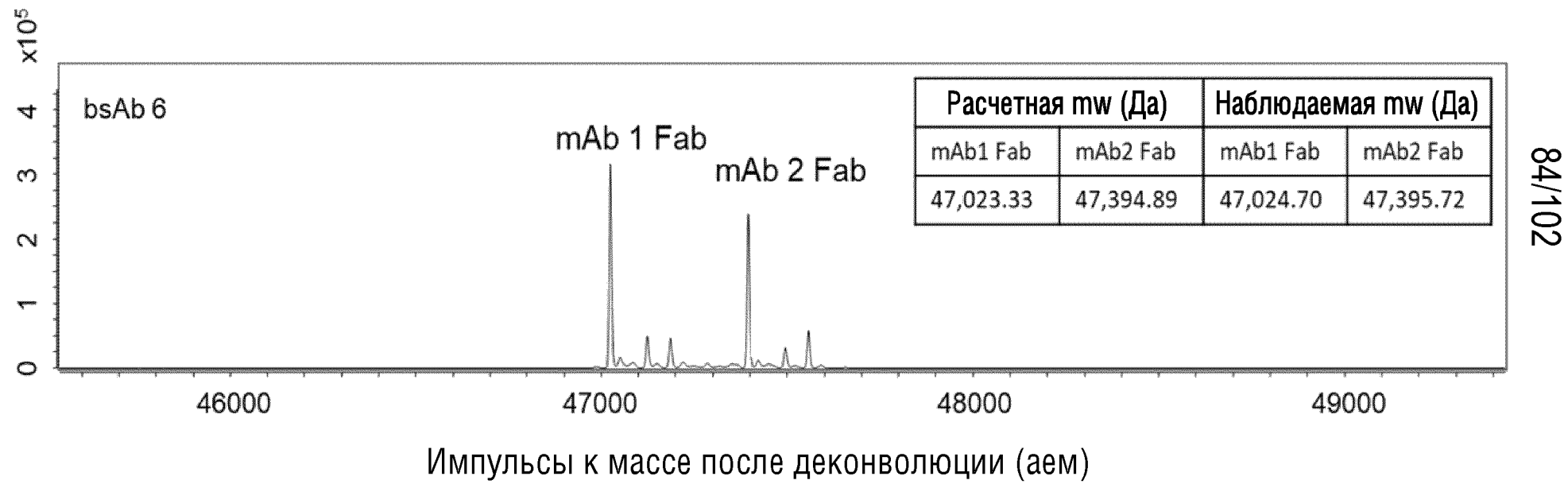
ФИГ.13В



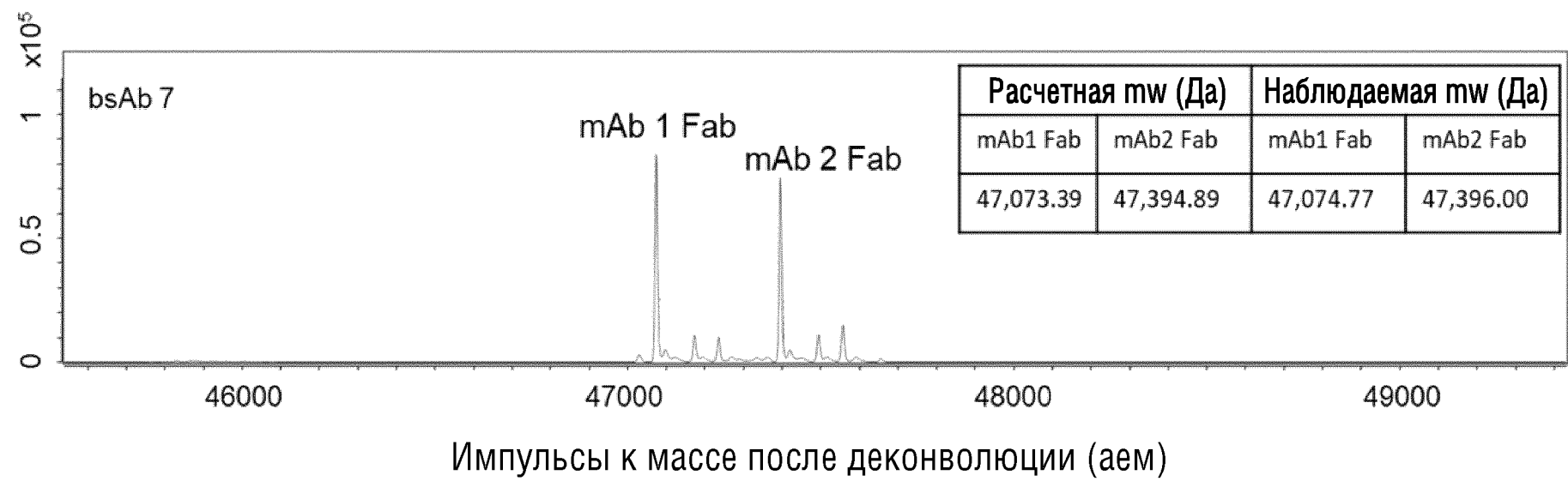
ФИГ.13С



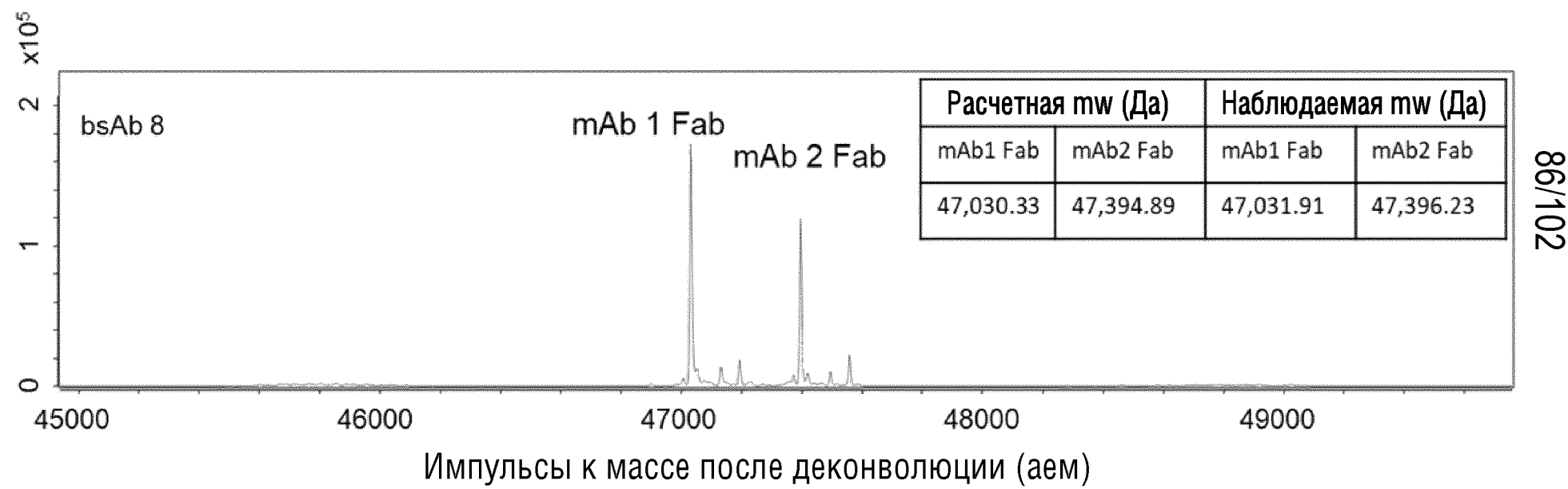
ФИГ.14А



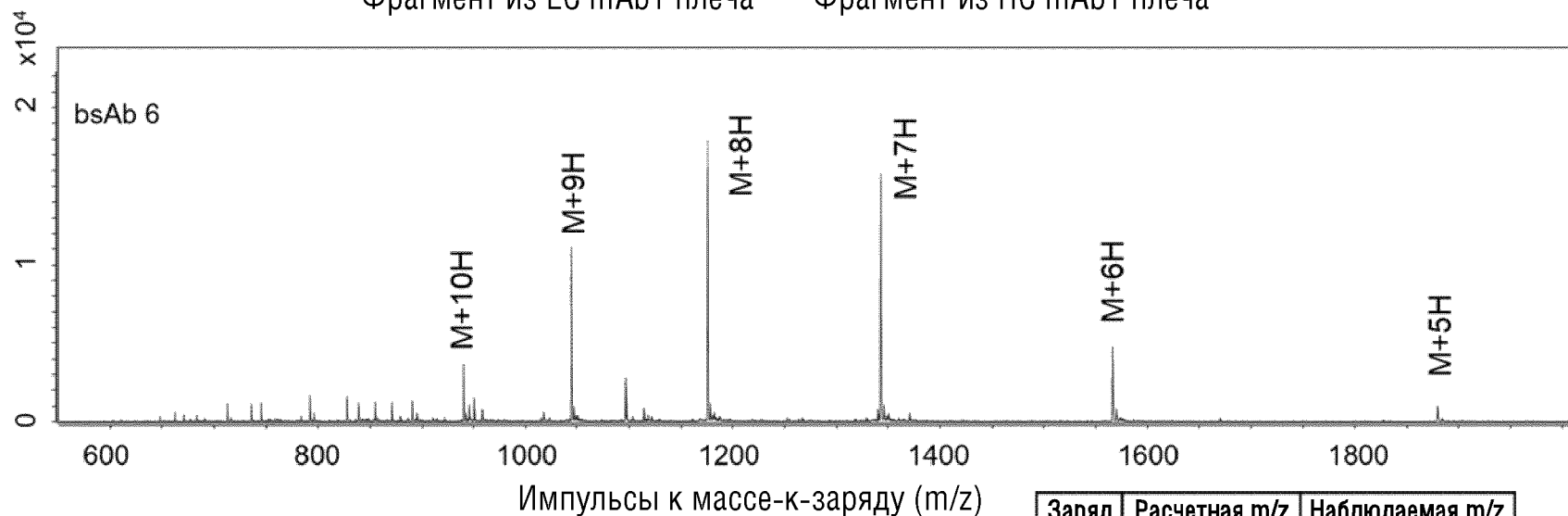
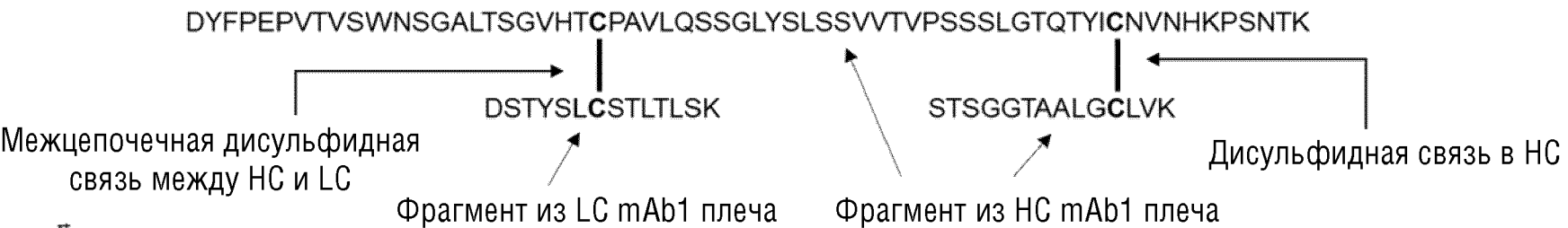
ФИГ.14В



ФИГ.14С



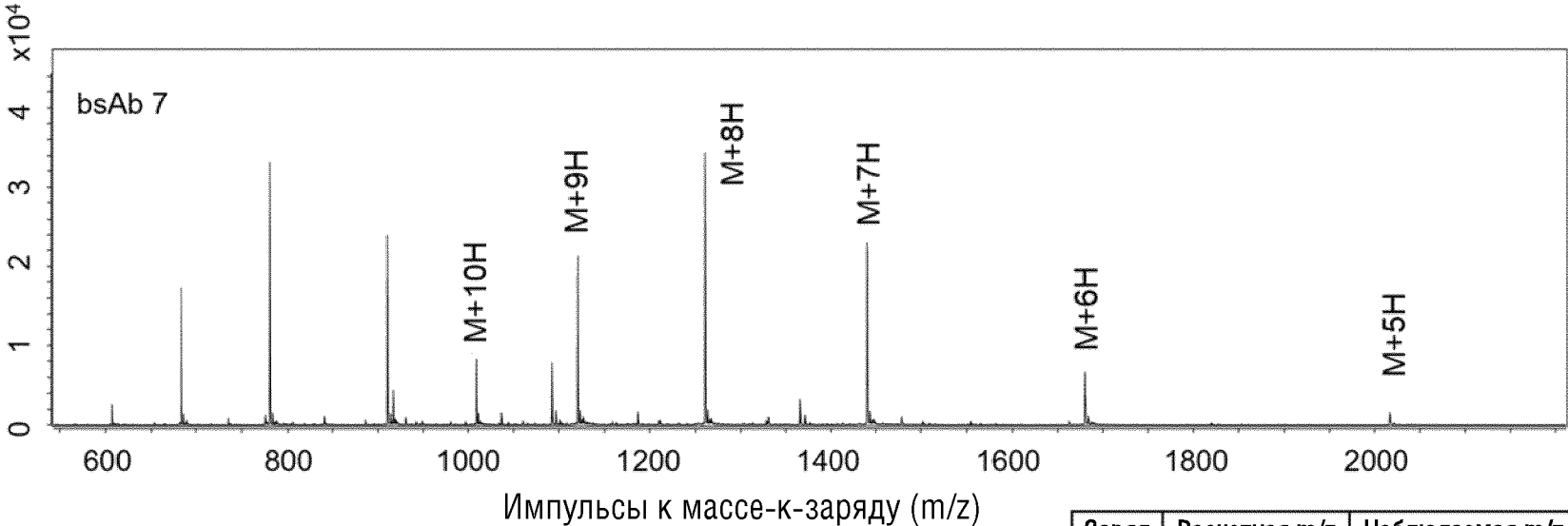
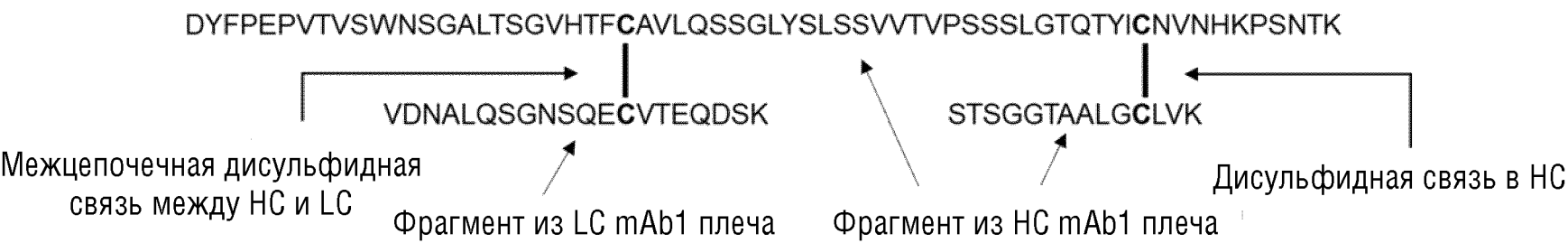
ФИГ.15А



- Расчетная m_w дисульфидного поперечно-сшитого пептида 9394,49 Да
- Наблюдаемая m_w дисульфидного поперечно-сшитого пептида 9394,57 Да

Заряд	Расчетная m/z	Наблюдаемая m/z
5	1879.91	1879.88
6	1566.76	1566.57
7	1343.08	1342.92
8	1175.32	1175.43
9	1044.84	1044.49
10	940.46	940.57

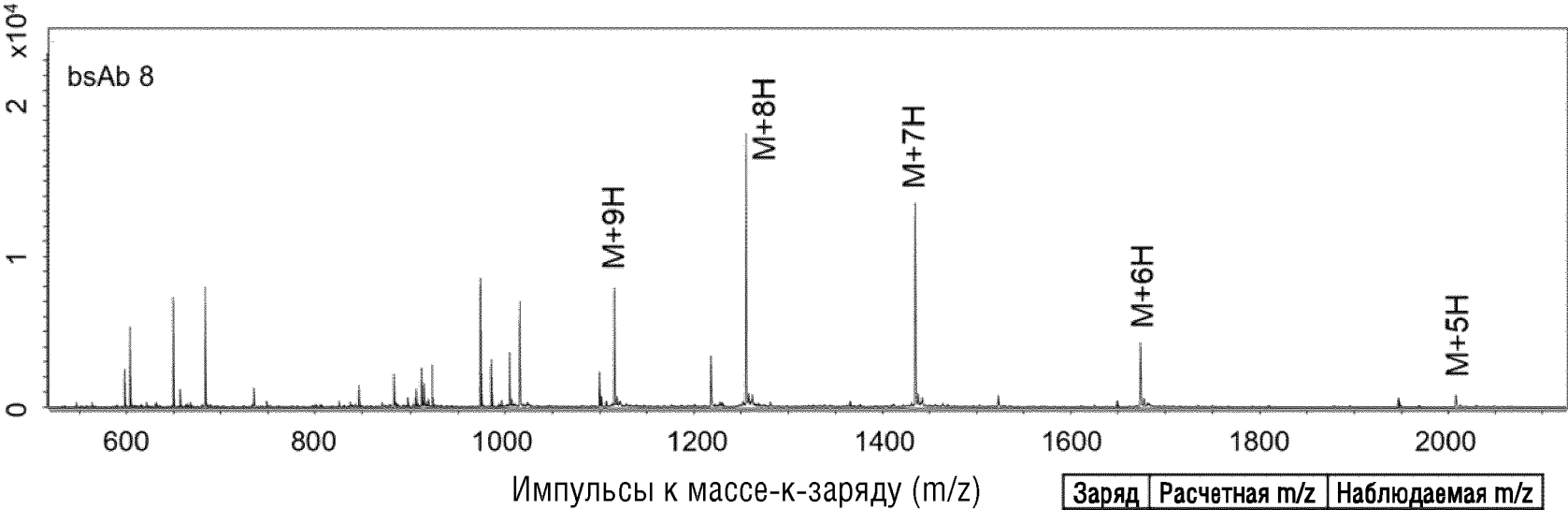
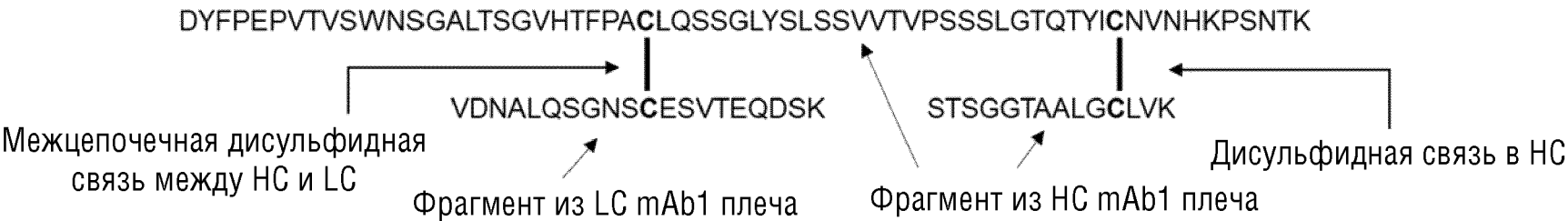
ФИГ.15В



- Расчетная m/w дисульфидного поперечно-сшитого пептида 10078,08 Да
- Наблюдаемая m/w дисульфидного поперечно-сшитого пептида 10078,16 Да

Заряд	Расчетная m/z	Наблюдаемая m/z
5	2016.62	2016.51
6	1680.69	1680.43
7	1440.73	1440.49
8	1260.77	1260.61
9	1120.79	1120.65
10	1008.82	1008.73

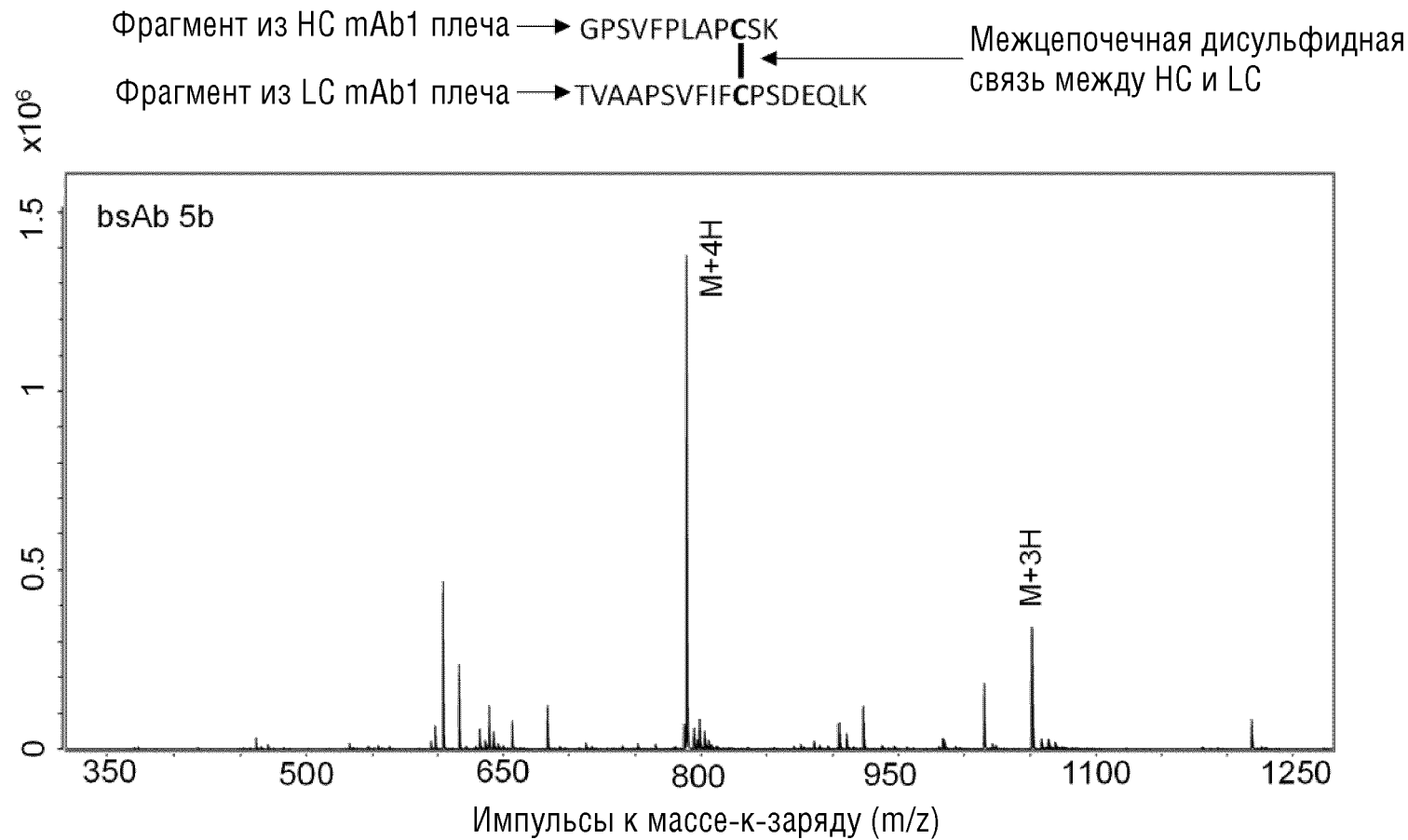
ФИГ.15С



- Расчетная m/w дисульфидного поперечно-сшитого пептида 10035,01 Да
- Наблюдаемая m/w дисульфидного поперечно-сшитого пептида 10035,55 Да

Заряд	Расчетная m/z	Наблюдаемая m/z
5	2008.01	2007.76
6	1673.51	1673.40
7	1434.58	1434.56
8	1255.38	1255.30
9	1116.01	1115.97

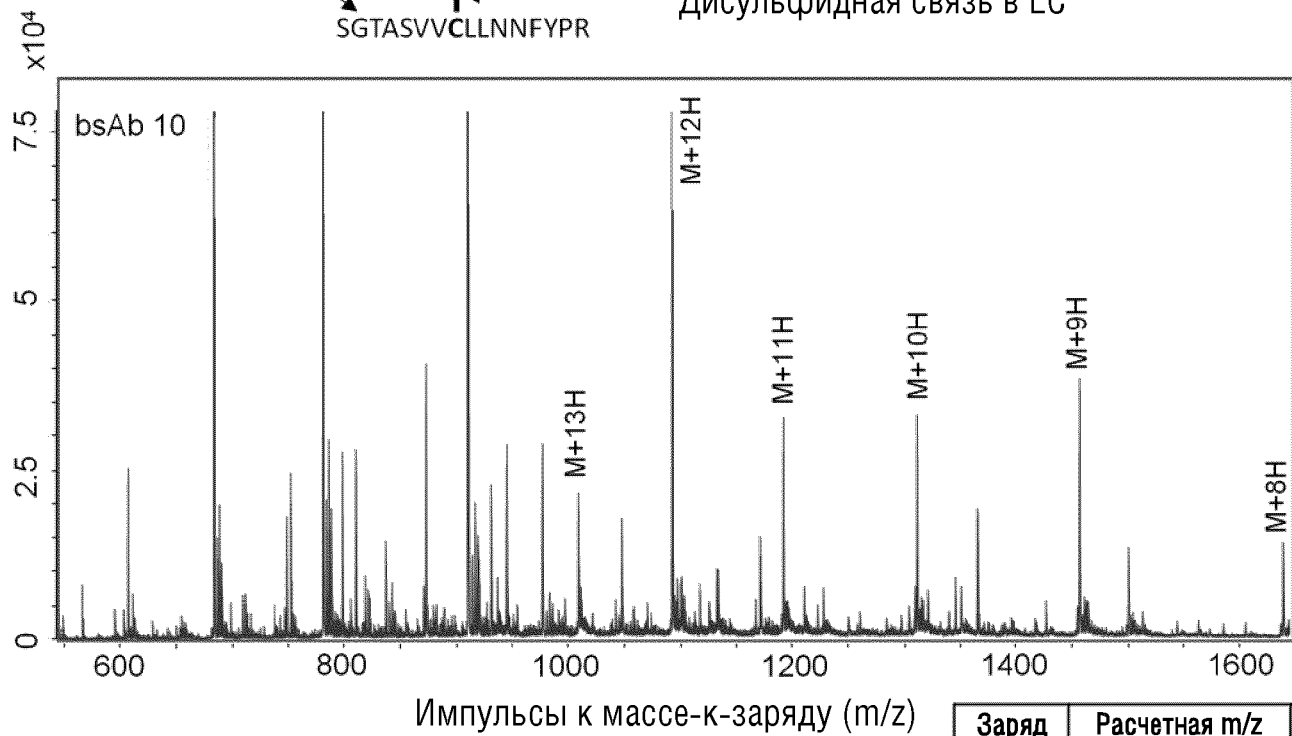
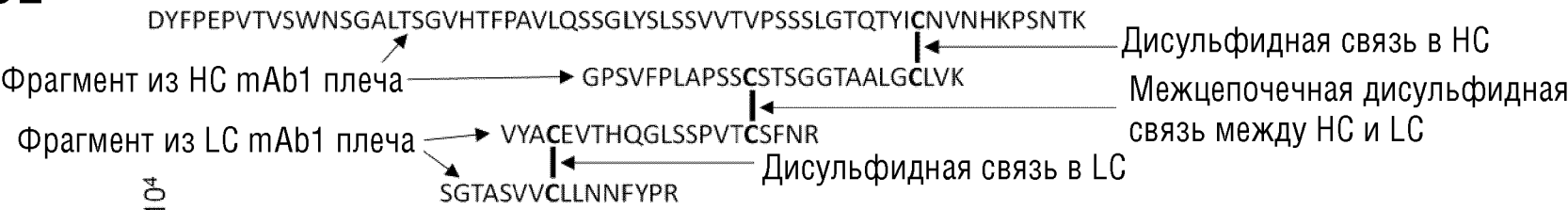
ФИГ.15D



- Расчетная m/z дисульфидного поперечно-сшитого пептида 3152,7 Да
- Наблюдаемая m/z дисульфидного поперечно-сшитого пептида 3152,2 Да

Заряд	Расчетная m/z	Наблюдаемая m/z
3	1051.890	1051.5
4	789.168	789.2

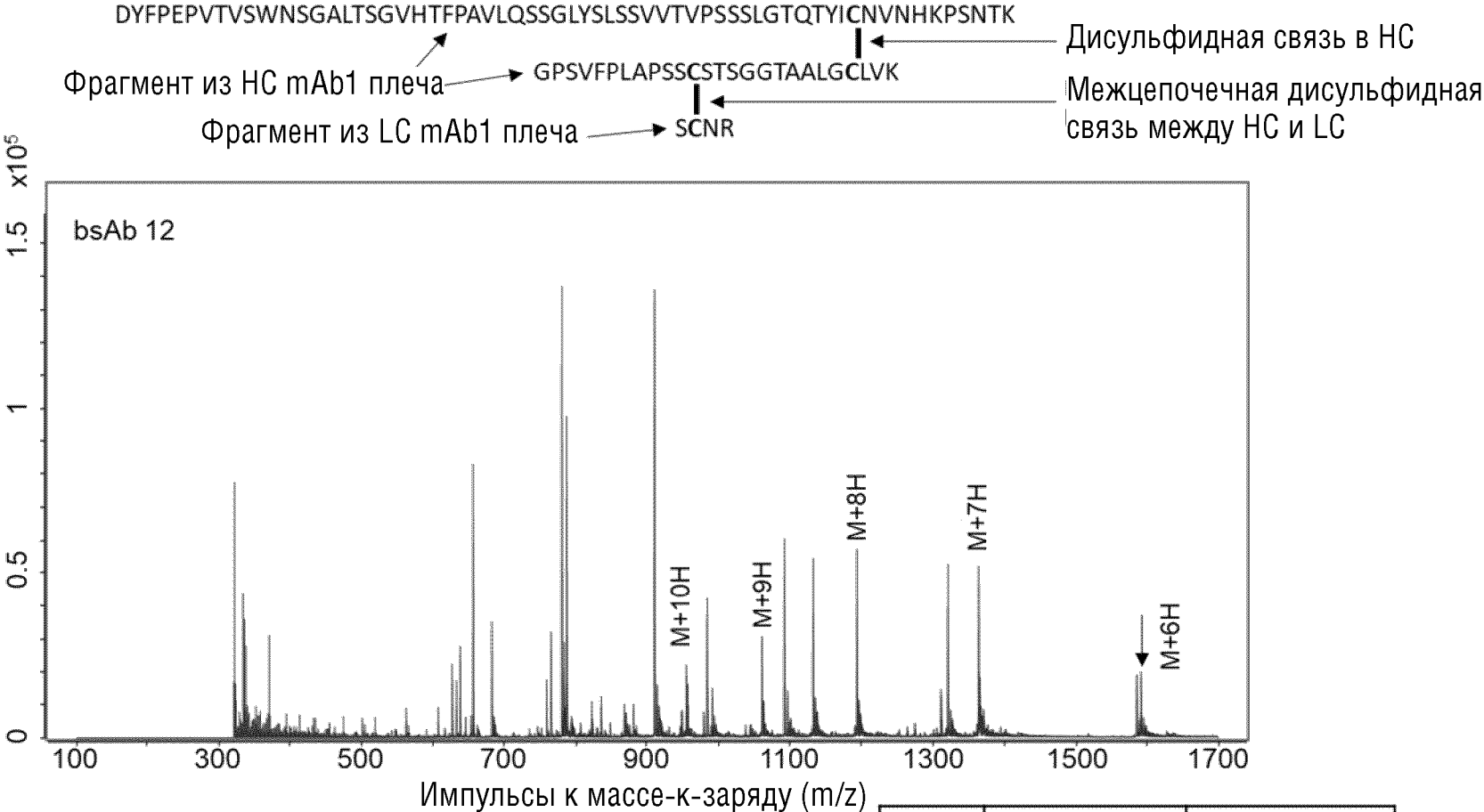
ФИГ.15Е



- Расчетная m/w дисульфидного поперечно-сшитого пептида 13100,7 Да
- Наблюдаемая m/w дисульфидного поперечно-сшитого пептида 13100,7 Да

Заряд	Расчетная m/z	Наблюдаемая m/z
8	1638.588	1638.6
9	1456.634	1456.6
10	1311.070	1311.1
11	1191.973	1191.9
12	1092.745	1092.6
13	1008.746	1008.8

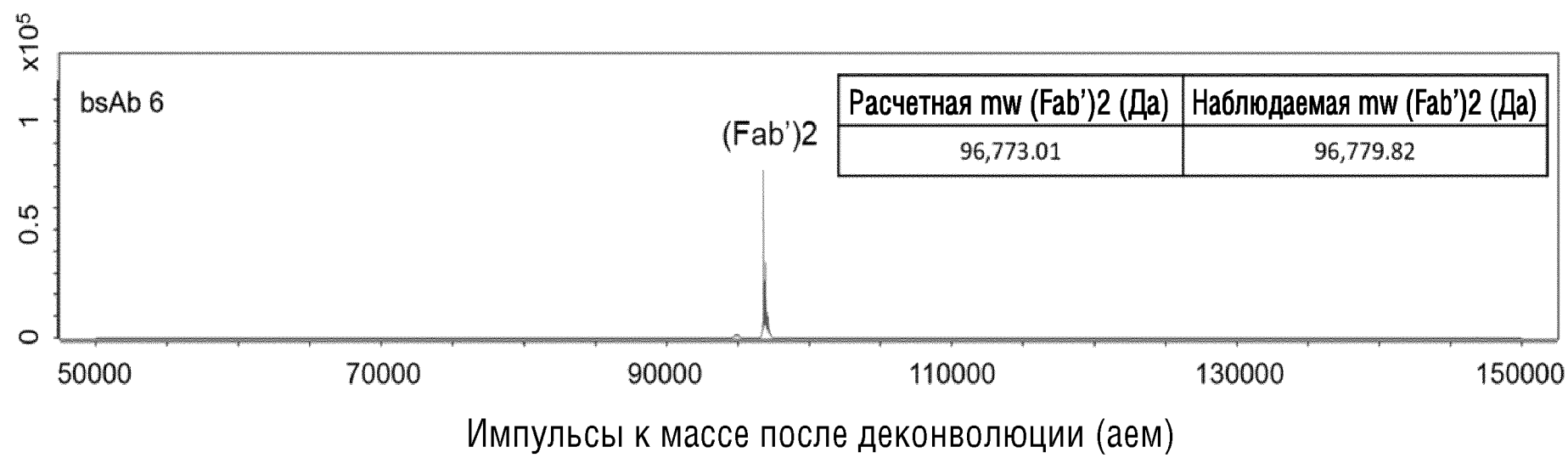
ФИГ.15F



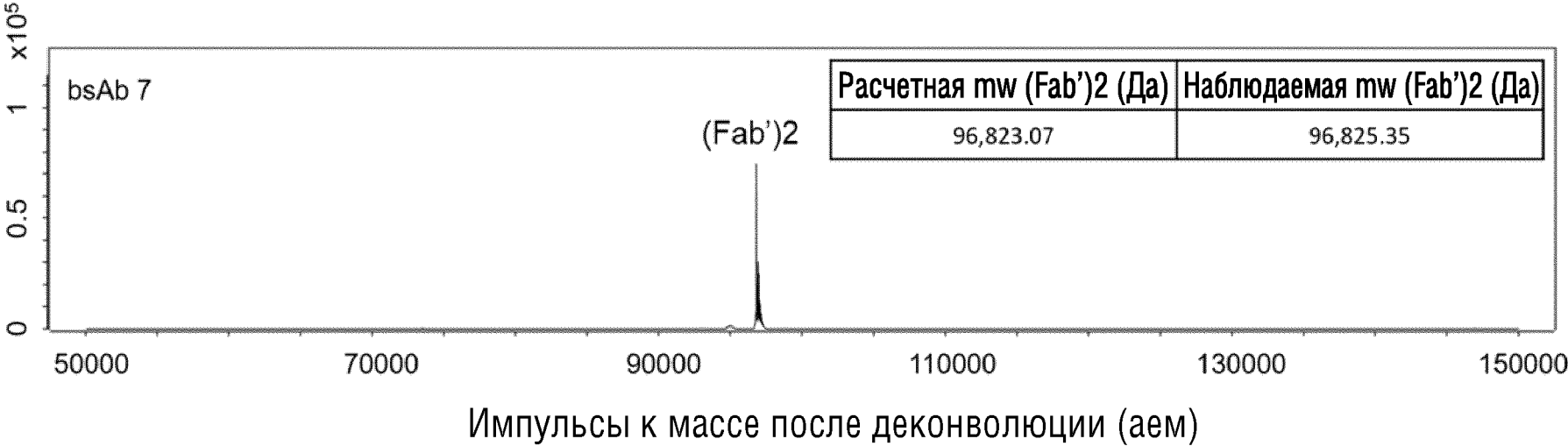
- Расчетная m/z дисульфидного поперечно-сшитого пептида 9541,7 Да
- Наблюдаемая m/z дисульфидного поперечно-сшитого пептида 9541,5 Да

Заряд	Расчетная m/z	Наблюдаемая m/z
6	1591.279	1591.3
7	1364.096	1364.0
8	1193.709	1193.6
9	1061.186	1061.2
10	955.168	955.2

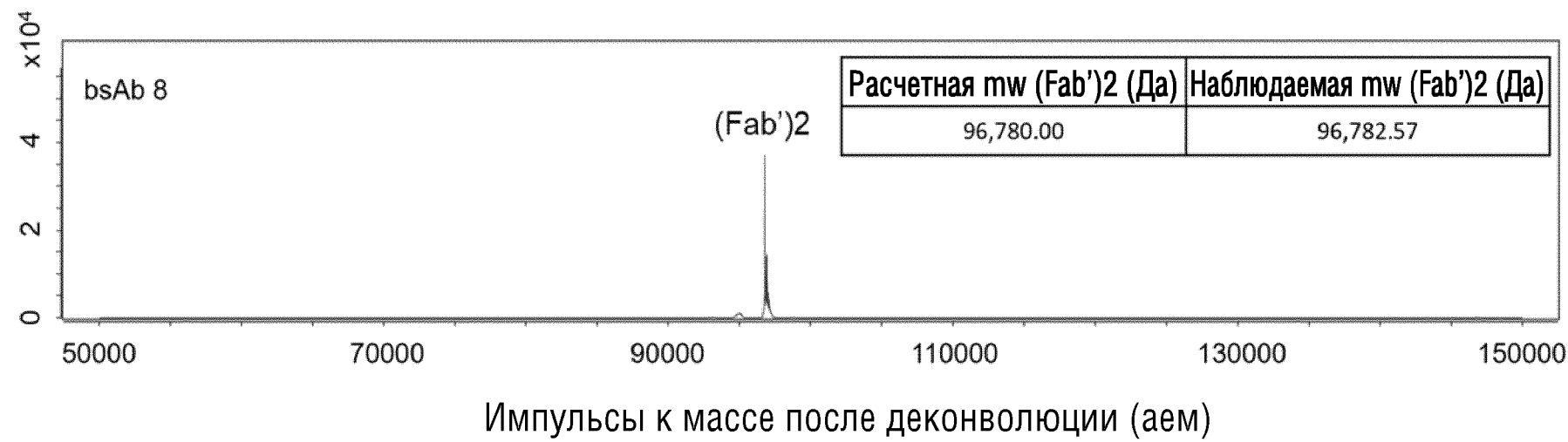
ФИГ.16А



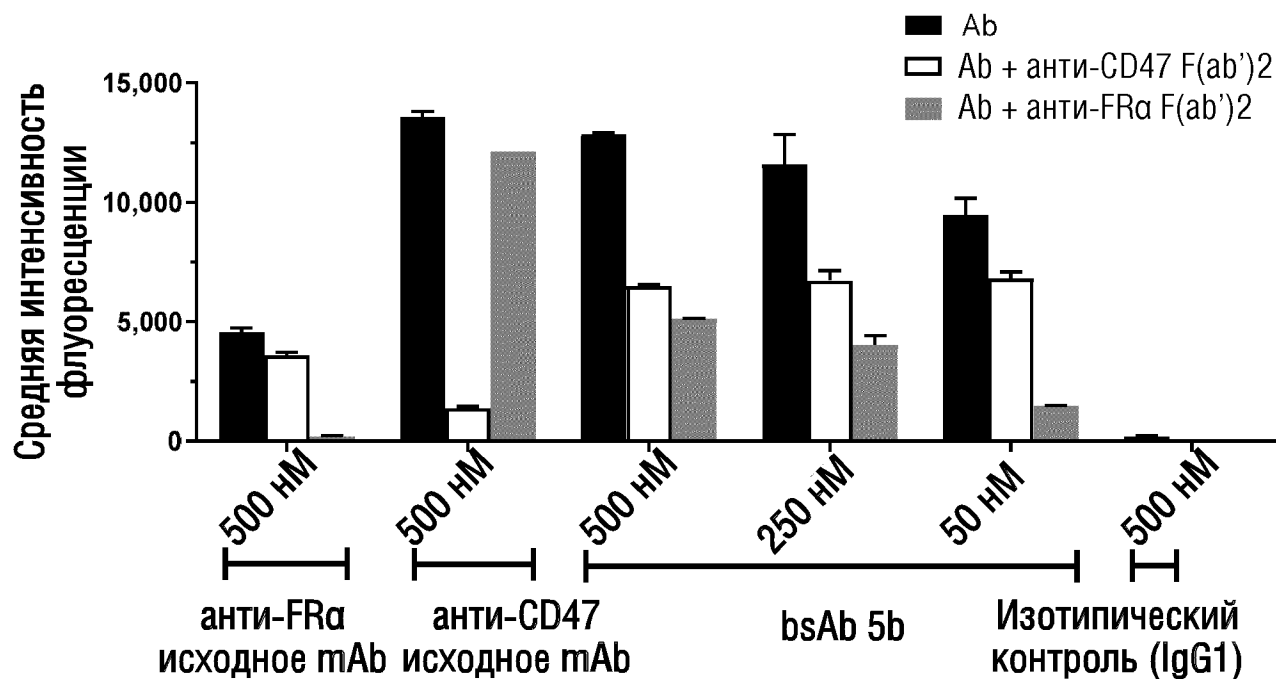
ФИГ.16В



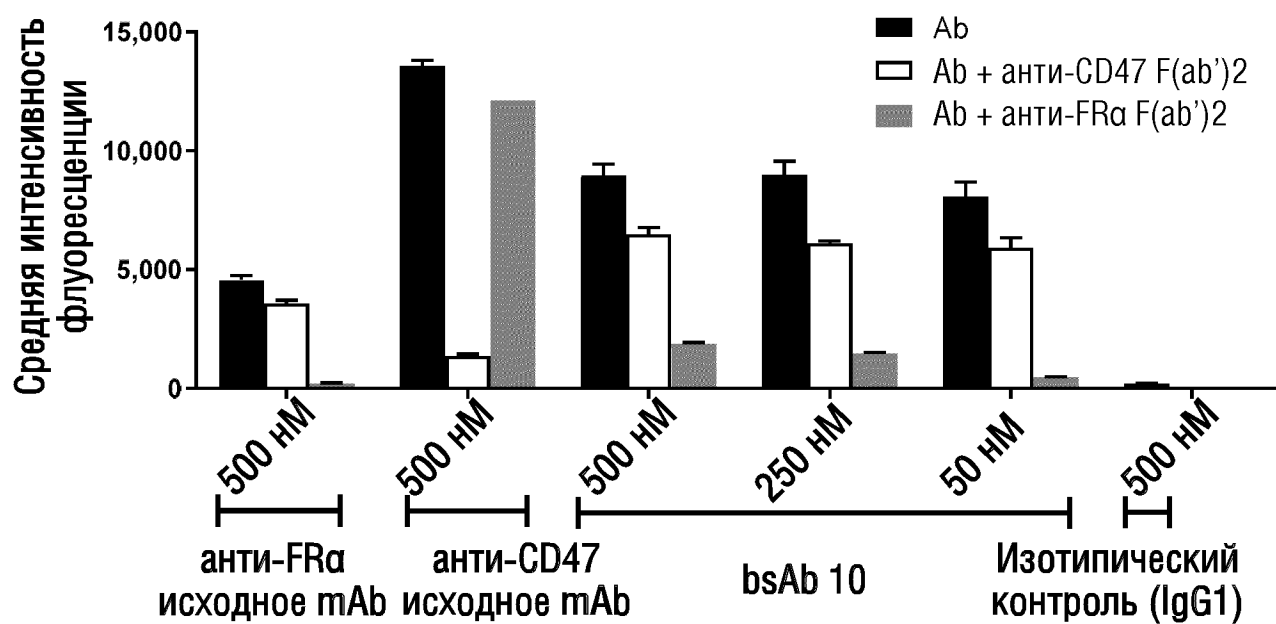
ФИГ.16С



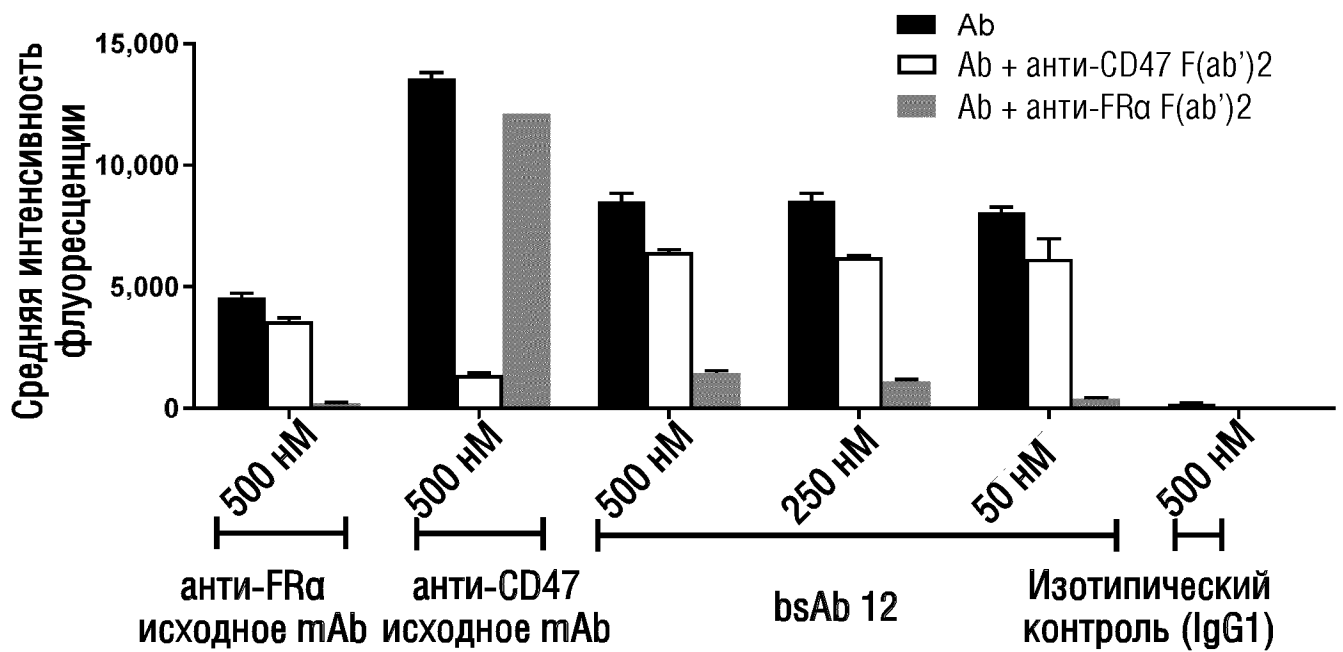
ФИГ.17А



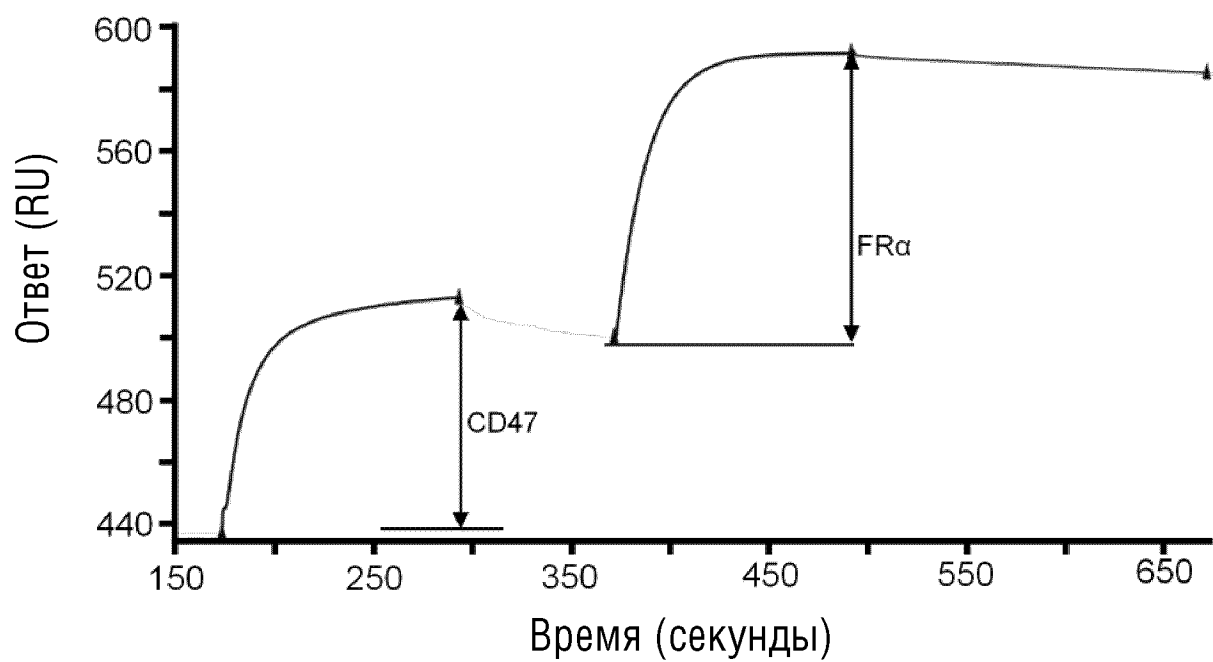
ФИГ.17В



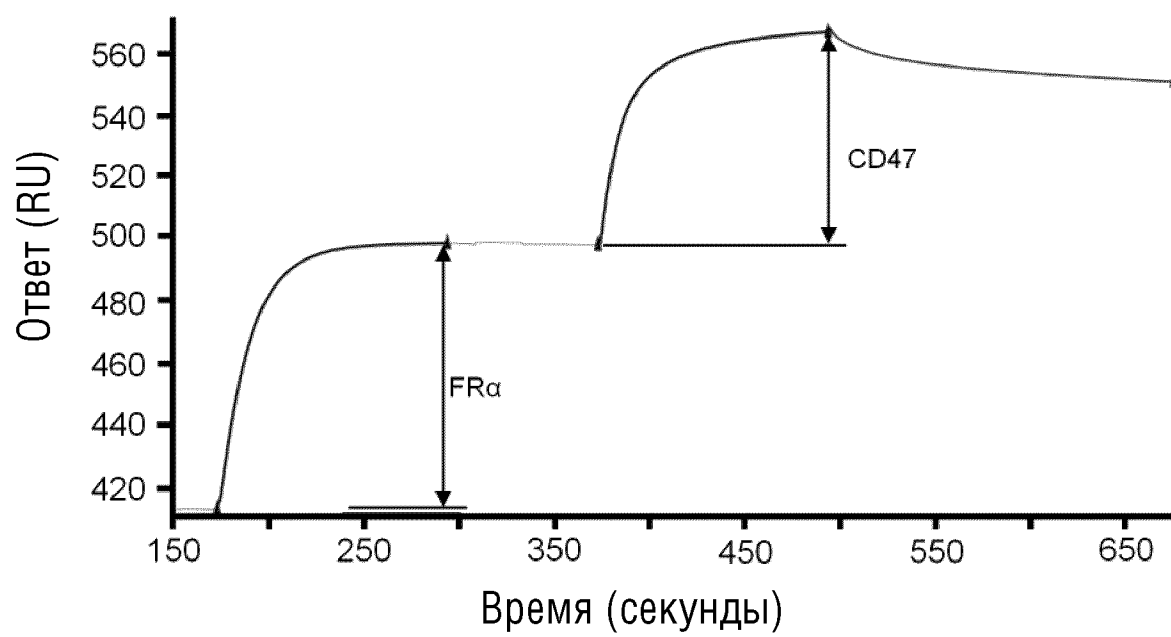
ФИГ.17С



ФИГ.18А

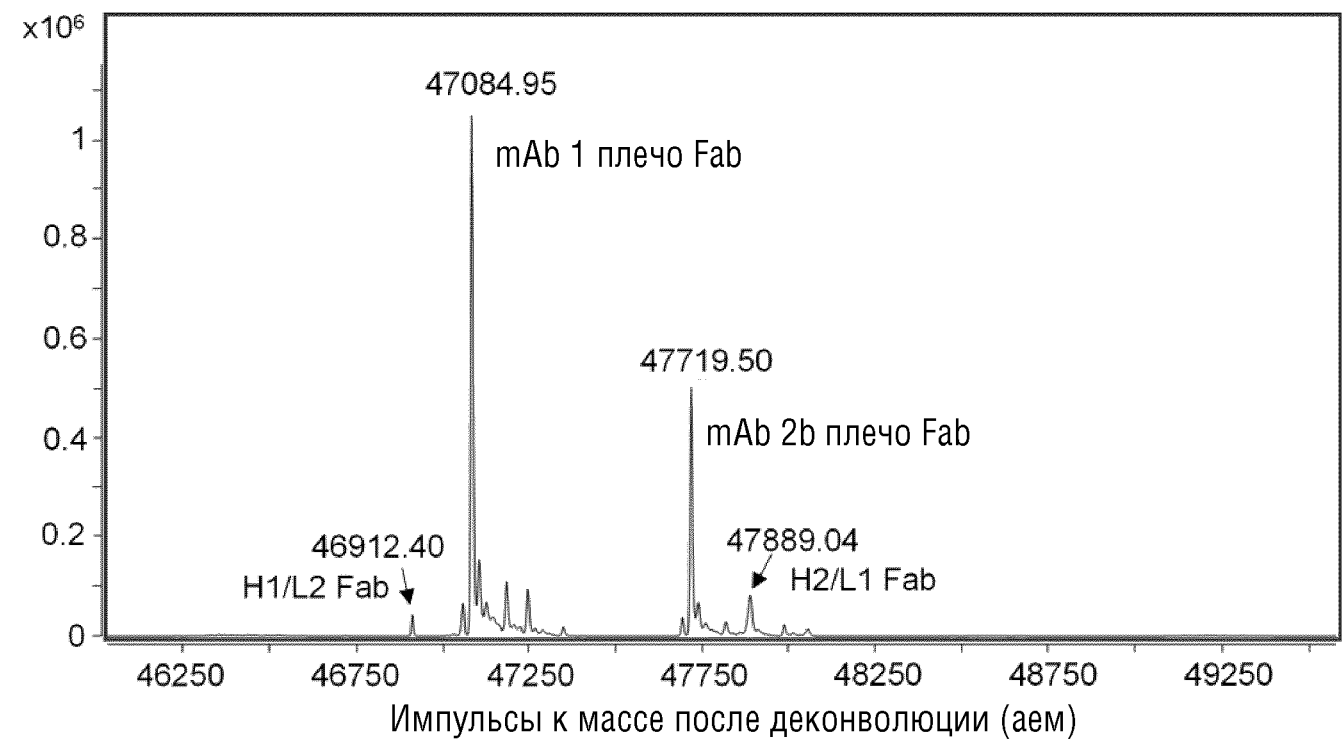


ФИГ.18В



ФИГ.19А

Очищенные только белком А

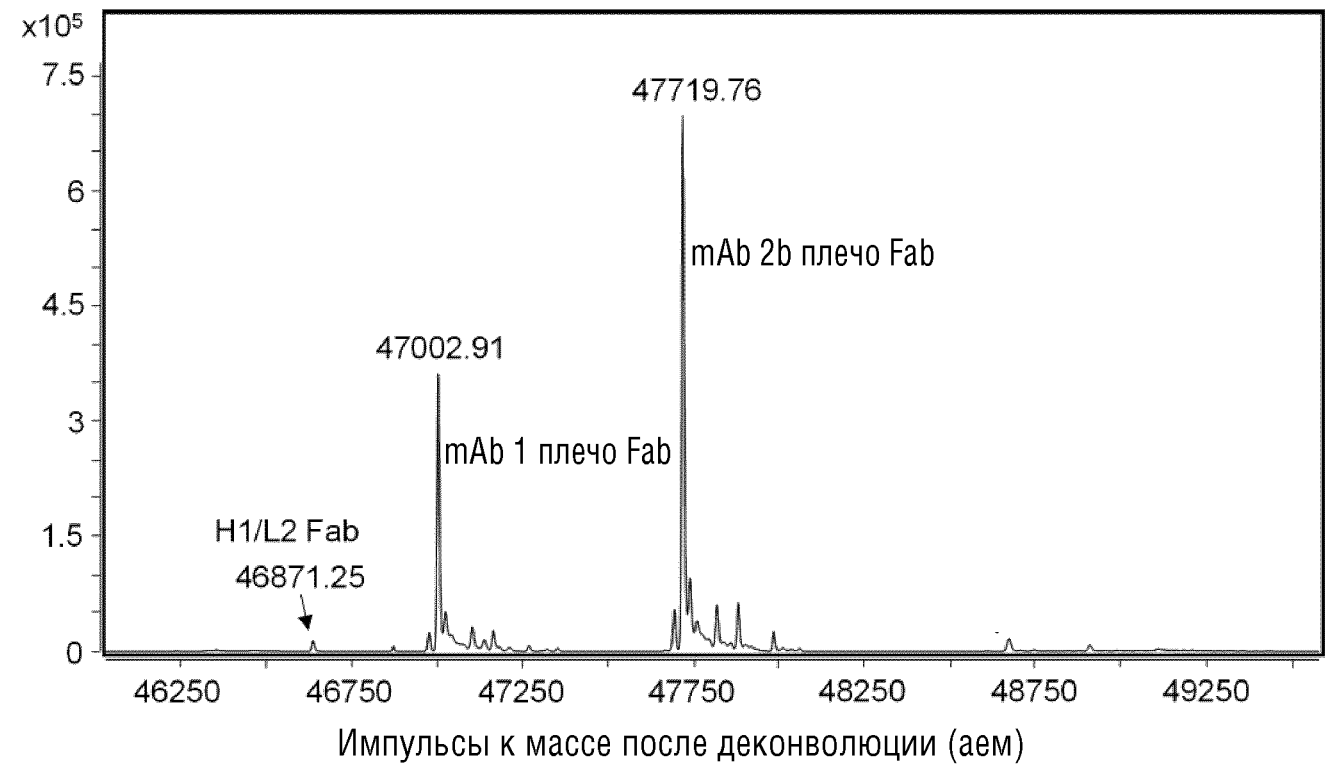


- Антитело, очищенное только белком А, переварено папаином для создания видов Fab

Виды	Рассчитанная масса	Наблюдаемая масса
mAb 1 плечо Fab	47083.46	47084.95
mAb 2b плечо Fab	47718.12	47719.50
H1/L2 Fab	46911.20	46912.40
H2/L1 Fab	47890.38	47889.04

ФИГ.19В

Очищенные только белком А

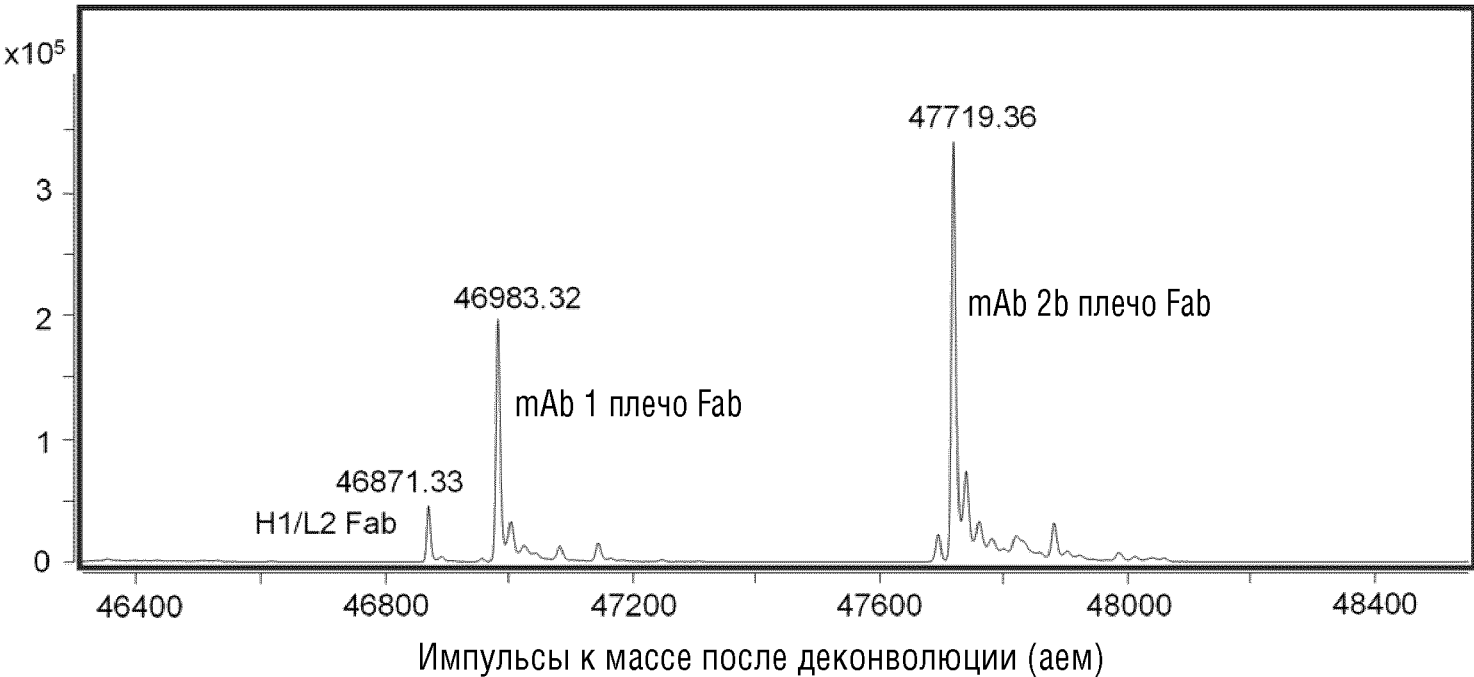


- Антитело, очищенное только белком А, переварено папаином для создания видов Fab

Виды	Рассчитанная масса	Наблюдаемая масса
mAb 1 плечо Fab	47001.27	47002.91
mAb 2b плечо Fab	47718.12	47719.76
H1/L2 Fab	46870.11	46871.25
H2/L1 Fab	47849.28	ND

ФИГ.19С

Очищенные только белком А

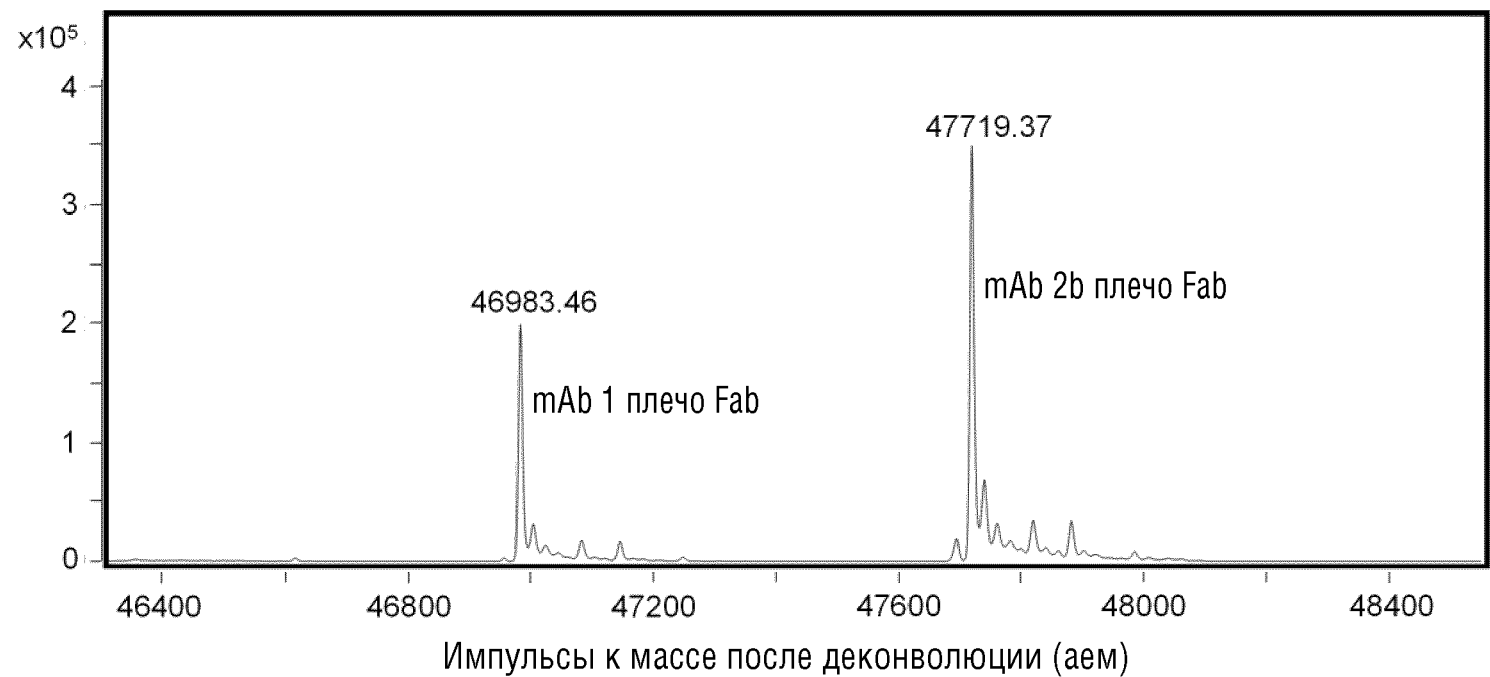


- Антитело, очищенное только белком А, переварено папаином для создания видов Fab

Виды	Рассчитанная масса	Наблюдаемая масса
mAb 1 плечо Fab	46982.27	46983.32
mAb 2b плечо Fab	47718.12	47719.36
H1/L2 Fab	46870.11	46871.33
H2/L1 Fab	47830.28	ND

ФИГ.20

Очищенные белком А и НІС



- Антитело, очищенное белком А и НІС, переварено папаином для создания видов Fab

Виды	Рассчитанная масса	Наблюдаемая масса
mAb 1 плечо Fab	46982.27	46983.46
mAb 2b плечо Fab	47718.12	47719.37
H1/L2 Fab	46870.11	ND
H2/L1 Fab	47830.28	ND