

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044194**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.28

(21) Номер заявки
201990781

(22) Дата подачи заявки
2017.09.22

(51) Int. Cl. **C07K 16/30** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИ-STEAP2 АНТИТЕЛА, КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ STEAP2 И CD3, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/399,256**

(32) **2016.09.23**

(33) **US**

(43) **2019.09.30**

(86) **PCT/US2017/053111**

(87) **WO 2018/058001 2018.03.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Рудж Джон, Дельфино Фрэнк,
Абер Лорик, Смит Эрик, Киришнер
Джессика Р., Кроуфорд Элисон,
Ниттоли Томас (US)**

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

(56) **WO-A2-0226822
WO-A2-2005079490**

WO-A2-03087306

SIKKELAND JØRGEN ET AL: "STAMPing at the crossroads of normal physiology and disease states", MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY, ELSEVIER IRELAND LTD, IE, vol. 425, 18 February 2016 (2016-02-18), pages 26-36, XP029448450, ISSN: 0303-7207, DOI: 10.1016/J.MCE.2016.02.013

VAGHJANI RASILABEN J ET AL: "Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate (STEAP1 and STEAP2)-Differentially Expressed by Murine and Human Mesenchymal Stem Cells", TISSUE ENGINEERING PART A, vol. 15, no. 8, August 2009 (2009-08), pages 2073-2083, XP002775896, ISSN: 1937-3341

WHITELAND HELEN ET AL: "A role for STEAP2 in prostate cancer progression", CLINICAL AND EXPERIMENTAL METASTASIS, SPRINGER NETHERLANDS, NL, vol. 31, no. 8, 24 September 2014 (2014-09-24), pages 909-920, XP035409355, ISSN: 0262-0898, DOI: 10.1007/S10585-014-9679-9 [retrieved on 2014-09-24]

(57) Предложен белок, известный как шеститрансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2 (STEAP2), который экспрессируется на высоком уровне при раке предстательной железы и связан с экспрессией других генов, связанных с раком предстательной железы. Данное изобретение обеспечивает новые полноразмерные человеческие антитела IgG, которые связываются со STEAP2 человека (моноспецифические антитела). Данное изобретение также обеспечивает новые биспецифические антитела (бсАт), которые связываются как со STEAP2, так и с CD3, и активируют Т-клетки через комплекс CD3 в присутствии опухолей, экспрессирующих STEAP2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данное изобретение обеспечивает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека и обезьяны, и вторую антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывает STEAP2 человека. В определенных вариантах осуществления указанные биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению способны ингибировать рост опухолей, экспрессирующих STEAP2. Указанные биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению полезны для лечения заболеваний и расстройств предстательной железы, при которых желателен и/или терапевтически полезен повышенный или индуцированный STEAP2-направленный иммунный ответ. Например, биспецифические антитела согласно изобретению полезны для лечения рака предстательной железы, включая кастрационно-резистентный рак предстательной железы. Данное изобретение также включает конъюгаты анти-STEAP2 антитело-лекарственное средство, которые ингибируют рост опухоли in vivo.

B1**044194****044194 B1**

Ссылка на перечень последовательностей

Данная заявка включает посредством ссылки перечень последовательностей, представленный в машиночитаемой форме в виде файла 10296WO01-Sequence.txt, созданного 22 сентября 2017 года и содержащего 739964 байта.

Область техники

Данное изобретение относится к антителам, и их антигенсвязывающим фрагментам, которые являются специфическими для шеститрансмембранного эпителиального антигена предстательной железы 2 (STEAP2 - six-transmembrane epithelial antigen of prostate 2), и способам их применения. Данное изобретение также относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые связывают STEAP2 и CD3, и способам их применения. Данное изобретение также относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство, содержащим анти-STEAP2 антитело или его фрагмент и терапевтический агент (например, цитотоксический агент).

Уровень техники

Шеститрансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2 (STEAP2), также известный как STEAP-2, металлоредуктаза STEAP2, белок 1, ассоциированный с раком предстательной железы, белок, активируемый при метастатическом раке предстательной железы, шеститрансмембранный белок предстательной железы 1 (STAMP1) и 098P4B6, является интегральным, шестиспиральным трансмембранным белком, который активируется в здоровых и злокачественных клетках предстательной железы. STEAP2, который действует как челнок между комплексом Гольджи и плазматической мембраной, представляет собой металлоредуктазу, которая восстанавливает железо и медь, облегчая их поступление в клетку. STEAP2 в основном локализуется в эпителиальных клетках предстательной железы. STEAP2 также экспрессируется в здоровом сердце, мозге, поджелудочной железе, яичнике, скелетных мышцах, молочной железе, яичке, матке, почках, легких, трахее, толстой кишке и печени. STEAP2 сверхэкспрессируется в раковых тканях, включая опухоли предстательной железы, мочевого пузыря, шейки матки, легких, толстой кишки, почки, молочной железы, поджелудочной железы, желудка, матки и яичников (Gomes, I.M. et al., 2012, Mol. Cancer Res. 10:573-587; Challita-Eid- P.M., et al., 2003, WO 03/087306; Emtage, P.C.R., 2005, WO 2005/079490).

CD3 представляет собой гомодимерный или гетеродимерный антиген, экспрессируемый на Т-клетках в ассоциации с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR), и требуется для активации Т-клеток. Функциональный CD3 образуется из димерной ассоциации двух из четырех различных цепей: эпсилон, зета, дельта и гамма. Димерные конфигурации CD3 включают гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и зета/зета. Было показано, что антитела против CD3 кластеризуют CD3 на Т-клетках, вызывая тем самым активацию Т-клеток способом, сходным с вовлечением TCR молекулами ГКГС, нагруженными пептидом. Таким образом, анти-CD3 антитела были предложены для терапевтических целей, включающих активацию Т-клеток. Кроме того, биспецифические антитела, которые способны связывать CD3 и целевой антиген, были предложены для терапевтического применения, включающего нацеливание иммунных ответов Т-клеток на ткани и клетки, экспрессирующие целевой антиген.

Антигенсвязывающие молекулы, которые нацелены на STEAP2, включая конъюгаты антитело-лекарственное средство, а также биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связывают как STEAP2, так и CD3, будут полезны в планах лечения, в которых желателен специфическое нацеливание и опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, которые экспрессируют STEAP2.

Краткое описание сущности изобретения

В первом аспекте, данное изобретение обеспечивает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются со STEAP2 человека. Антитела согласно данному аспекту изобретения полезны, *inter alia* (среди прочего), для нацеливания на клетки, экспрессирующие STEAP2. Данное изобретение также обеспечивает биспецифические антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают STEAP2 человека и CD3 человека. Биспецифические антитела в соответствии с этим аспектом изобретения полезны, *inter alia*, для нацеливания Т-клеток, экспрессирующих CD3, и для стимуляции активации Т-клеток, *inter alia*, в условиях, когда опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих STEAP2, является полезным или желательным. Например, биспецифические антитела могут направлять CD3-опосредованную активацию Т-клеток на специфические STEAP2-экспрессирующие клетки, такие как клетки опухоли предстательной железы.

Иллюстративные анти-STEAP2 антитела согласно данному изобретению перечислены в табл. 1 и 2 данного документа. В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR) и переменных областей легкой цепи (LCVR), а также определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных анти-STEP2 антител. В табл. 2 приведены идентификаторы последовательностей молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных анти-STEP2 антител.

Данное изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных

вающие фрагменты, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено любым из иллюстративных анти-STEP2 антител, перечисленных в табл. 1. Например, данное изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 250/258 (например, H2M11162N). Способы и технологии идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут быть применены для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, описанных в данном документе. Общепринятые правила, которые могут быть применены для определения границ CDR, включают, например, определение Кабата, определение Чотиа и определение АбМ. В общем случае определение Кабата основано на вариативности последовательности, определение Чотиа основано на местоположении структурных петлевых областей, а определение АбМ является компромиссом между подходами Кабата и Чотиа. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Публичные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в антителе.

Данное изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие анти-STEP2 антитела или их части. Например, данное изобретение обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCDR1, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCDR2, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCDR3, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот LCDR1, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот LCDR2, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1; в определенных вариантах осу-

шествления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот LCDR3, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, при этом HCVR содержит набор из трех CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), при этом набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено любыми иллюстративными анти-STEP2 антителами, перечисленными в табл. 1.

Данное изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, при этом LCVR содержит набор из трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3), при этом набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено любыми иллюстративными анти-STEP2 антителами, перечисленными в табл. 1.

Данное изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как HCVR, так и LCVR, при этом HCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, и при этом LCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую последовательность идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в табл. 2, или по существу подобную последовательность, имеющую последовательность идентичную по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%. В некоторых осуществлениях в соответствии с этим аспектом изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, при этом обе, HCVR и LCVR, получают из того же анти-STEP2 антитела, указанного в табл. 1.

Данное изобретение также обеспечивает рекомбинантный вектор экспрессии, способный к экспрессии полипептида, содержащего вариабельную область тяжелой или легкой цепи анти-STEAP2 антитела. Например, данное изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты, т.е. молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, как указано в табл. 1. Также в объем данного изобретения включены клетки-хозяева, в которые вводили такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антител или фрагментов антител, и выделение антител и фрагментов антител, полученных таким образом.

Данное изобретение включает анти-STEP2 антитела, имеющие модифицированный профиль гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования может быть полезна или антителу, лишенное фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях, модификация галактозилирования может быть сделана для того, чтобы изменить комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ).

В другом аспекте данное изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, который специфически связывает STEAP2, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-STEP2 антитела и второго терапевтического агента. В одном варианте осуществления второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который преимущественно комбинируют с анти-STEP2 антителом.

Дополнительные комбинированные терапии и комбинированные составы, включающие анти-STEP2 антитела согласно данному изобретению, описаны в данном документе в другом месте.

В другом аспекте данное изобретение обеспечивает терапевтические способы для нацеливания/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих STEAP2, с использованием анти-STEP2 антитела согласно изобретению, причем терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей анти-STEP2 антитело согласно изобретению, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых случаях анти-STEP2 антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты) могут быть использованы для лечения рака предстательной железы или могут быть модифицированы для придания им большей цитотоксичности при помощи способов, включая, но не ограничиваясь этим, модифицированные Fc-домены для увеличения АЗКЦ (см., например, Shield et al. (2002) JBC 277: 26733), радиоиммунотерапию, конъюгаты антитело-лекарственное средство или другие способы повышения эффективности абляции опухоли.

Данное изобретение также включает применение анти-STEAP2 антитела согласно изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства (например, рака), связанного с или вызванного STEAP2-экспрессирующими клетками. В одном аспекте изобретение относит-

ся к соединению, содержащему анти-STEP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или к биспецифическому антителу STEAP2хCD3, как описано в данном документе, для применения в медицине. В одном аспекте изобретение относится к соединению, содержащему конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), как описано в данном документе, для применения в медицине.

В еще одном аспекте, данное изобретение обеспечивает моноспецифические анти-STEP2 антитела для диагностических применений, таких как, например, реагенты для визуализации.

В еще одном аспекте изобретение обеспечивает терапевтические способы для стимулирования активации Т-клеток с использованием анти-CD3 антитела или антигенсвязывающей части антитела согласно изобретению, причем терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело.

В другом аспекте данное изобретение обеспечивает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает STEP2-экспрессирующие клетки С4-2 с ЭК50 менее 50 нМ, как измерено при помощи FACS-анализа. В другом аспекте данное изобретение обеспечивает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с и интернализуется STEP2-экспрессирующими клетками С4-2.

Изобретение дополнительно обеспечивает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание со STEAP2 человека с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в табл. 1. В другом аспекте изобретение обеспечивает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание со STEAP2 человека с контрольным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/58; 74/58; 82/58; 90/58; 98/58; 106/114; 122/130; 138/146; 154/162; 170/178; 186/194; 202/210; 218/226; 234/242; 250/258; 266/274; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370; и 378/386.

Кроме того, изобретение обеспечивает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом на STEAP2 человека, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в табл. 1. В другом аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом на STEAP2 человека, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/58; 74/58; 82/58; 90/58; 98/58; 106/114; 122/130; 138/146; 154/162; 170/178; 186/194; 202/210; 218/226; 234/242; 250/258; 266/274; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370; и 378/386.

Изобретение также обеспечивает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает STEAP2 человека, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит: определяющие комплементарность участки (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1; и CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), имеющей аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1. В другом аспекте выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой и легкой цепи пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/58; 74/58; 82/58; 90/58; 98/58; 106/114; 122/130; 138/146; 154/162; 170/178; 186/194; 202/210; 218/226; 234/242; 250/258; 266/274; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370; и 378/386. В еще одном аспекте выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16; 20-22-24-28-30-32; 36-38-40-44-46-48; 52-54-56-60-62-64; 68-70-72-60-62-64; 76-78-80-60-62-64; 84-8 6-88-60-62-64; 92-94-96-60-62-64; 100-102-104-60-62-64; 108-110-112-116-118-120; 124-12 6-128-132-134-136; 140-142-144-148-150-152; 156-158-160-164-166-168; 172-174-176-180-182-184; 188-190-192-19 6-198-200; 204-206-208-212-214-216; 220-222-224-228-230-232; 236-238-240-244-24 6-248; 252-254-256-2 60-262-264; 268-270-272-276-278-280; 284-286-288-292-294-296; 300-302-304-308-310-312; 316-318-320-324-32 6-328; 332-334-336-340-342-344; 348-350-352-356-358-360; 364-366-368-372-374-376; и 380-382-384-388-390-392.

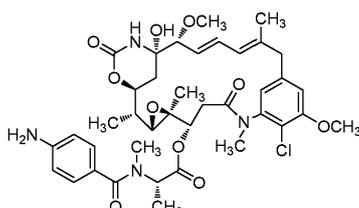
В другом аспекте изобретение обеспечивает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает STEAP2 человека, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) варибельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 74, 82, 90, 98, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, и 378; и (б) варибельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10; 26; 42; 58; 114; 130; 146; 162; 178; 194; 210; 226, 242; 258; 274; 290; 306; 322; 338; 354; 370; и 386. В дополнительном аспекте выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.10, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/58; 74/58; 82/58; 90/58; 98/58; 106/114; 122/130; 138/146; 154/162; 170/178; 186/194; 202/210; 218/226; 234/242; 250/258; 266/274; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370 и 378/386.

В соответствии с другим аспектом данное изобретение обеспечивает конъюгаты антитело-

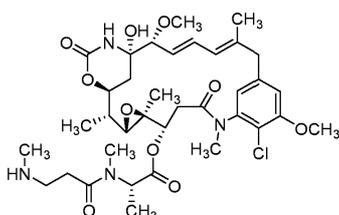
лекарственное средство, содержащие анти-STEAP2 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, и терапевтический агент (например, цитотоксический агент). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и цитотоксический агент ковалентно связаны через линкер, как обсуждается в данном документе. В различных вариантах осуществления анти-STEAP 2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть любым из анти-STEAP 2 антител или фрагментов, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент выбирают из ауристатиона, майтанзиноида, тубулизина, производного томаймицина или производного доластатина. В некоторых случаях цитотоксический агент представляет собой ауристатион, выбранный из MMAE или MMAF, или майтанзиноид, выбранный из DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой майтанзиноид, имеющий структуру формулы (I) или формулы (II), как обсуждается в данном документе.

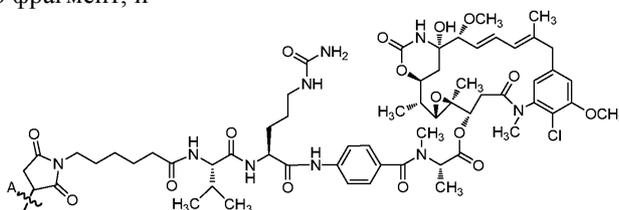
В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой майтанзиноид, имеющий структуру:



В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой майтанзиноид, имеющий структуру:

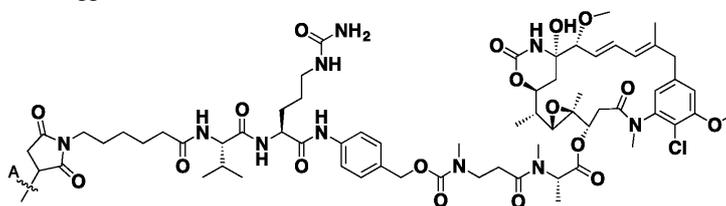


В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство содержит анти-STEAP 2 антитело или его фрагмент, и



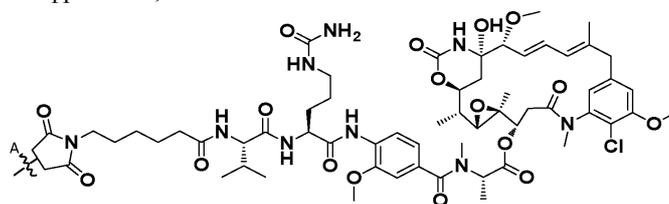
где ---A представляет собой связь с анти-STEAP 2 антителом или его фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство содержит анти-STEAP 2 антитело или его фрагмент, и



где ---A представляет собой связь с анти-STEAP 2 антителом или его фрагментом.

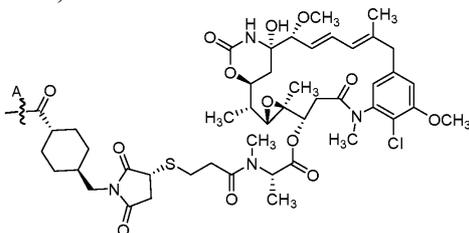
В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство содержит анти-STEAP 2 антитело или его фрагмент, и



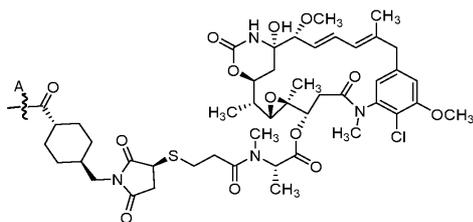
где ---A представляет собой связь с анти-STEAP 2 антителом или его фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления связь с антителом или его фрагментом осуществляется через серную составляющую остатка цистеина.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство содержит анти-STEAP 2 антитело или его фрагмент, и



или



, или

их смесь,

где A представляет собой связь с анти-STEAP 2 антителом или его фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления связь с антителом или его фрагментом осуществляется через азотную составляющую остатка лизина.

В любом из различных вариантов осуществления конъюгатов антитело-лекарственное средство, описанных выше или в данном документе, конъюгат антитело-лекарственное средство может содержать от 1 до 4 цитотоксических агентов на анти-STEAP 2 антитело или его фрагмент.

В соответствии с другим аспектом данное изобретение обеспечивает биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, антитела), которые связывают STEAP2 и CD3. Такие биспецифические антигенсвязывающие молекулы также обозначаются в данном документе как "анти-STEP2/анти-CD3 биспецифические молекулы", "анти-CD3/анти-STEP2 биспецифические молекулы" или "STEAP2xCD3 бсАт (биспецифическое антитело)". Анти-STEP2 часть анти-STEP2/анти-CD3 биспецифической молекулы полезна для нацеливания на клетки (например, опухолевые клетки), которые экспрессируют STEAP2 (например, опухоли предстательной железы), а анти-CD3 часть биспецифической молекулы полезна для активации Т-клеток. Одновременное связывание STEAP2 на опухолевой клетке и CD3 на Т-клетке облегчает направленное уничтожение (лизис клеток) целевой опухолевой клетки при помощи активированной Т-клетки. Следовательно, анти-STEP2/анти-CD3 биспецифические молекулы согласно изобретению, следовательно, полезны, для лечения заболеваний и расстройств, связанных или вызванных STEP2-экспрессирующими опухолями (например, злокачественные новообразования предстательной железы).

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы в соответствии с этим аспектом данного изобретения, содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2. Данное изобретение включает анти-STEP2/анти-CD3 биспецифические молекулы (например, биспецифические антитела), в которых каждый антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), спаренную с переменной областью легкой цепи (LCVR). В некоторых иллюстративных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен анти-CD3 и антигенсвязывающий домен анти-STEP2, каждый из которых содержит разные, определенные HCVR, спаренные с общей LCVR. Например, как показано в примере 4 в данном документе, были сконструированы биспецифические антитела, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, причем первый антигенсвязывающий домен содержит HCVR, полученную из анти-CD3 антитела, спаренную с LCVR, полученную из анти-STEP2 антитела (например, та же LCVR, которая включена в антигенсвязывающий домен анти-STEP2); и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2, причем второй антигенсвязывающий домен содержит HCVR/LCVR, полученную из анти-STEP2 антитела. Другими словами, в иллюстративных молекулах, описанных в данном документе, спаривание HCVR из анти-CD3 антитела с LCVR из анти-STEP2 антитела создает антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 (но не связывает STEAP2). В таких вариантах осуществления первый и второй антигенсвязывающие домены содержат различные HCVR анти-CD3 и анти-STEP2, но имеют общую LCVR анти-STEP2. В других вариантах осуществления изобретения, биспецифические антигенсвязывающие молекулы содержат различные HCVR анти-CD3 и анти-STEP2, но имеют общую LCVR. Ами-

нокислотная последовательность данного LCVR показана, например, в SEQ ID NO: 18 90, и аминокислотные последовательности соответствующих CDR (т.е., LCDR1-LCDR2-LCDR3) показаны в SEQ ID NO: 1892, 1894 и 1896, соответственно. Генетически модифицированные мыши могут быть использованы для получения полностью человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих две разные тяжелые цепи, которые связаны с идентичной легкой цепью, которая содержит вариабельный домен, полученный из одного из двух различных генных сегментов вариабельной области легкой цепи человека. Альтернативно, вариабельные области тяжелых цепей могут быть спарены с одной общей легкой цепью и экспрессироваться рекомбинантно в клетках-хозяевах. Таким образом, антитела согласно изобретению могут содержать тяжелые цепи иммуноглобулина, связанные с одной перестроенной легкой цепью. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит вариабельный домен, полученный из генного сегмента V_κ1-39 человека или генного сегмента V_κ3-20. В других вариантах осуществления легкая цепь содержит вариабельный домен, полученный из генного сегмента V_κ1-39 человека, перестроенного с генным сегментом J_κ5 человека или генным сегментом J_κ1 человека.

Данное изобретение обеспечивает анти-CD3/анти-STEP2 биспецифические молекулы, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит любую из аминокислотных последовательностей HCVR, любую из аминокислотных последовательностей LCVR, любую из пар аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи или любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 легкой цепи, как указано в публикации США 2014/0088295, опубликованной 27 марта 2014 г., и PCT/US2016/044732, поданной 29 июля 2016 г.

Кроме того, данное изобретение обеспечивает анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифических молекул, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит любую из аминокислотных последовательностей HCVR, как указано в таблицах 9, 11 и 15 в данном документе. Первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, может также содержать любую из аминокислотных последовательностей LCVR, как указано в таблицах 1, 9, 12 и 17 в данном документе. Согласно определенным вариантам осуществления первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит любую из пар аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в табл. 9, 11, 12, 15 и 17 в данном документе. Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические молекулы, причем первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи, как указано в табл. 9, 11, и 15 в данном документе, и/или любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 легкой цепи, как указано в таблицах 1, 9, 12 и 17 в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данное изобретение обеспечивает анти-CD3/анти-STEP2 биспецифические молекулы, причем первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 9, 11 и 15 в данном документе, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические молекулы, причем первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1, 9, 12 и 17 в данном документе, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические молекулы, причем первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), как указано в таблицах 9, 11, 12, 15 и 17 в данном документе.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические молекулы, причем первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 9, 11 и 15 в данном документе, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1, 9, 12 и 17 в данном документе, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, как указано в

табл. 9, 11, 12, 15 и 17 в данном документе.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, причем первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 9, 11 и 15 в данном документе, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, имеющий аминокислоту, как указано в табл. 9, 11 и 15, или его по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, имеющий аминокислоту, как указано в табл. 9, 11 и 15, или его по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR1 (LCDR1) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1, 9, 12 и 17 в данном документе, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR2 (LCDR2) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1, 9, 12 и 17 в данном документе, или по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1, 9, 12 и 17 в данном документе, или по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Некоторые неограничивающие, иллюстративные анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, имеющие аминокислотные последовательности, как указано в табл. 9, 11, 12, 15 и 17 в данном документе.

Данное изобретение также обеспечивает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, причем первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, как указано в табл. 9, табл. 11, или табл. 15, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1, табл. 9, табл. 12 или табл. 17.

В другом аспекте данное изобретение обеспечивает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, причем первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1730, 1762 и 1866, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 258.

Кроме того, изобретение обеспечивает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, причем первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека, содержит три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3) и три определяющих комплементарность области легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), причем A1-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1732, 1764, и 1868; A1-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1734, 1766, и 1870; A1-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1736, 1768 и 1872; A1-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260; A1-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262; и A1-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 264.

В еще одном аспекте, данное изобретение обеспечивает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, причем первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека, содержит CDR тяжелой и легкой цепи пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1730/258, 1762/258, и 1866/258.

В другом аспекте данное изобретение обеспечивает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, причем первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека, содержит три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3) и три определяющих комплементарность области легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), и причем второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2 человека, содержит три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3) и три определяющих комплементарность области легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3); причем A1-

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1732, 1764 и 1868; A1-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1736, 1768 и 1872; A1-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1736, 1768 и 1872; A1-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260; A1-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262; и A1-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 264; и причем A2-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 252; A2-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 254; A2-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 256; A2-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260; A2-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262; и A2-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 264.

Некоторые неограничивающие, иллюстративные анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержащий тяжелую цепь, содержащую каркасные области переменных доменов, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из FR1 (SEQ ID NO: 1903), FR2 (SEQ ID NO: 1904), FR3 (SEQ ID NO: 1905) и FR4 (SEQ ID NO: 1906).

В нескольких вариантах осуществления иллюстративные анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению содержат биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, причем первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека, содержит HCVR, содержащий HCDR1-HCDR2-HCDR3, имеющий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1907-1908-1909.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические молекулы, причем второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2, содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 74, 82, 90, 98, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362 и 378, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические молекулы, причем второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2, содержит переменную область легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10; 26; 42; 58; 114; 130; 146; 162; 178; 194; 210; 226; 242; 258; 274; 290; 306; 322; 338; 354; 370; и 386, или его по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические молекулы, причем второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2, содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR) SEQ ID NO: 250/258.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические молекулы, причем второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2, содержит домен CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 256, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 264, или его по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 256/264.

Данное изобретение также обеспечивает анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, причем второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2, содержит домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 76, 84, 92, 100, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, и 380, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 78, 86, 94, 102, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366 и 382, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 80, 88, 96, 104, 112, 128, 144, 160, 176, 182, 208, 224, 240, 256,

272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, и 384, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR1 (LCDR1) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372 и 388, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен легкой цепи CDR2 (LCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, и 390, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376 и 392, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Некоторые неограничивающие, иллюстративные анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению содержат второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2, содержащий домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 252-254-256-260-262-264.

В связанном варианте осуществления данное изобретение включает анти-CD3/анти-STEP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, причем второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2, содержит домены CDR тяжелой и легкой цепи, содержащиеся в последовательностях варибельной области тяжелой и легкой цепи (HCVR/LCVR), выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 250/258.

В другом аспекте данное изобретение обеспечивает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает STEAP2 человека, причем второй антигенсвязывающий домен получен из антителя или антигенсвязывающего фрагмента любого из анти-STEP2 антител согласно изобретению. В дополнительном аспекте изобретение обеспечивает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2 человека.

Кроме того, изобретение обеспечивает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая связывает клетки человека, экспрессирующую CD3 человека, и клетки яванского макака, экспрессирующую CD3 яванского макака. В другом аспекте биспецифическая антигенсвязывающая молекула связывает клетки человека, экспрессирующие STEAP2 человека.

В другом аспекте данное изобретение обеспечивает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая ингибирует рост опухоли у иммунокомпрометированных мышей, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD3 антителя согласно изобретению, антигенсвязывающие фрагменты и их биспецифические антителя были сделаны путем замены аминокислотных остатков исходного ступенчатым образом на основе различий между последовательностью зародышевой линии и последовательностью исходного антителя.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, причем второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание со STEAP2 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, содержащим три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3) и три определяющих комплементарность области легкой цепи (A2-LCDR1, A2-LCDR2 и A2-LCDR3), при этом A2-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 252; A2-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 254; A2-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 256; A2-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260; A2-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262; и A2-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 264. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение обеспечивает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, причем второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание со STEAP2 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, содержащим варибельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 250, и варибельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 258.

В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, причем первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, содержащим три определяющих комплементарность

области тяжелой цепи (A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3) и три определяющих комплементарность области легкой цепи (A1-LCDR1, A1-LCDR2 и A1-LCDR3), при этом A1-HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1732, 1764 и 1868; A1-HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1734, 1766 и 1870; A1-HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1736, 1768 и 1872; A1-LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 260; A1-LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 262; и A1-LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 264. В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, причем первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, содержащим вариательную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1730, 1762 и 1866, и вариательную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 258.

В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, причем первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, содержащим вариательную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1730, 1762 и 1866, и вариательную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 258; и при этом второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание со STEAP2 человека с эталонным антигенсвязывающим белком, содержащим вариательную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 250, и вариательную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 258.

В одном аспекте данное изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую анти-STEP2 антигенсвязывающую молекулу или анти-STEP2/анти-CD3 биспецифическую антигенсвязывающую молекулу и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Изобретение также обеспечивает способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей анти-STEP2 антигенсвязывающую молекулу или анти-STEP2/анти-CD3 биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака легкого, рака толстой кишки, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака матки и рака яичника. В некоторых случаях рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых случаях рак предстательной железы представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы.

В другом аспекте данное изобретение обеспечивает молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR или CDR анти-CD3/анти-STEP2 биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в данном документе, включая молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотидные последовательности, как указано в табл. 2, 10, 13, 14, 16 и 18 в данном документе, а также молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие две или более из полинуклеотидных последовательностей, как указано в табл. 2, 10, 13, 14, 16 и 18 в любой их функциональной комбинации или расположении. Рекомбинантные векторы экспрессии, имеющие нуклеиновые кислоты согласно изобретению, и клетки-хозяева, в которые такие векторы были введены, также включены в изобретение, как и способы получения антител путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антител, и выделения полученных антитела.

Данное изобретение включает анти-CD3/анти-STEP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, причем любой из указанных выше антигенсвязывающих доменов, который специфически связывает CD3, объединяется, соединяется или иным образом связывается с любым из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, который специфически связывает STEAP2, с образованием биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая связывает CD3 и STEAP2.

Данное изобретение включает анти-CD3/анти-STEP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, имеющие модифицированный профиль гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования может быть полезна или антитело, лишённое фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях, модификация галактозилирования может быть сделана для того, чтобы изменить комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ).

В другом аспекте данное изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую анти-CD3/анти-STEP2 биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте данное изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-CD3/анти-STEP2 биспецифической антигенсвязывающей молекулы и второго терапевтического агента. В одном варианте осуществления второй

терапевтический агент представляет собой любой агент, который преимущественно комбинируют с анти-CD3/анти-STEP2 биспецифической антигенсвязывающей молекулой. Иллюстративные агенты, которые могут быть преимущественно комбинированы с анти-CD3/анти-STEP2 биспецифической антигенсвязывающей молекулой, подробно обсуждаются в другом месте данного документа.

В еще одном аспекте данное изобретение обеспечивает терапевтические способы для нацеливания/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих STEAP2, с использованием анти-CD3/анти-STEP2 биспецифической антигенсвязывающей молекулой согласно изобретению, причем терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей анти-CD3/анти-STEP2 биспецифическую антигенсвязывающую молекулу согласно изобретению, субъекту, нуждающемуся в этом.

Данное изобретение также включает использование анти-CD3/анти-STEP2 биспецифической антигенсвязывающей молекулы согласно изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения заболвания или расстройств, связанного или вызванного STEP2-экспрессирующими клетками.

Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображена эффективность H1H7814N-7 в STEP2-положительной модели ксенотрансплантата рака предстательной железы (SCID мыши, имплантированные клетками C4-2) в дозе 10, 20 или 40 мг/кг H1H7814N-7, вводимой на 13 сутки после имплантации.

На фиг. 2 изображена эффективность H1H7814N-7 в STEP2-положительной модели ксенотрансплантата рака предстательной железы (SCID мыши, имплантированные клетками C4-2) в дозе 20 мг/кг H1H7814N-7, вводимой на 14 сутки после имплантации.

На фиг. 3 изображена эффективность H1H7814N-7 в STEP2-положительной модели ксенотрансплантата рака предстательной железы (SCID мыши, имплантированные клетками C4-2) в дозе 150 мг/кг H1H7814N-7, вводимой на 17 сутки после имплантации.

На фиг. 4 изображена эффективность H1H7814N-60 в STEP2-положительной модели ксенотрансплантата рака предстательной железы (SCID мыши, имплантированные клетками C4-2) в дозе 2,5 мг/кг (DAR 3.6 TV) H1H7814N-60, вводимой на 29 сутки после имплантации.

На фиг. 5 изображено связывание биспецифических антител STEAP2xCD3 с клетками Jurkat.

На фиг. 6 изображено связывание биспецифических антител STEAP2xCD3 с клеточной линией рака предстательной железы человека (PC3), сконструированной для экспрессии химерного конструкта STEAP2/1.

На фиг. 7 и 8 изображено связывание биспецифических антител STEAP2xCD3 с Т-клетками яванского макака.

На фиг. 9 изображена индукция пролиферации МКПК человека с помощью биспецифических антител STEAP2xCD3.

На фиг. 10 изображена индукция пролиферации МКПК яванского макака с помощью биспецифических антител STEAP2xCD3.

На фиг. 11 изображено истощение клеток C4-2 (целевых клеток, несущих STEAP2) в анализе цитотоксичности с помощью репрезентативных биспецифических антител STEAP2xCD3 в присутствии МКПК человека.

На фиг. 12 изображена активация Т-клеток человека с помощью иллюстративных биспецифических антител STEAP2xCD3, которые коррелируют с наблюдаемым лизисом целевых клеток, изображенным на фиг. 11.

Подробное описание сущности изобретения

Перед описанием данного изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Следует также понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не предназначена для ограничения, поскольку объем данного изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, что обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Используемый в данном документе термин "около" при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, как используется в данном документе, выражение "около 100" включает в себя 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть применены на практике или при испытании данного изобретения, теперь описаны предпочтительные способы и материалы. Все приведенные в данном документе ссылки, включая заявки на патенты и публикации, включены в данное описание посредством ссылки во всей их полноте для любых целей.

Определения.

Выражение "CD3", используемое в данном документе, относится к антигену, который экспрессируется на Т-клетках в составе мультимолекулярного Т-клеточного рецептора (TCR), и который состоит из гомодимера или гетеродимера, образованного из ассоциации двух из четырех цепей рецептора: CD3-эпсилон, CD3-дельта, CD3-зета и CD3-гамма. CD3-эпсилон человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1897; CD3-дельта человека содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1898. Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в данном документе предназначены для ссылки на человеческий вариант соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что он относится к виду, отличному от человека. Таким образом, выражение "CD3" означает CD3 человека, если не указано, что он относится к виду, отличному от человека, например, "CD3 мыши", "CD3 обезьяны" и т.д.

Используемый в данном документе термин "антитело, которое связывает CD3" или "анти-CD3 антитело" включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают одну субъединицу CD3 (например, эпсилон, дельта, гамма или зета), а также антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают димерный комплекс двух субъединиц CD3 (например, димеры CD3 гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и зета/зета). Антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно данному изобретению могут связывать растворимый CD3 и/или экспрессируемый на клеточной поверхности CD3. Растворимый CD3 включает природные белки CD3, а также варианты рекомбинантных белков CD3, такие как, например, мономерные и димерные конструкторы CD3, которые не имеют трансмембранного домена или иным образом не связаны с мембраной клетки.

Как используется в данном документе, выражение "CD3, экспрессируемый на поверхности клеток" означает один или более белка(ов) CD3, который/которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo* таким образом, что по меньшей мере часть белка CD3 взаимодействует с внеклеточной стороной клеточной мембраны и доступна для антигенсвязывающей части антитела. "Экспрессируемый на клеточной поверхности CD3" включает белки CD3, содержащиеся в пределах функционального Т-клеточного рецептора в мембране клетки. Выражение "CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности" включает белок CD3, экспрессируемый как часть гомодимера или гетеродимера на поверхности клетки (например, димеры CD3 гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и зета/зета). Выражение "CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности" также включает цепь CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма), которая экспрессируется сама по себе, без других типов цепи CD3, на поверхности клетки. "CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности" может включать или состоять из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок CD3. Альтернативно, "CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности" может включать или состоять из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно не экспрессирует CD3 человека на своей поверхности, но была сконструирована искусственно для экспрессии CD3 на ее поверхности.

Выражение "STEAP2", используемое в данном документе, относится к шеститрансмембранному эпителиальному антигену предстательной железы 2. STEAP2 представляет собой интегральный шестиспиральный трансмембранный белок, который экспрессируется на высоком уровне в эпителиальных клетках предстательной железы и является маркером клеточной поверхности для рака предстательной железы, например, было обнаружено, что STEAP2 экспрессируется в значительных количествах на линии клеток предстательной железы LNCaP (Porkka, et al. Lab Invest 2002, 82:1573-1582). STEAP2 (UniProtKB/Swiss-Prot: Q8NFT2.3) представляет собой белок из 490 аминокислот, кодируемый геном STEAP2, расположенным в хромосомной области 7q21 у людей, см., например, аминокислотную последовательность STEAP2 человека, как указано в SEQ ID NO: 1899,

Используемый в данном документе термин "антитело, которое связывает STEAP2" или "анти-STEAP2 антитело" включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают STEAP2.

Термин "антигенсвязывающая молекула" включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, в том числе, например, биспецифические антитела.

Термин "антитело", используемый в данном документе, означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается с или взаимодействует с конкретным антигеном (например, STEAP2 или CD3). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначается в данном документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначается в данном документе как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). V_H- и V_L-области можно далее подразделить на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит

из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца до C-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения, FR анти-STEP2 антитела или анти-CD3 антитела (или их антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека, или могут быть естественными или модифицированы искусственно. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена при помощи параллельного анализа двух или более CDR.

Термин "антитело", используемый в данном документе, также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полноразмерных антител. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобное, как используется в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически модифицированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полноразмерного антитела с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методы генной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаговых антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с применением методов молекулярной биологии, например, для организации одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и тому подобного.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) молекулы одноцепочечных Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb (доменное антитело); и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), такую как пептид CDR3) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и тому подобное), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также охватываются выражением "антигенсвязывающий фрагмент", как применяется в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер, или аминокислотный состав и, как правило, содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом или в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих V_H-домен, ассоциированный с V_L-доменом, V_H- и V_L-домены могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. В альтернативном варианте антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H- или V_L- домен.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие примерные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела согласно данному изобретению, включают: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; и (xiv) V_L-C_L. В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из приведенных выше иллюстративных конфигураций, переменные и константные домены могут быть или напрямую связаны друг с другом, или могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые приводят к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно данному изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или более мономерными V_H- или V_L-доменами (например, дисульфидной связью(связями)).

Как и в случае с молекулами полноразмерных антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими).

Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере два разных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на том же самом антигене. Любой формат мультиспецифических антител, включая описанные в данном документе иллюстративные биспеци-

фические форматы антител, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно данному изобретению с применением обычных методов, доступных в данной области техники.

Антитела согласно данному изобретению могут функционировать посредством комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) или антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). "Комплементзависимая цитотоксичность" (КЗЦ) относится к лизису антигенэкспрессирующих клеток антителом согласно изобретению в присутствии комплемента.

"Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" (АЗКЦ) относится к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, натуральные киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанные антитела на целевой клетке и тем самым приводят к лизису целевой клетки. CDC и ADCC могут быть измерены с использованием анализов, которые хорошо известны и доступны в данной области. (См., например, патенты США №№ 5500362 и 5821337, и Clynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656). Константная область антитела важна для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточнозависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основе того, желательна ли для антитела опосредовать цитотоксичность.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения анти-STEP2 моноспецифические антитела или анти-STEAP2/анти-CD3 биспецифические антитела согласно изобретению представляют собой человеческие антитела. Предполагается, что используемый в данном документе термин "человеческое антитело" включает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела согласно изобретению могут включать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин "человеческое антитело", как используется в данном документе, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такие как мышь, были привиты в каркасную последовательность человека.

Антитела согласно изобретению, в некоторых вариантах осуществления, могут быть рекомбинантными человеческими антителами. Термин "рекомбинантное человеческое антитело", как используется в данном документе, предназначен для включения всех человеческих антител, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, таких как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описано дополнительно ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (описанной дополнительно ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным для генов иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используется трансгенное для последовательностей человеческих Ig животное, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности V_H- и V_L-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и связаны с ними, в естественных условиях не могут существовать в репертуаре зародышевой линии человеческого антитела *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с шарнирной гетерогенностью. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию приблизительно в 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе дисульфидной связью тяжелой цепи между цепями. Во второй форме димеры не связаны через межцепочечные дисульфидные связи, и образуется молекула около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепи (полуантитела). Эти формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки.

Частота возникновения второй формы в различных изотипах интактных IgG обусловлена, но не ограничиваясь этим, структурными различиями, связанными с шарнирной областью изотипа антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области шарнира человеческого IgG4 может значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30: 105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнира человеческого IgG1. Данное изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнире, области C_H2 или C_H3, которые могут быть желательны, например, при производстве, для улучшения выхода желаемой формы антитела.

Антитела согласно изобретению могут представлять собой выделенные антитела. "Выделенное антитело", как используется в данном документе, означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или выделено по меньшей мере из одного компонента его природного окружения. Например,

антитело, которое было отделено или удалено из по меньшей мере одного компонента организма, или из ткани, или клетки, в которой антитело, естественно, существует или продуцируется естественным путем, является "выделенным антителом" для целей данного изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения выделенное антитело может быть по существу свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Данное изобретение также включает одноплечевые антитела, которые связывают STEAP2. Используемый в данном документе термин "одноплечевое антитело" означает антигенсвязывающую молекулу, содержащую одну тяжелую цепь антитела и одну легкую цепь антитела. Одноплечевые антитела согласно данному изобретению могут содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 1.

Анти-STEAP2 или анти-STEP2/анти-CD3 антитела, описанные в данном документе, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации могут быть легко обнаружены путем сравнения описанных в данном документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных антител. Данное изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в данном документе, при этом одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или CDR-областях мутированы с соответствующим остатком(ми) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или с соответствующим остатком(ми) другой последовательности зародышевой линии человека или с консервативной аминокислотной заменой соответствующего зародышевого остатка(ов) (такие изменения последовательности упоминаются в данном документе совместно как "мутации зародышевой линии"). Специалист в данной области техники, начиная с описанных в данном документе последовательностей переменной области тяжелой и легкой цепей, может легко получать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все каркасные остатки и/или остатки CDR в доменах V_H и/или V_L мутируют обратно к остаткам, обнаруженным в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутируют обратно к исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более каркасный остаток(ов) и/или остаток (остатки) CDR мутируют с соответствующим остатком(ми) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательностью зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой было первоначально получено антитело). Кроме того, антитела согласно данному изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных областях и/или CDR-областях, например, при этом определенные отдельные остатки мутируются к соответствующему остатку определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или мутируются с соответствующим остатком другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на одно или более желательных свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, улучшенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), уменьшенную иммуногенность и тому подобное. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные с помощью этого общего способа, охватываются данным изобретением.

Данное изобретение также включает анти-STEP2 или анти-STEP2/анти-CD3 антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе, имеющих одну или более консервативных замен. Например, данное изобретение включает анти-STEP2 или анти-STEP2/анти-CD3 антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и тому подобное консервативных аминокислотных замен по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в табл. 1 в данном документе или в соответствии с описанием в табл. 9, 11, 12, 15 и 17 в данном документе.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в переменной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространствен-

но сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда речь идет о нуклеиновой кислоте или ее фрагменте, указывает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) присутствует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере, в количестве около 95% и более предпочтительно по меньшей мере около 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, как измерено любым известным алгоритмом идентичности последовательностей, таким как FASTA, BLAST или Gap, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, в некоторых случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу подобную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "существенное сходство" или "по существу аналогичный" означает, что две последовательности пептидов при оптимальном выравнивании, например с помощью программ GAP или BESTFIT с применением стандартных штрафов за открытие гэпа, имеют последовательность идентичную на по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно, последовательность идентичную на по меньшей мере 98% или 99%. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентная идентичность последовательности или степень сходства могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы исправить консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включенной в данный документ в качестве ссылки. Примеры групп аминокислот с боковыми цепями с аналогичными химическими свойствами включают: (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, включенной в данный документ посредством ссылки. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка подбирает аналогичные последовательности, применяя измерения сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут применяться с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также могут сравниваться с применением FASTA со стандартными или рекомендованными параметрами, программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой последовательностью и последовательностью поиска (Pearson (2000 год) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки.

Мутации зародышевой линии.

Анти-CD3 антитела, описанные в данном документе, содержат одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой

цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела.

Данное изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, причем одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или CDR-областях мутированы в соответствующий остаток(и) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток(и) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются в данном документе в совокупности как "мутации зародышевой линии") и имеющие слабое или неопределяемое связывание с антигеном CD3. Несколько таких иллюстративных антител, которые распознают CD3, описаны в табл. 12 и 18 данного документа.

Кроме того, антитела согласно данному изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных областях и/или CDR-областях, например, при этом определенные отдельные остатки мутируются к соответствующему остатку определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или мутируются с соответствующим остатком другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно тестировать на одно или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, слабая или пониженная аффинность связывания, улучшенные или увеличенные фармакокинетические свойства, пониженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом с учетом руководства согласно данному изобретению, включены в данное изобретение.

Данное изобретение также включает анти-CD3 антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе, имеющих одну или более консервативных замен. Например, данное изобретение включает анти-CD3 антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.п. консервативными аминокислотными заменами по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в табл. 1, 9, 11, 12, 15 и 17 в данном документе. Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению содержат одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых отдельные антигенсвязывающие домены были получены при сохранении или улучшении желаемого слабого или неопределяемого связывания с антигеном CD3. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка, то есть аминокислотная замена поддерживает или улучшает желаемую слабую или неопределяемую аффинность связывания в случае анти-CD3 связывающих молекул. Примеры групп аминокислот с боковыми цепями с аналогичными химическими свойствами включают: (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-1445. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Данное изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен с аминокислотной последовательностью HCVR и/или CDR, которая по существу идентична любой из аминокислотных последовательностей HCVR и/или CDR, описанных в данном документе, при сохранении или улучшении желаемой слабой аффинности к антигену CD3. Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда он относится к аминокислотной последовательности, означает, что две аминокислотные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, использующих веса гэпов по умолчанию, имеют общую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 98 или 99% идентичность последовательностей. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентная идентичность последовательностей или степень сходства могут быть скорректированы в

большую сторону, чтобы исправить консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка подбирает аналогичные последовательности, применяя измерения сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут применяться с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также могут сравниваться с применением FASTA со стандартными или рекомендованными параметрами, программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой последовательностью и последовательностью поиска (Pearson (2000 год) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

После того, как получены, антигенсвязывающие домены, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии были испытаны на пониженную аффинность связывания с использованием одного или более анализов *in vitro*. Хотя антитела, которые распознают конкретный антиген, обычно подвергают скринингу по назначению путем тестирования на высокую (т.е. сильную) аффинность связывания с антигеном, антитела согласно данному изобретению демонстрируют слабое связывание или неопределяемое связывание. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученных таким общим способом, также включены в данное изобретение и, как было обнаружено, являются предпочтительными в качестве терапии опухолей, обусловленной авидностью.

Неожиданные преимущества, например, улучшенные фармакокинетические свойства и низкая токсичность для пациента могут быть реализованы из способов, описанных в данном документе.

Связывающие свойства антител.

Как использовано в данном документе, термин "связывание" в контексте связывания антитела, иммуноглобулина, антигенсвязывающего фрагмента, или Fc-содержащего белка, или, например, заранее определенного антигена, такого как белок клеточной поверхности или его фрагмент, обычно относится к взаимодействию или ассоциации между минимумом двумя объектами или молекулярными структурами, такому как взаимодействие антитело-антиген.

Например, аффинность связывания, как правило, соответствует значению K_D около 10^{-7} М или менее, например, около 10^{-8} М или менее, например, около 10^{-9} М или менее, когда определяется, например, с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на приборе VIAcore 3000 с использованием антигена в качестве лиганда и антитела, Ig, антителосвязывающего фрагмента или Fc-содержащего белка в качестве аналита (или антитела к лиганду). Клеточные стратегии связывания, такие как проточная цитометрия (FACS), также обычно используются, и данные FACS хорошо коррелируют с другими способами, такими как конкурентное связывание радиолиганда и ППП (Benedict, CA, *J. Immunol Methods.* 1997, 201 (2):223-31; Geuijen, CA, et al. *J. Immunol Methods.* 2005, 302 (1-2):68-77).

Соответственно, антитело или его антигенсвязывающий белок согласно изобретению связывается с заранее определенным антигеном или молекулой клеточной поверхности (рецептором), имеющей аффинность, соответствующую значению K_D , которая по меньшей мере в десять раз ниже, чем ее аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА (бычий сывороточный альбумин), казеин). В соответствии с данным изобретением аффинность антитела, соответствующего значению K_D , которое равно или менее чем в десять раз меньше, чем у неспецифического антигена, можно рассматривать как неопределяемое связывание, однако такое антитело может быть спарено со вторым антигенсвязывающим плечом для получения биспецифического антитела согласно изобретению.

Термин " K_D " (М) относится к диссоциации равновесной константы конкретного взаимодействия антиген-антитело, или диссоциации равновесной константы связывания антитела или антителосвязывающего фрагмента с антигеном. Существует обратная зависимость между K_D и аффинностью связывания, поэтому чем меньше значение K_D , тем выше, то есть сильнее, аффинность. Таким образом, термины "более высокая аффинность" или "более сильная аффинность" относятся к более высокой способности образовывать взаимодействие и, следовательно, к меньшему значению K_D , и наоборот, термины "более низкая аффинность" или "более слабая аффинность" относятся к более низкой способности образовывать взаимодействие и, следовательно, большему значению K_D . В некоторых обстоятельствах более высокая аффинность связывания (или K_D) конкретной молекулы (например, антитела) с ее взаимодействующей

молекулой-партнером (например, антигеном X) по сравнению с аффинностью связывания молекулы (например, антитела) с другой взаимодействующей молекулой-партнером (например, антигеном Y) может быть выражена как отношение связывания, определяемое путем деления большего значения K_D (более низкая или более слабая аффинность) на меньшее значение K_D (более высокая или более сильная аффинность), например, выраженная как 5-кратная или 10-кратная большая аффинность связывания, в зависимости от обстоятельств.

Термин " k_d " (с-1 или 1/с) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антиген-антитело, или к константе скорости диссоциации антитела или антителосвязывающего фрагмента. Указанное значение также упоминается как значение k_{off} .

Термин " k_a " (M-1 x с-1 или 1/M) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, или к константе скорости ассоциации антитела или антителосвязывающего фрагмента.

Термин " K_A " (M-1 или 1/M) относится к константе равновесия ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, или к константе равновесия ассоциации антитела или антителосвязывающего фрагмента. Константу ассоциативного равновесия получают путем деления k_a на k_d .

Термин "ЭК₅₀" или "ЭК₅₀" относится к половине максимальной эффективной концентрации, которая включает концентрацию антитела, которое индуцирует ответ на полпути между исходным уровнем и максимумом после того, как указано время воздействия. ЭК₅₀ по существу представляет собой концентрацию антитела, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта. В некоторых вариантах осуществления значение ЭК₅₀ равно концентрации антитела согласно изобретению, которая дает полумаксимальное связывание с клетками, экспрессирующими CD3 или антиген, ассоциированный с опухолью, как определено, например, с помощью анализа связывания FACS. Таким образом, пониженное или более слабое связывание наблюдается при увеличении ЭК₅₀ или половине значения максимальной эффективной концентрации.

В одном варианте осуществления уменьшение связывания может быть определено как увеличение концентрации ЭК₅₀ антитела, которое дает возможность связывания с полумаксимальным количеством целевых клеток.

В другом варианте осуществления значение ЭК₅₀ представляет собой концентрацию антитела согласно изобретению, которое вызывает полумаксимальное истощение целевых клеток с помощью Т-клеточной цитотоксической активности. Таким образом, повышенная цитотоксическая активность (например, опосредованная Т-клетками гибель опухолевых клеток) наблюдается при сниженном значении ЭК₅₀ или значении полумаксимальной эффективной концентрации.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы.

Антитела согласно данному изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифичные антитела могут быть специфичными для разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные для более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Моноспецифические анти-STEP2 антитела или биспецифические анти-STEP2/анти-CD3 антитела согласно данному изобретению могут быть связаны или совместно экспрессированы с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, для получения биспецифического или мультиспецифического антитела со второй или дополнительной специфичностью связывания.

Использование выражения "анти-CD3 антитело" или "анти-STEP2 антитело" в данном документе предназначено для включения как моноспецифических анти-CD3 или анти-STEP2 антител, а также биспецифических антител, содержащих CD3-связывающее плечо и STEP2-связывающее плечо. Таким образом, данное изобретение включает биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывает CD3 человека, а другое плечо иммуноглобулина является специфичным для STEP2 человека. CD3-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 1, 9, 11, 12, 15 и 17 в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо связывается с CD3 человека и индуцирует активацию Т-клеток человека. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо слабо связывается с CD3 человека и индуцирует активацию Т-клеток человека. В других вариантах осуществления CD3-связывающее плечо слабо связывается с CD3 человека и индуцирует уничтожение ассоциированных с опухолью антигенэкспрессирующих клеток в контексте биспецифического или мультиспецифического антитела. В других вариантах осуществления CD3-связывающее плечо связывается или слабо связывается с CD3 человека и яванского макака (обезьяны), однако связывающее взаимодействие не определяется с помощью анализов *in vitro*, известных в данной области техники. STEP2-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 1 в данном документе.

Согласно некоторым иллюстративным вариантам осуществления данное изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают CD3 и STEAP2. Такие молекулы могут упоминаться в данном документе как, например, биспецифические молекулы "анти-CD3/анти-STEP2", "анти-CD3xSTEAP2" или "CD3xSTEAP2" или в виде другой подобной терминологии (например, анти-STEP2/анти-CD3).

Термин "STEAP2", используемый в данном документе, относится к белку STEAP2 человека, если не указано, что он относится к виду, отличному от человека (например, "STEAP2 мыши", "STEAP2 обезьяны" и т.д.). Белок STEAP2 человека имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1899.

Вышеупомянутые биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают CD3 и STEAP2, могут содержать анти-CD3 антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с CD3 со слабой аффинностью связывания, такими как проявляющую K_D более чем около 40 нМ, как измерено при помощи анализа аффинности связывания *in vitro*. В некоторых случаях CD3-связывающее плечо связывает CD3 с K_D или $ЭК_{50}$, более чем около 100 нМ, более чем около 200 нМ, более чем около 300 нМ, более чем около 400 нМ, более чем около 500 нМ или более чем около 1 мкМ (например, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса). В некоторых случаях первый антигенсвязывающий домен специфически связывает CD3 (например, CD3 человека и/или CD3 яванского макака со слабой или неизмеряемой аффинностью).

Как используется в данном документе, выражение "антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий или состоящий по меньшей мере из одной определяющей комплементарность области (CDR), которая по отдельности или в комбинации с одной или более дополнительными CDR и/или каркасными областями (FR) специфически связывается с конкретным антигеном. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела, как эти термины определены в другом месте данного документа.

Как используется в данном документе, выражение "биспецифическая антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в биспецифической антигенсвязывающей молекуле содержит по меньшей мере одну CDR, которая по отдельности или в комбинации с одной или более дополнительными CDR и/или FR, специфически связывается с конкретным антигеном. В контексте данного изобретения первый антигенсвязывающий домен специфически связывает первый антиген (например, CD3), а второй антигенсвязывающий домен специфически связывает второй отличный антиген (например, STEAP2).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения биспецифическая антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифического антитела содержит варибельный домен тяжелой цепи (HCVR) и варибельный домен легкой цепи (LCVR). В контексте биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей первый и второй антигенсвязывающий домен (например, биспецифическое антитело), CDR первого антигенсвязывающего домена могут обозначаться с приставкой "A1", и CDR второго антигенсвязывающего домена могут обозначаться с приставкой "A2". Таким образом, CDR первого антигенсвязывающего домена могут обозначаться в данном документе как A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3; и CDR второго антигенсвязывающего домена могут обозначаться в данном документе как A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3.

Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть непосредственно или косвенно соединены друг с другом с образованием биспецифической антигенсвязывающей молекулы согласно данному изобретению. Альтернативно, первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен, каждый, могут быть связаны с отдельным мультимеризирующим доменом. Ассоциация одного мультимеризирующего домена с другим мультимеризирующим доменом облегчает ассоциацию между двумя антигенсвязывающими доменами, тем самым образуя биспецифическую антигенсвязывающую молекулу. Используемый в данном документе термин "мультимеризирующий домен" представляет собой любую макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, которая обладает способностью связываться со вторым мультимеризирующим доменом той же или сходной структуры или строения. Например, мультимеризирующий домен может представлять собой полипептид, содержащий домен C_{H3} иммуноглобулина. Неограничивающим примером мультимеризирующего компонента является Fc-часть иммуноглобулина (содержащая домен C_{H2} - C_{H3}), например, Fc-домен IgG, выбранный из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любой аллотип в каждой группе изоформ.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению, как правило, содержат два мультимеризирующих домена, например, два Fc-домена, каждый из которых по отдельности является частью отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй мультимеризирующие домены могут иметь один и тот же изотип IgG, такой как, например, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. Альтернативно, первый и второй мультимеризирующие домены могут иметь разные изоформы IgG, такие как, например, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т.д.

В некоторых вариантах осуществления мультимеризирующий домен представляет собой Fc -фрагмент

или аминокислотную последовательность, содержащую от 1 до около 200 аминокислот в длину, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. В других вариантах осуществления мультимеризующий домен представляет собой остаток цистеина или короткий цистеинсодержащий пептид. Другие мультимеризующие домены включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой молнии, мотива спираль-петля или суперспирального мотива.

Любой формат биспецифического антитела или технология может быть использована для создания биспецифической антигенсвязывающей молекулы согласно данному изобретению. Например, антитело или его фрагмент, имеющий первую антигенсвязывающую специфичность, может быть функционально связан (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, имеющий вторую антигенсвязывающую специфичность для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы. Конкретные иллюстративные биспецифические форматы, которые могут быть применены в контексте данного изобретения, включают, без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диател, гибриды IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрому, выступы-во-впадины, общую легкую цепь (например, обычную легкую цепь с выступами-во-впадины и тому подобное), CrossMab, CrossFab, SEED-тело (суррогатное антитело, антитело, содержащее домен, сконструированный с помощью замены цепей), лейциновую молнию, Duobody, IgG1/IgG2, Fab двойного действия (DAF)-IgG и Mab² (см., например, Klein et al. 2 012, мкАт 4:6, 1-11, и ссылки, цитируемые в них, для обзора вышеупомянутых форматов).

В контексте биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно данному изобретению, мультимеризующие домены, например, Fc-домены, могут включать одно или более аминокислотных изменений (например, вставки, делеции или замены) по сравнению с диким типом, природным вариантом Fc-домена. Например, изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или более модификаций в Fc-домене, что приводит к тому, что модифицированный Fc-домен имеет модифицированное связывающее взаимодействие (например, усиленное или уменьшенное) между Fc и FcRn. В одном варианте осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в области C_H2 или C_H3, причем данная модификация увеличивает аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH варьируется от около 5,5 до около 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификация в положении 428 и/или 433 (например, L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления изобретения, модификация содержит модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Данное изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый домен C_H3 и второй домен C_H3 Ig3, причем первый и второй домены C_H3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере на одну аминокислоту, и причем разница в по меньшей мере одну аминокислоту снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует аминокислотная разница. В одном варианте осуществления первый домен C_H3 Ig связывает белок А, а второй домен C_H3 Ig содержит мутацию, которая уменьшает или отменяет связывание с белком А, также как при модификации H95R (согласно нумерации экзонов IMGT, H435R согласно нумерации EU). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). См., например, патент США № 8586713. Другие модификации, которые могут быть найдены во втором C_H3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EC) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (согласно IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае антител IgG4.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен может быть химерным, сочетающим последовательности Fc, полученные из более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, химерный Fc-домен может содержать часть или всю последовательность C_H2, полученную из области C_H2 человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, и часть или всю последовательность C_H3, полученную из человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Химерный Fc-домен также может содержать химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать последовательность "верхнего шарнира", полученную из человеческого IgG1, человеческого IgG2 или шарнирной области человеческого IgG4, в комбинации с последовательностью "нижнего шарнира", полученной из человеческого IgG1, человеческого IgG2 или шарнирной области человеческого IgG4. Конкретный пример химерного Fc-домена, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих

молекул, изложенных в данном документе, содержит от N- до C-конца: [IgG4 C_H1] - [верхний шарнир IgG4] [нижний шарнир IgG2] - [CH2 IgG4] - [CH3 IgG4]. Другой пример химерного Fc-домена, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, содержит от N- до C-конца: [IgG1 C_H1] - [верхний шарнир IgG1] - [нижний шарнир IgG2] - [CH2 IgG4] - [CH3 IgG1]. Эти и другие примеры химерных Fc-доменов, которые могут быть включены в любую из антигенсвязывающих молекул согласно данному изобретению, описаны в публикации США 2014/0243504, опубликованной 28 августа 2014 г., которая полностью включена в данный документ. Химерные Fc-домены, имеющие эти общие структурные расположения и их варианты, могут иметь измененное связывание с Fc-рецептором, что, в свою очередь, влияет на эффекторную функцию Fc.

В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает тяжелую цепь антитела, в которой константная область тяжелой цепи (CH) содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 1911, SEQ ID NO: 1912, SEQ ID NO: 1913, SEQ ID NO: 1914, SEQ ID NO: 1915, SEQ ID NO: 1916, SEQ ID NO: 1917, SEQ ID NO: 1918, SEQ ID NO: 1919 или SEQ ID NO: 1920. В некоторых вариантах осуществления константная область (CH) тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1911, SEQ ID NO: 1912, SEQ ID NO: 1913, SEQ ID NO: 1914, SEQ ID NO: 1915, SEQ ID NO: 1916, SEQ ID NO: 1917, SEQ ID NO: 1918, SEQ ID NO: 1919 и SEQ ID NO: 1920.

В других вариантах осуществления изобретение обеспечивает тяжелую цепь антитела, причем Fc-домен содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 1921, SEQ ID NO: 1922, SEQ ID NO: 1923 SEQ ID NO: 1924 SEQ ID NO: 1925, SEQ ID NO: 1926, SEQ ID NO: 1927, SEQ ID NO: 1928, SEQ ID NO: 1929 или SEQ ID NO: 1930. В некоторых вариантах осуществления Fc -домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1921, SEQ ID NO: 1922, SEQ ID NO: 1923 SEQ ID NO: 1924 SEQ ID NO: 1925, SEQ ID NO: 1926, SEQ ID NO: 1927, SEQ ID NO: 1928, SEQ ID NO: 1929 и SEQ ID NO: 1930.

Варианты последовательности.

Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены отдельные антигенсвязывающие домены. Такие мутации могут быть легко обнаружены путем сравнения описанных в данном документе аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных антител. Антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению могут содержать антигенсвязывающие домены, которые происходят от любой из иллюстративных аминокислотных последовательностей, описанных в данном документе, при этом одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или у CDR-областях мутированы с соответствующим остатком(ми) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или с соответствующим остатком(ми) другой последовательности зародышевой линии человека или с консервативной аминокислотной заменой соответствующего зародышевого остатка(ов) (такие изменения последовательности упоминаются в данном документе совместно как "зародышевые мутации"). Специалист в данной области техники, начиная с описанных в данном документе последовательностей переменной области тяжелой и легкой цепей, может легко получать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все каркасные остатки и/или остатки CDR в V_H- и/или V_L-доменах мутируют обратно к остаткам, обнаруженным в исходной последовательности зародышевой линии, из которой был первоначально получен антигенсвязывающий домен. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутируют обратно к исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более каркасных остатков(ов) и/или остатков(ки) CDR мутируют с соответствующим остатком(ами) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательность зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой был первоначально получен антигенсвязывающий домен). Кроме того, антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных областях и/или CDR-областях, например, при этом определенные отдельные остатки мутируются с соответствующим остатком определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или мутируются с соответствующим остатком другой последовательности зародышевой линии. После получения антигенсвязывающие домены, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на одно или более желаемых свойств, такие как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или уси-

ленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), пониженная иммуногенность и т. д. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученных таким общим способом, охватываются данным изобретением.

Данное изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, причем один или оба антигенсвязывающих домена содержат варианты любой из описанных в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющих одну или более консервативных замен. Например, данное изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, имеющий аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и тому подобное консервативных аминокислотных замен по отношению к любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. Примеры групп аминокислот с боковыми цепями с аналогичными химическими свойствами включают: (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатически-гидрофильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В альтернативном варианте, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445, включенной в данный документ посредством ссылки. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Данное изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен с аминокислотной последовательностью HCVR, LCVR, и/или CDR, которая по существу идентична любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе. Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда он относится к аминокислотной последовательности, означает, что две аминокислотные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, использующих веса гэпов по умолчанию, имеют общую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичность последовательностей. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентная идентичность последовательностей или степень сходства могут быть скорректированы в большую сторону, чтобы исправить консервативный характер замены. Средства для осуществления этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включенной в данный документ посредством ссылки.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белка подбирает аналогичные последовательности, применяя измерения сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут применяться с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также могут сравниваться с применением FASTA со стандартными или рекомендованными параметрами, программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процент идентичности последовательностей областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой последовательностью и последовательностью поиска (Pearson (2000 год) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, каждый из которых включен в данное описание в качестве ссылки.

pH-зависимое связывание.

Данное изобретение включает анти-STEP2 антитела и анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические

антигенсвязывающие молекулы, с характеристиками pH-зависимого связывания. Например, анти-STEP2 антитело согласно данному изобретению может проявлять пониженное связывание с STEAP2 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Альтернативно, анти-STEP2 антитела согласно изобретению могут проявлять усиленное связывание с STEAP2 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Выражение "кислый pH" включает значения pH менее чем около 6,2, например, около 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. Используемое в данном документе выражение "нейтральный pH" означает pH от около 7,0 до около 7,4. Выражение "нейтральный pH" включает значения pH около 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

В некоторых случаях, "уменьшенное связывание... при кислом pH, по сравнению с нейтральным pH" выражается в терминах соотношения величины K_D связывания антитела со своим антигеном при кислом pH к значению K_D антитела, связывающегося с его антигеном, при нейтральном pH (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как демонстрирующие "пониженное связывание с STEAP2 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH" для целей данного изобретения, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют коэффициент K_D при кислом pH к K_D при нейтральном pH около 3,0 или более. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления коэффициент K_D при кислом pH к K_D при нейтральном pH для антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно данному изобретению может составлять около 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или выше.

Антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, например, путем скрининга популяции антител на сниженное (или повышенное) связывание с определенным антигеном при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на уровне аминокислот могут давать антитела с pH-зависимыми характеристиками. Например, путем замены одной или более аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в CDR) остатком гистидина может быть получено антитело с пониженным связыванием антигена при кислом pH по отношению к нейтральному pH.

Антитела, содержащие Fc-варианты.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения обеспечиваются анти-STEP2 антитела и анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, данное изобретение включает антитела, содержащие мутацию в области C_{H2} или C_{H3} Fc-домена, причем мутация(и) увеличивает аффинность Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH колеблется от около 5,5 до около 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F) ; 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T) ; или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y) ; или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления изобретения, модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 4 33K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Например, данное изобретение включает анти-STEP2 антитела и анти-CD3/анти-STEP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций Fc-домена и других мутаций в переменных доменах антитела, описанных в данном документе, рассматриваются в объеме данного изобретения.

Биологические характеристики антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул.

Данное изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают STEAP2 человека с высокой аффинностью (например, субнаномолярные значения K_D).

Данное изобретение также включает анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые ингибируют рост опухоли у иммунокомпрометированных мышей, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека. (см., например, Пример 5).

Данное изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD3 человека с высокой аффинностью. Данное изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD3 человека со средней или низкой аффинностью, в зависимости от терапевтического контекста и конкретных целевых свойств, которые желательны. Например, в контексте биспецифической антигенсвязывающей молекулы, в которой одно плечо связывает CD3, а

другое плечо связывает целевой антиген (например, STEAP2), может быть желательно, чтобы целевое антигенсвязывающее плечо связывало целевой антиген с высокой аффинностью, в то время как анти-CD3 плечо связывает CD3 только с умеренной или низкой аффинностью. Таким образом, может быть достигнуто предпочтительное нацеливание антигенсвязывающей молекулы на клетки, экспрессирующие целевой антиген, при этом избегая общего/нецелевого связывания CD3 и связанных с ним нежелательных эффектов.

Данное изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела), которые способны одновременно связываться с CD3 человека и STEAP2 человека. Плечо связывания, которое взаимодействует с клетками, которые экспрессируют CD3, может иметь слабое или неопределяемое связывание, как измерено в подходящем анализе связывания *in vitro*. Степень, до которой биспецифическая антигенсвязывающая молекула связывает клетки, которые экспрессируют CD3 и/или STEAP2, может быть оценена с помощью проточной цитометрии (FACS).

Данное изобретение также включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и их биспецифические антитела, которые связываются со STEP2-экспрессирующими клетками и клеточными линиями (например, клетками CA-2), со значением $ЭК_{50}$ между около 1 нМ и 50 нМ, как определено с использованием анализа связывания FACS, как описано в Примере 2, или с использованием по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления антитела, антигенсвязывающие фрагменты и их биспецифические антитела, которые связываются со STEAP2-экспрессирующими клетками и клеточными линиями (например, клетками CA-2), имеют значение $ЭК_{50}$ около 50 нМ, около 40 нМ, около 30 нМ, около 20 нМ, менее чем около 15 нМ, около 10 нМ, около 5 нМ, около 4 нМ, около 3 нМ или около 2 нМ, около 1 нМ, как определено с использованием анализа связывания FACS, как описано в Примере 2, или с использованием по существу аналогичного анализа.

Данное изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты, и их биспецифические антитела, которые связывают CD3 человека со слабой (т.е. низкой) или даже неопределяемой аффинностью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данное изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают CD3 человека (например, при 37°C) с K_D менее чем около 11 нМ, как измерено при помощи поверхностного плазмонного резонанса. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно данному изобретению связывают CD3 с K_D более чем около 15 нМ, более чем около 20 нМ, более чем около 25 нМ, более чем около 30 нМ, более чем около 35 нМ, более чем около 40 нМ, более чем около 45 нМ, более чем около 50 нМ, более чем около 55 нМ, более чем около 60 нМ, более чем около 65 нМ, более чем около 70 нМ, более чем около 75 нМ, по меньшей мере 80 нМ, более чем около 90 нМ, более чем около 100 нМ, более чем около 110 нМ, по меньшей мере 120 нМ, более чем около 130 нМ, более чем около 140 нМ, более чем около 150 нМ, по меньшей мере 160 нМ, более чем около 170 нм, более чем около 180 нМ, более чем около 190 нМ, более чем около 200 нМ, более чем около 250 нМ, более чем около 300 нМ, более чем около 400 нМ, более чем около 500 нМ, или более чем около 1 мкМ или с неопределяемой аффинностью, как измерено при помощи поверхностного плазмонного резонанса (например, формат захвата мкАт или захвата антигена), или при помощи по существу аналогичного анализа.

Данное изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты, и их биспецифические антитела, которые связывают CD3 обезьяны (т.е. яванского макака) со слабой (т.е., низкой) или даже неопределяемой аффинностью.

Данное изобретение включает анти-CD3/анти-STEP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с и интернализуются клетками, экспрессирующими STEAP2 человека, (например, клетками CA-2), как измерено при помощи формата анализа, как определено в Примере 3 в данном документе, или при помощи по существу аналогичного анализа. Данное изобретение включает анти-CD3/анти-STEP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые являются специфичными для связывания с STEAP2 человека. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3/анти-STEP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению связывают STEAP-2 человека, транзитно экспрессируемый в клетках HEK293, как измерено при помощи формата анализа, определенного в примере 3 в данном документе, или при помощи по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3/анти-STEP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению не связываются со STEAP1 человека, STEAP2 человека или STEAP4 человека, транзитно экспрессируемыми в клетках HEK293, как измерено при помощи формата анализа, определенного в примере 3 в данном документе, или при помощи по существу аналогичного анализа.

Данное изобретение включает анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые способны ингибировать рост опухоли C4-2 (см., например, Пример 5). Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления предлагаются анти-CD3/анти-STEP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, при которых однократное введение, например, в дозе около 0,1 мг/кг или около 0,01 мг/кг), вызывает уменьшение размера опухоли по сравнению с животными, которым вводили контрольное изотипическое биспецифическое антитело, при измерении через 46 суток после имплантации опухоли, как обнаружено у субъекта при помощи стандартных методов измерения с использованием циркуля, например, как описано в примере 5 в данном документе.

Данное изобретение также включает конъюгаты анти-STEAP2 антитела с лекарственным препаратом, которые ингибируют рост опухоли в *in vivo* STEAP2 -положительных моделях ксенотрансплантата рака предстательной железы (см., например, Пример 7, или в, по существу, аналогичном анализе). В некоторых вариантах осуществления предоставлены конъюгаты анти-STEP2 антитело-лекарственное средство с соединением 7, причем одна доза в 10, 20 или 40 мг/кг, вводимая на 13 сутки после имплантации опухоли, ингибирует рост опухоли C4-2 в *in vivo* STEP2-положительных моделях ксенотрансплантата рака предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления предоставлены конъюгаты анти-STEP2 антитело-лекарственное средство с соединением 7, причем одна доза в 5 или 20 мг/кг, вводимая на 14 сутки после имплантации, ингибирует рост опухоли C4-2 в *in vivo* STEP2-положительных моделях ксенотрансплантата рака предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления предоставлены конъюгаты анти-STEP2 антитело-лекарственное средство с соединением 7, причем одна доза в 150 мг/кг, вводимая на 17 сутки после имплантации, ингибирует рост опухоли C4-2 в *in vivo* STEP2-положительных моделях ксенотрансплантата рака предстательной железы. В других вариантах осуществления предоставлены конъюгаты анти-STEP2 антитело-лекарственное средство с соединением 60, причем одна доза в по меньшей мере 2,5 мг/кг, вводимая на 29 сутки после имплантации, ингибирует рост опухоли C4-2 в *in vivo* STEP2-положительных моделях ксенотрансплантата рака предстательной железы.

Картирование эпитопов и связанные с ними технологии.

Эпитоп на CD3 и/или STEAP2, с которым связываются антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению, могут состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот CD3 или белка STEAP2. В альтернативном варианте, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) CD3 или STEAP2. Антитела согласно изобретению могут взаимодействовать с аминокислотами, содержащимися в одной цепи CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма), или могут взаимодействовать с аминокислотами в двух или более различных цепях CD3. Используемый в данном документе термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

Различные методы, известные специалистам в данной области техники, могут быть применены для определения того, взаимодействует ли антигенсвязывающий домен антитела с одной или более аминокислотами в полипептиде или белке. Иллюстративные способы включают, например, стандартный эпитоп перекрестный конкурентный анализ, такой как описанные в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., Нью-Йорк), мутационный анализ с аланиновым сканированием, анализ пептидных блотов (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248: 443-463) и анализ расщепления пептидов. Кроме того, могут быть применены такие способы, как вырезание эпитопа, выделение эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Другим способом, который может быть применен для идентификации аминокислот в пределах полипептида, с которым взаимодействует антигенсвязывающий домен антитела, является водород/дейтериевый обмен, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии. В общем, способ водород/дейтериевого обмена включает мечение дейтерием белка интереса с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы обеспечить обмен водород-дейтерия по всем остаткам, кроме остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и анализу с помощью масс-спектрометрии, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehrling (1999) *Analytical Biochemistry* 267 (2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Рентгеновская кристаллография комплекса антиген/антитело может также использоваться для картирования эпитопов.

Данное изобретение дополнительно включает анти-STEP2 антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и любой из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, указанных в табл. 1 в данном документе). Аналогичным образом, данное изобретение также включает анти-STEAP2 антитела, которые конкурируют за связывание с STEAP2 с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, как указано в табл. 1 в данном документе).

Данное изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека и/или

CD3 яванского макака с низкой или детектируемой аффинностью связывания, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2 человека, причем первый антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD3, как и любой из конкретных иллюстративных CD3-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе, и/или в котором второй антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на STEAP2, что и любой из конкретных иллюстративных STEAP2-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе.

Кроме того, данное изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2 человека, в которых первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 с любым из конкретных иллюстративных CD3-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе, и/или в которых второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание со STEAP2 с любым из конкретных иллюстративных STEAP2-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе.

Можно легко определить, связывается ли конкретная антигенсвязывающая молекула (например, антитело) или ее антигенсвязывающий домен с тем же эпитопом, или конкурирует за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой согласно данному изобретению с использованием стандартных способов, известных в данной области техники. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом на STEAP2 (или CD3), что и эталонная биспецифическая антигенсвязывающая молекула согласно данному изобретению, эталонную биспецифическую молекулу сначала оставляют связываться с белком STEAP2 (или белком CD3). Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой STEAP2 (или CD3). Если тестируемое антитело способно связываться со STEAP2 (или CD3) после насыщения связывания с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом STEAP2 (или CD3), в отличие от эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулы. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой STEAP2 (или CD3) после насыщения связывания с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом STEAP2 (или CD3) как и эпитопом, связанным эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой согласно изобретению. Затем может быть проведено дополнительное стандартное исследование (например, пептидная мутация и анализы связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела возникает из-за того, что происходит связывание с тем же эпитопом, что для эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулы, или причина отсутствия наблюдаемого связывания является стерическим блокированием (или другим явлением). Эксперименты такого типа могут быть выполнены с применением ИФА, РИА (радиоиммунологического анализа), Висоге, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, доступного в данной области техники. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антигенсвязывающего белка ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже на 99%, как измерено в конкурентном анализе связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990: 50: 1495-1502). Альтернативно, считается, что два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же эпитопом, если, по существу, все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или устраняют связывание другого. Считается, что два антигенсвязывающих белка имеют "перекрывающиеся эпитопы", если только подмножество аминокислотных мутаций, которые уменьшают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или устраняют связывание другого.

Чтобы определить, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий домен за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, описанная выше методика связывания выполняется в двух ориентациях: в первой ориентации эталонной антигенсвязывающей молекуле позволено связывать белок STEAP2 (или белок CD3) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой STEAP2 (или CD3). Во второй ориентации тестируемому антителу позволяют связываться с молекулой STEAP2 (или CD3) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонной антигенсвязывающей молекулы с молекулой STEAP2 (или CD3). Если в обеих ориентациях только первая (насыщающая) антигенсвязывающая молекула способна связываться с молекулой STEAP2 (или CD3), то делается вывод, что тестируемое антитело и эталонная антигенсвязывающая молекула конкурируют за связывание с STEAP2 (или CD3). Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифических молекул.

Антигенсвязывающие домены, специфические для конкретных антигенов, могут быть получены с помощью любой технологии получения антител, известной в данной области техники. После получения двух разных антигенсвязывающих доменов, специфических для двух разных антигенов (например, CD3 и STEAP2), они могут быть соответствующим образом расположены относительно друг друга для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы согласно данному изобретению с использованием стандартных способов. (Обсуждение иллюстративных форматов биспецифических антител, которые можно использовать для конструирования биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно данному изобретению, приводится в другом месте данного документа). В определенных вариантах осуществления один или более отдельных компонентов (например, тяжелых и легких цепей) мультиспецифических антигенсвязывающих молекул согласно изобретению получены из химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области техники. Например, одну или более тяжелых и/или легких цепей биспецифических антигенсвязывающих молекул, согласно данному изобретению, можно получить с использованием технологии VELOCIMMUNE™. С использованием технологии VELOCIMMUNE™ (или любой другой технологии, генерирующей человеческие антитела) первоначально выделяют химерные антитела с высокой аффинностью к конкретному антигену (например, CD3 или STEAP2), имеющую вариабельную область человека и константную область мыши. Антитела характеризуются и отбираются по желаемым характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т. д. Константные области мыши заменяются желаемой константной областью человека для генерации полностью человеческих тяжелых и/или легких цепей, которые могут быть включены в биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению.

Генетически модифицированные животные могут быть использованы для получения человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул. Например, может быть использована генетически модифицированная мышь, которая не способна реаранжировать и экспрессировать вариабельную последовательность легкой цепи эндогенного иммуноглобулина мыши, причем мышь экспрессирует только один или два вариабельных домена легкой цепи человека, кодируемых последовательностями иммуноглобулина человека, функционально связанными с геном константной области иммуноглобулина мыши в эндогенном локусе каппа мыши. Такие генетически модифицированные мыши могут быть использованы для получения полностью человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих две разные тяжелые цепи, которые связаны с идентичной легкой цепью, которая содержит вариабельный домен, полученный из одного из двух различных генных сегментов вариабельной области легкой цепи человека. (См., например, US 2011/0195454). Термин "полностью человеческий" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или домену иммуноглобулина, содержащему аминокислотную последовательность, кодируемую ДНК, полученной из человеческой последовательности, по всей длине каждого полипептида антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или домена иммуноглобулина. В некоторых случаях полностью человеческой последовательности получают из белка, эндогенного для человека. В других случаях полностью человеческий белок или белковая последовательность содержит химерную последовательность, причем каждая последовательность компонента получают из человеческой последовательности. Не будучи связанными какой-либо одной теорией, химерные белки или химерные последовательности обычно предназначены для минимизации образования иммуногенных эпитопов в соединениях последовательностей компонентов, например, по сравнению с любыми областями или доменами человеческого иммуноглобулина дикого типа.

Биоэквиваленты.

Данное изобретение охватывает антигенсвязывающие молекулы, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от последовательностей описанных в данном документе иллюстративных молекул, но которые сохраняют способность связывать CD3 и/или STEAP2. Такие вариантные молекулы могут содержать одну или более вставок, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных биспецифических антигенсвязывающих молекул.

Данное изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, которые являются биоэквивалентными любым из приведенных иллюстративных антигенсвязывающих молекул, описанных в данном документе. Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, чья скорость и степень абсорбции не проявляют существенной разницы при введении в той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, как в разовой дозе так и в многократной дозе. Некоторые антигенсвязывающие белки будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все же могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражаются в маркировке, являются не существенными для достижения эффективных концентраций лекарственного средства, например, при длительном применении, и считаются с медицинской точки зрения незначимыми для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если не существует клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и эффективности.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может переключаться один или более раз между эталонным препаратом и биологическим препаратом без ожидаемого увеличения риска неблагоприятных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или уменьшенную эффективность по сравнению с продолжающейся терапией без такого переключения.

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

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована способами *in vivo* и *in vitro*. Измерения биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в которых концентрация антитела или его метаболитов измеряется в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости в виде функции от времени; (b) тест *in vitro*, который коррелируется с данными и достоверно прогнозирует данные биодоступности у человека *in vivo*; (c) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в которых соответствующий кратковременный фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется как функция времени; и (d) в хорошо контролируемом клиническом исследовании, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность, или биоэквивалентность антигенсвязывающего белка.

Биоэквивалентные варианты иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, могут быть сконструированы, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков, или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, которые не являются существенными для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами, с целью предотвращения образования ненужных или некорректных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антигенсвязывающие белки могут включать варианты иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, содержащие аминокислотные замены, которые модифицируют характеристики гликозилирования молекул, например, мутации, которые устраняют или прекращают гликозилирование.

Селективность видов и перекрестная реактивность видов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека, но не с CD3 от других видов. Также предоставлены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с STEAP2 человека, но не связываются с STEAP2 других видов. Данное изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека и с CD3 одного или нескольких видов, отличных от человека; и/или антигенсвязывающие молекулы, которые связываются со STEAP2 человека и STEAP2 одного или более видов, отличных от человека.

В соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления изобретения, предложены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека и/или STEAP2 человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от обстоятельств, с одним или более из CD3 и/или STEAP2 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, резуса или шимпанзе. Например, в конкретном иллюстративном осуществлении данного изобретения предложены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3 человека и CD3 яванского макака, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает STEAP2 человека.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC).

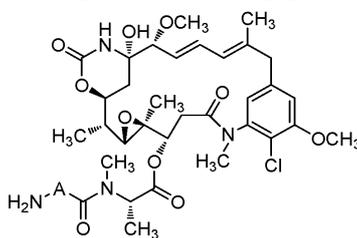
Данное изобретение обеспечивает конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие анти-STEP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с терапевтической молекулой, такой как цитотоксический агент, химиотерапевтический препарат, иммунодепрессант или радиоизотоп. В общих чертах, ADC содержит: A - [L - P]_y, где A представляет собой антигенсвязывающую молекулу, например, анти-STEP2 антитело или его фрагмент (например, фрагмент, содержащий по меньшей мере HCDR3, выбранный из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1), L представляет собой линкер, P представляет собой полезную нагрузку или фрагмент лекарственного средства (например, цитотоксический агент), а y представляет собой целое число от 1 до 30. В различных вариантах осуществления ADC содержит анти-STEP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который содержит CDR HCVR и LCVR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO (например, SEQ ID NO: 2 и 10) перечисленные в табл. 1, или конкретные пары HCVR/LCVR (например, SEQ ID NO: 2/10). В некоторых случаях анти-STEP2 антитело или его фрагмент содержат CDR с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO (например, SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16), приведенными в табл. 1. В некоторых случаях анти-STEP2 антитело или его фрагмент содержат HCVR и LCVR,

имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO (например, SEQ ID NO: 2 и 10), представленные в табл. 1, или пары конкретных аминокислотных последовательностей (например, SEQ ID NO: 2/10).

Цитотоксические агенты включают любой агент, который является вредным для роста, жизнеспособности или размножения клеток. Антигенсвязывающие молекулы или антитела согласно изобретению доставляют эти цитотоксические агенты, называемые в данном документе "полезными нагрузками", в целевые клетки. Примеры подходящих цитотоксических агентов и химиотерапевтических агентов для образования ADC известны в данной области техники.

Примеры подходящих цитотоксических агентов и химиотерапевтических агентов, которые могут быть конъюгированы с анти-STEP2 антителами в соответствии с этим аспектом данного изобретения, включают, например, 1-(2-хлорэтил)-1,2 диметансульфонилгидразид, 1,8-дигидрокси-бицикло[7.3.1]тридека-4,9-диен-2,6-диен-13-он, 1-дегидротестостерон, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, 9-амин-камптотecin, актиномицин D, аманидины, аминоптерин, ангуидин, антрациклин, антрамицин (АМС), ауристатины (монометилловый ауристин Е или монометил ауристин F), блеомицин, бисульфат, масляную кислоту, калихеамицины, камптотecin, карминомицин, кармустин, кемадотиин, цисплатин, колхицин, комбретастатины, циклофосфамид, цитарабин, цитохалазин В, дактиномицин, даунорубин, декарбазин, диацетоксипентилдоксорубин, дибромоманнитол, дигидроксиантрацендион, дисоразолы, доластатин, доксорубин, дуокармицин, эхиномицины, элеутеробины, эметин, эпотилоны, эсперамицин, эстрамустины, бромид этидия, этопозид, фторурацилы, гелданамицины, грамицидин D, глюкокортикоиды, иринотеканы, лептомицины, лейрозины, лидокаин, ломустин (CCNU), майтанзиноиды, мехлорэтамин, мелфалан, меркаптопурины, метоптерины, метотрексат, митрамицин, митомин, митоксантрон, N8-ацетил спермидин, подофиллотоксины, прокаин, пропранолол, птеридины, пирамицин, ризоксины, стрептозотцин, таллисомицины, таксол, тенопозид, тетракаин, тиоэпу, хлорамбуцил, томаймицины, топотеканы, тубулизин, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбины, и производные любого из вышеперечисленного.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления цитотоксический агент, который конъюгирован с анти-STEP2 антителом, представляет собой ауристин, такой как монометилловый ауристин Е (ММАЕ) или монометилловый ауристин F (ММАF), тубулизин, такой как TUB-OH или TUB-OMOM, производное томаймицина, производное доластатина, или майтанзиноид, такой как DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой майтанзиноид, имеющий структуру формулы (I), включая стереоизомеры соединений формулы (I):



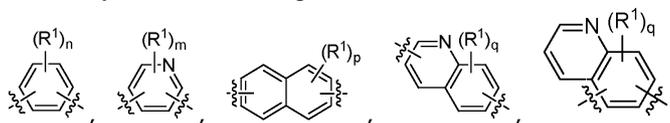
(Формула I)

где А представляет собой арилен или гетероарилен.

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой двухвалентный радикал бензола, пиридина, нафталина или хинолона, которые необязательно замещены.

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой арилен.

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой:



где R¹ независимо представляет собой в каждом случае алкил, алкенил, алкинил, арил, алкарил,

аралкил, галоген, гетероарил, гетероциклоалкил, гидроксил, циано, нитро, $-\text{OR}^A$, $-\text{SO}_2\text{R}^A$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^A$ или азидо

где R^A представляет собой алкил или гетероалкил;

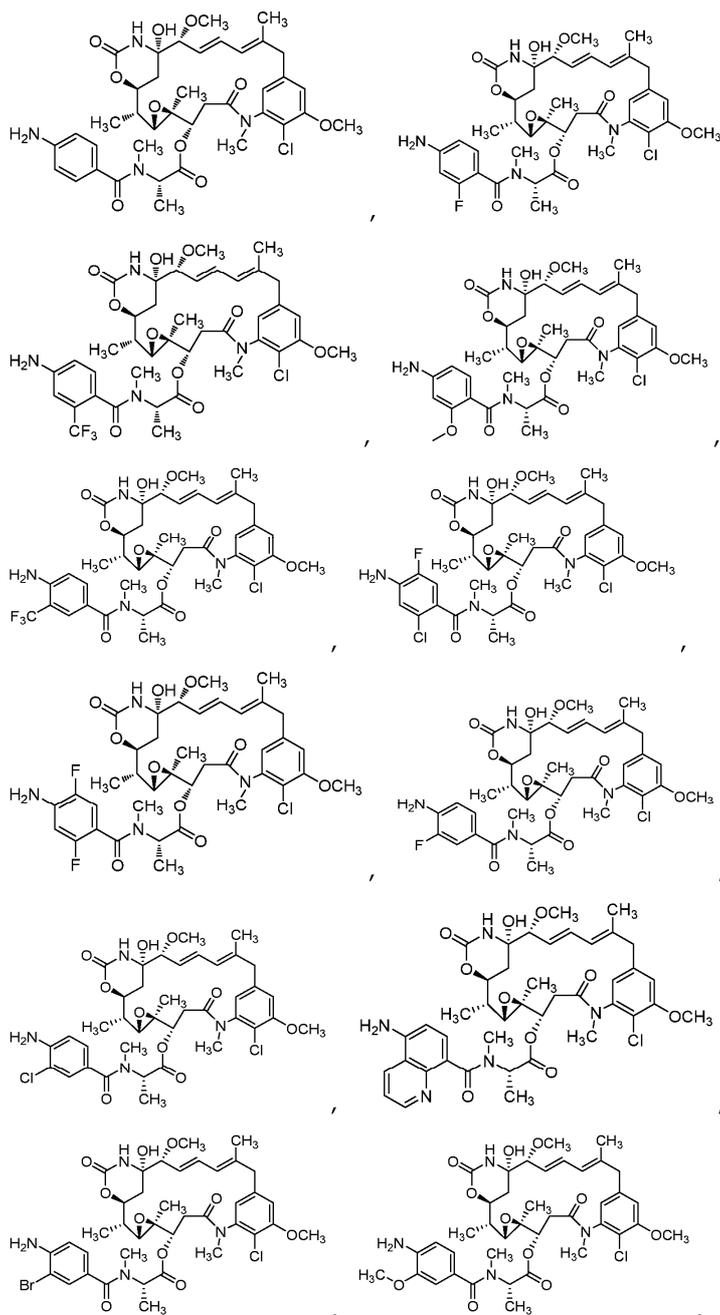
n представляет собой целое число от 0 до 4;

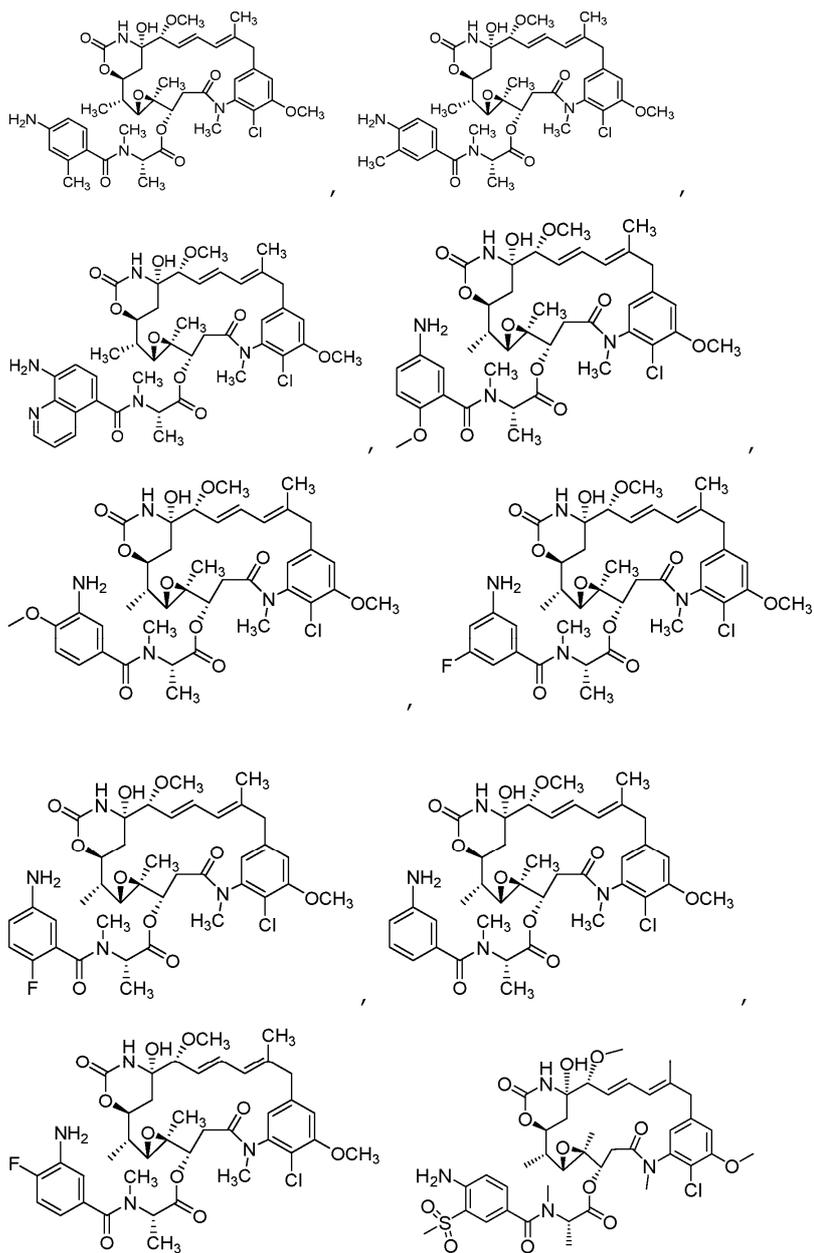
m представляет собой целое число от 0 до 3;

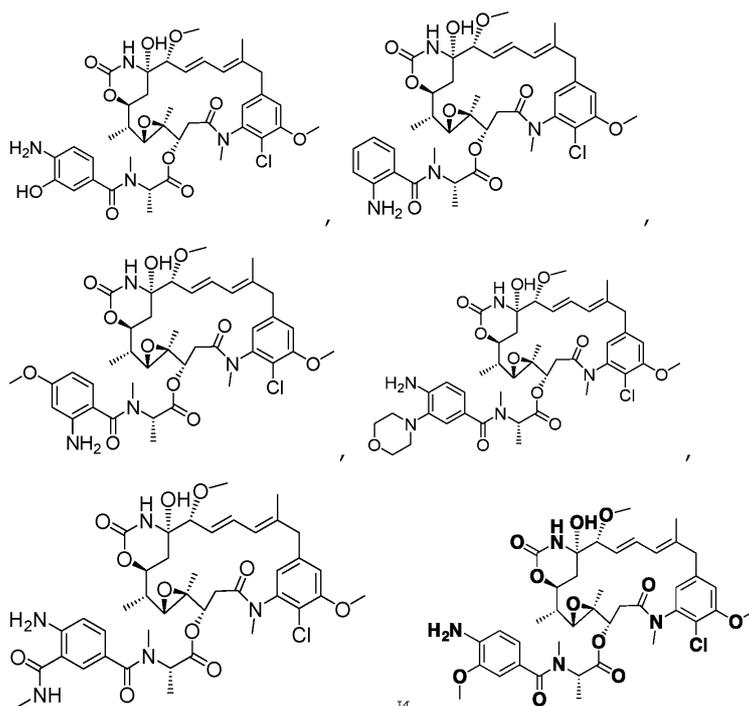
p представляет собой целое число от 0 до 6; и

q представляет собой целое число от 0 до 5.

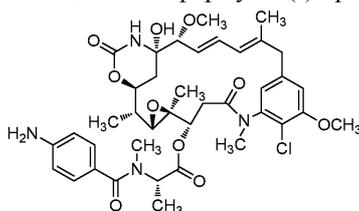
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы I выбирают из группы, состоящей из:



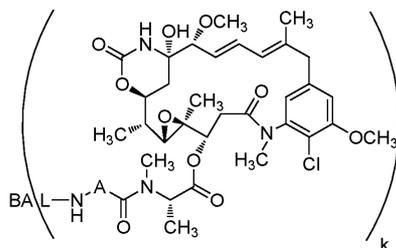




В одном варианте осуществления соединение формулы (I) представляет собой:



В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид формулы (I) конъюгирует с анти-STEP2 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через линкер, как показано в формуле (IA), ниже:



(Формула IA)

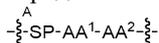
где A представляет собой арилен или гетероарилен, как обсуждалось выше в связи с формулой (I);

L представляет собой линкер;

ВА представляет собой анти-STEP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; и

k представляет собой целое число от 1 до 30.

В различных вариантах осуществления L представляет собой:



где SP представляет собой спейсер;

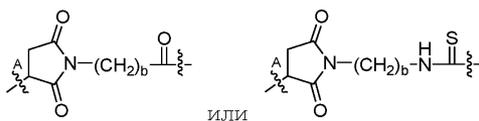
$\frac{A}{2}$ представляет собой одну или более связей с анти-STEP2 антителом или его фрагментом;

AA¹ представляет собой аминокислоту; и

AA² представляет собой аминокислоту.

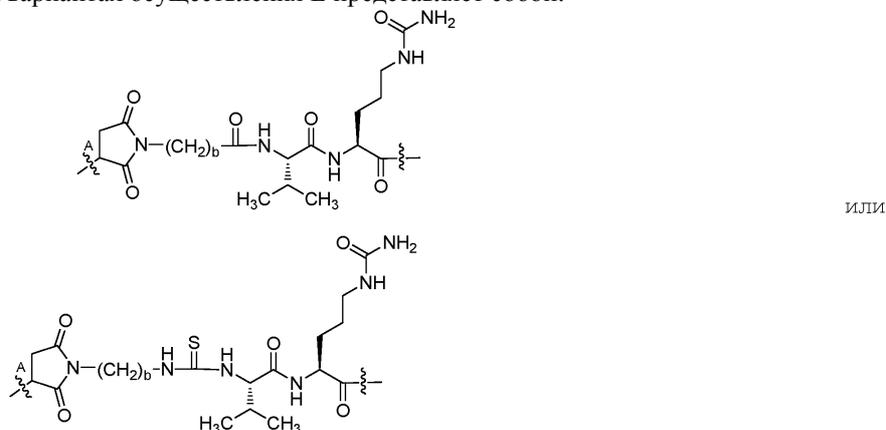
В некоторых вариантах осуществления AA¹-AA² представляет собой: валин-цитруллин, цитруллин-валин, лизин-фенилаланин, фенилаланин-лизин, валин-аспарагин, аспарагин-валин, треонин-аспарагин, аспарагин-треонин, серин-аспарагин, аспарагин-серин, фенилаланин-аспарагин, аспарагин-фенилаланин, лейцин-аспарагин, аспарагин-лейцин, изолейцин-аспарагин, аспарагин-изолейцин, глицин-аспарагин, аспарагин-глицин, глутаминовая кислота-аспарагин, аспарагин-глутаминовая кислота, цитруллин-аспарагин, аспарагин-цитруллин, аланин-аспарагин или аспарагин-аланин.

В некоторых вариантах осуществления SP представляет собой:



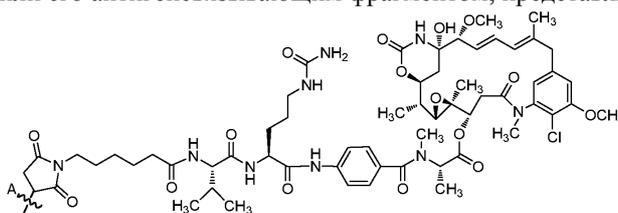
где $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{---}}$ представляет собой связь с анти-STEP2 антителом или его фрагментом; и b представляет собой целое число от 2 до 8.

В других вариантах осуществления L представляет собой:



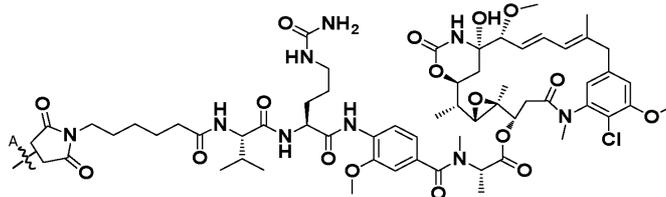
где $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{---}}$ представляет собой связь с анти-STEP2 антителом или его фрагментом; и b представляет собой целое число от 2 до 8.

В одном варианте осуществления соединение формулы (IA), включая линкер, который связывается с анти-STEP2 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представляет собой:



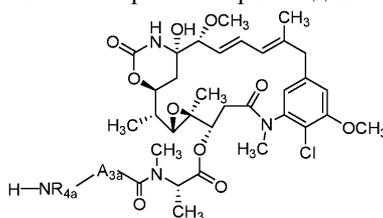
где $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{---}}$ представляет собой связь с анти-STEP2 антителом или его фрагментом. В некоторых случаях данный фрагмент называют "соединением 10".

В одном варианте осуществления соединение формулы (IA), включая линкер, который связывается с анти-STEP2 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представляет собой:



где $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{---}}$ представляет собой связь с анти-STEP2 антителом или его фрагментом. В некоторых случаях этот фрагмент называют "соединением 60".

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой майтанзиноид, имеющий структуру формулы (II), включая стереоизомеры соединений формулы (II):



(Формула II)

где A_{3a} представляет собой аминокислоту, пептид, имеющий 2-20 аминокислот, алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероцикл, $-\text{CR}_5\text{R}_6-$, $-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$,

$-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_x)_{p1}-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{CH}_x)_{p1}-$, $-(\text{CH}_x)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-$, $-(\text{CH}_x)_{p1}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-(\text{O}-(\text{CH}_2)_{p2})_{p3}-$, $-((\text{CH}_2)_{p2}-\text{O})_{p3}-$, $-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$, $-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-$, $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-$, $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$, $-\text{S}-$, $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{NR}_4-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_8)-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-$ или $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_4-$, где алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил и гетероциклил необязательно замещены; и

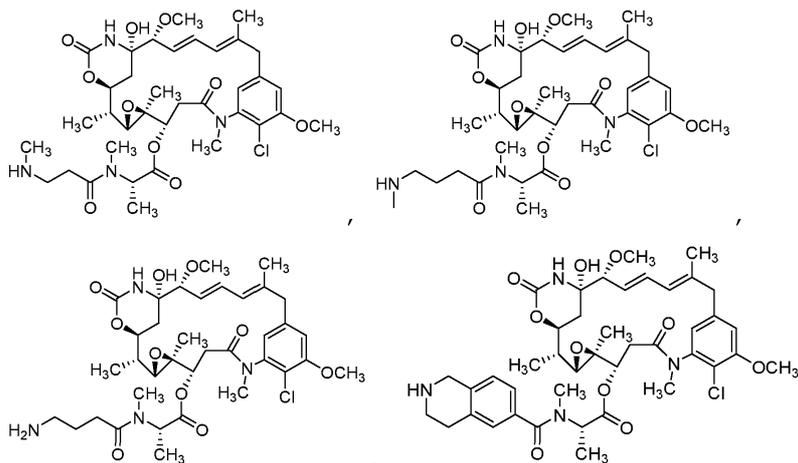
p_1 , p_2 и p_3 каждый независимо представляет собой 0 или целое число от 1 до 100;

x представляет собой 0, 1 или 2;

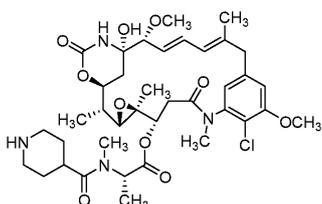
R_4 , R_5 , R_6 и R_8 каждый независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный: алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил или гетероциклил; и

R_{4a} представляет собой замещенный или незамещенный: алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил или гетероциклил.

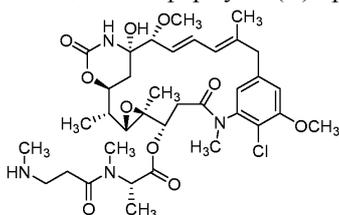
В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (II) выбирают из группы, состоящей из:



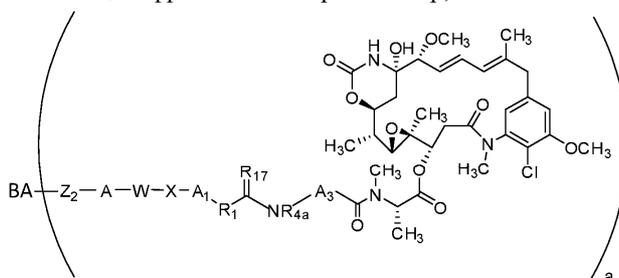
и



В одном варианте осуществления соединение формулы (II) представляет собой:



В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид формулы (II) конъюгирует с анти-STEP2 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через линкер, как показано в формуле (IIA), ниже:



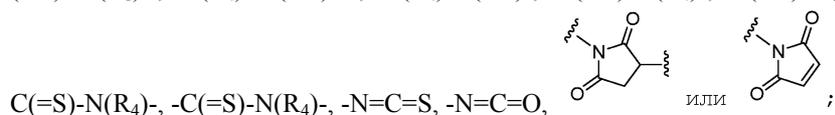
(Формула IIA)

где BA представляет собой анти-STEP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

a представляет собой целое число от 1 до 30;

Z₂ представляет собой следующую структурную формулу: $-\text{Z}_{2A}-\text{Z}_{2B}-\text{Z}_{2C}-\text{Z}_{2D}$, где в каждом Z_{2A}, Z_{2B}, Z_{2C} и Z_{2D} независимо отсутствуют, аминокислота, пептид, имеющий 2-20 аминокислот, алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероциклил, $-\text{CR}_5\text{R}_6-$, $-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$,

$-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}$, $-((CH_2)_{p2}-O)_{p3}$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)-O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, $-O-C(=O)-N(R_4)$, $-O-$



А представляет собой природную или не природную аминокислоту или пептид, содержащий 2-20 аминокислот;

W представляет собой $-O-$, $-S-$, $-CR_5R_6-$, или $-NR_4-$;

X представляет собой арил, гетероарил, циклоалкил или гетероциклический, где арил, гетероарил, циклоалкил и гетероциклический необязательно замещены;

где A_1 , A_3 и R_1 , каждый независимо представляют собой аминокислоту, пептид, имеющий 2-20 аминокислот, алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероциклический, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}$, $-((CH_2)_{p2}-O)_{p3}$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-S-C(=S)-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)-O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$, или $-O-C(=O)-NR_4-$, где алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил и гетероциклический необязательно замещены;

R_{17} выбирают из группы, состоящей из O, S, NR_{18} и CR_5R_6 ;

R_{18} выбирают из группы, состоящей из H, алкила, алкинила, алкенила, циклоалкила, арила, гетероарила, гетероциклического и ацила, где алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероциклический и ацил необязательно замещены;

R_4 , R_5 , R_6 и R_8 каждый независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный: алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил или гетероциклический;

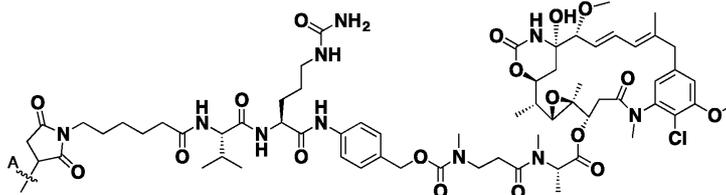
R_{4a} представляет собой замещенный или незамещенный: алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил или гетероциклический.

p_1 , p_2 и p_3 каждый независимо представляет собой 0 или целое число от 1 до 100; и

x представляет собой 0, 1 или 2.

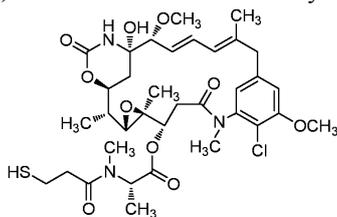
В некоторых вариантах осуществления формулы (IIA), А представляет собой пептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина, цитруллина-валина, лизина-фенилаланина, фенилаланина-лизина, валина-аспарагина, аспарагина-валина, треонина-аспарагина, аспарагина-треонина, серина-аспарагина, аспарагина-серина, фенилаланина-аспарагина, аспарагина-фенилаланина, лейцина-аспарагина, аспарагина-лейцина, изолейцина-аспарагина, аспарагина-изолейцина, глицина-аспарагина, аспарагина-глицина, глутаминовой кислоты-аспарагина, аспарагина-глутаминовой кислоты, цитруллина-аспарагина, аспарагина-цитруллина, аланина-аспарагина и аспарагина-аланина.

В одном варианте осуществления соединение формулы (IIA), которое связывается с анти-STEP2 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представляет собой:



где $\overset{A}{\sim}$ представляет собой связь с анти-STEP2 антителом или его фрагментом. В некоторых случаях данный фрагмент называют "Соединением 7".

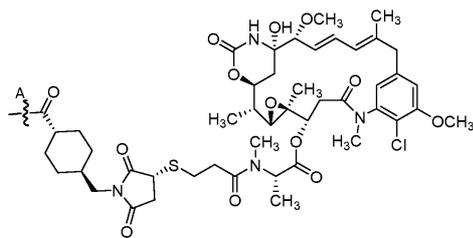
В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент, который конъюгируют с анти-STEP2 антителом или его фрагментом, является чистым или по существу чистым диастереомером DM1:



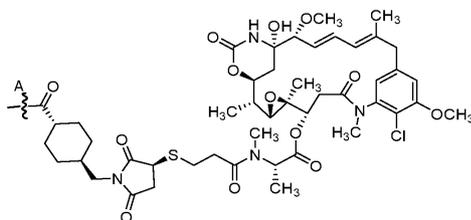
(DM1)

и y представляет собой целое число от 1 до 0.

В другом варианте осуществления ADC содержит структуру "A - [L - P]_y", в которой А представляет собой анти-STEP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и [L - P] представляет собой:



, ИЛИ



, ИЛИ

их смесь, и

где A у представляет собой целое число от 1 до 30, и

представляет собой связь с анти-STEP2 антителом или его фрагментом.

Другие производные майтанзиноида описаны в WO 2014/145090, WO2016/160615, WO 2015/031396 и, каждый из которых включен в данное описание посредством ссылки во всей полноте.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент, который конъюгирует с анти-STEP2 антителом или его фрагментом, представляет собой MMAEM или MMAF.

Другие цитотоксические агенты, известные в данной области техники в пределах объема данного изобретения, в том числе, например, белковые токсины, такие как рицин, токсин *C. difficile*, экзотоксин *Pseudomonas*, дифтерийный токсин, ботулинический токсин, бриодин, сапорин, токсины лаконоса (т.е. фитолактатоксин и фитолактацигенин) и другие, такие как те, которые описаны в Sagra et al., *Pharmacol. & Therapeutics*, 2013, 138:452-469.

Цитотоксические агенты ("полезные нагрузки") могут быть связаны с анти-STEP2 антигенсвязывающей молекулой или антителом согласно изобретению через химический линкер, который ковалентно связывает соединение полезной нагрузки с молекулой белка (т. е., антитело). Иллюстративные варианты осуществления конкретных линкеров обсуждаются выше. В более общем смысле и используемый в данном документе термин "линкер" относится к любой двухвалентной группе или фрагменту, который соединяет, объединяет или связывает связывающий агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) с указанным соединением полезной нагрузки в данном документе. Как правило, подходящие линкеры связывающего агента для конъюгатов антител, описанных в данном документе, представляют собой те, которые являются достаточно стабильными, чтобы использовать период полужизни антитела в кровотоке, и в то же время способны высвобождать его полезную нагрузку после антигеносредствованной интернализации конъюгата. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Расщепляемые линкеры представляют собой линкеры, которые расщепляются посредством внутриклеточного метаболизма после интернализации, например, расщепления посредством гидролиза, восстановления или ферментативной реакции. Нерасщепляемые линкеры представляют собой линкеры, которые высвобождают присоединенную полезную нагрузку посредством лизосомальной деградации антитела после интернализации. Подходящие линкеры включают, но не ограничиваются ими, кислотно-лабильные линкеры, гидролизно-лабильные линкеры, ферментативно расщепляемые линкеры, восстанавливающие лабильные линкеры, саморасщепляющиеся линкеры и нерасщепляемые линкеры. Подходящие линкеры также включают, но не ограничиваются ими, те, которые являются или содержат пептиды, глюкуроны, сукцинимид-тиоэфир, полиэтиленгликолевые (ПЭГ) фрагменты, гидразоны, малькапроильные фрагменты, дипептидные фрагменты, валин-цитруллинные фрагменты и парааминобензил (РАВ) фрагменты. В некоторых случаях линкер способен связываться с антителом или антигенсвязывающим фрагментом через остаток лизина или остаток цистеина (например, посредством расщепления дисульфидной группы антитела или фрагмента или через остаток цистеина, встроенный в антитело или фрагмент). В некоторых случаях линкер способен связываться с антителом или фрагментом через остаток глутамина, в том числе полученный транслугтаминаз-опосредованной конъюгацией.

Иллюстративные линкеры, которые могут быть использованы в контексте данного изобретения, включают линкеры, которые содержат или состоят из, например, МС (6-малеимидапроил), МСС (малеимидометил циклогексан-1-карбоксилат), МР (малеимидопропаноил), val-cit (валин-цитруллин), val-ala (валин-аланин), ala-phe (аланин-фенилаланин), phe-lys (фенилаланин-лизин), сайт дипептида в расщепляемом протеазой линкере, РАВ (п-аминобензилоксикарбонил), SPP (N-сукцинимидил 4-(2-

пиридилтио)пентаноат), SMCC (N-сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), SIAB (N-сукцинимидил (4-йод-ацетил)аминобензоат) и их варианты и комбинации. Дополнительные примеры линкеров, которые можно использовать в контексте данного изобретения, описаны, например, в патенте США № 7754681 и в Ducry, *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21: 5-13, и в приведенных там ссылках, содержание которых полностью включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. В некоторых случаях линкер представляет собой или содержит саморасщепляющийся спейсер, такой как обсуждаемые в Jin, et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012, 20:3465-3469, и Wu, et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2016, 24:2697-2706.

Полезные нагрузки могут быть связаны с анти-STEP2 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом при помощи присоединения в конкретных аминокислотах в пределах антитела или антигенсвязывающей молекулы. Иллюстративные аминокислотные присоединения, которые можно использовать в контексте данного аспекта изобретения, включают, например, лизин (см., например, патент США № 5208020; US 2010/0129314; Hollander et al., *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; патент США № 5714586; US 2013/010154 6; и US 2012/0585592), цистеин (см., например, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; и патент США №. 7750116), селеноцистеин (см., например, WO 2008/122039; и Hofer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2008, 105:12451-12456), формил глицин (см., например, Carrico et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2013, 110:46-51, и Rabuka et al., *Nat. Protocols*, 2012, 10:1052-1067), неприродные аминокислоты (см., например, WO 2013/068874 и WO 2012/166559) и кислые аминокислоты (см., например, WO 2012/05982). Линкеры также могут быть конъюгированы с антигенсвязывающим белком посредством присоединения к углеводам (см., например, US 2008/0305497 и Ryan et al., *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, 13: 127-130) и дисульфидным линкерам (см., например, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611 и Shaunak et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2006, 2: 312-313).

Соотношение лекарственное средство к антителу (DAR) представляет собой среднее число лекарственных средств, конъюгированных с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, которое оказывает важное влияние на эффективность, активность и фармакокинетику ADC. В различных вариантах осуществления DAR составляет от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 молекул лекарственного средства на антитело. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления DAR составляет от 2 до 4. В некоторых случаях DAR составляет от 2 до 3. В некоторых случаях DAR составляет от 3 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 1 до 10, от 1 до 20 или от 1 до 30 (то есть от 1 до 30 молекул лекарственного средства на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент).

Терапевтический состав и введение.

Данное изобретение обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению. Фармацевтические композиции согласно изобретению составляют с подходящими носителями, наполнителями и другими агентами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих составов можно найти в фармакологическом справочнике, известном всем фармацевтическим химикам: Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти лекарственные формы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липид (катионный или анионный), содержащий везикулы (такие как LIPOFECTIN™ Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа "масло в воде" или "вода в масле", эмульсии на основе карбовакса (полиэтиленгликоли с разной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См., также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

Доза антигенсвязывающей молекулы, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, патологических состояний, пути введения и тому подобного. Предпочтительная доза обычно рассчитывается в зависимости от массы тела или площади поверхности тела. Когда биспецифическая антигенсвязывающая молекула согласно данному изобретению используется в терапевтических целях у взрослого пациента, может быть целесообразно вводить внутривенно биспецифическую антигенсвязывающую молекулу согласно данному изобретению, как правило, в однократной дозе от около 0,01 до около 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от около 0,02 до около 7, от около 0,03 до около 5 или от около 0,05 до около 3 мг/кг массы тела. В зависимости от степени тяжести патологического состояния, частота и длительность лечения могут быть скорректированы. Эффективные дозы и схемы введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы могут быть определены опытным путем; например, прогресс пациента можно контролировать путем периодической оценки, и соответствующим образом корректировать дозу. Кроме того, межвидовое приведение доз может быть выполнено с использованием хорошо известных в данной области способов (например, Morgenti et al., 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Различные системы доставки известны и могут быть применены для введения фармацевтической

композиции согласно изобретению, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецепторно-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, но без ограничения, внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути введения. Композиция может вводиться любым подходящим способом, например, при помощи инфузии или болюсной инъекции, абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую оболочку ротовой полости, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и пр.) и может применяться совместно с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным.

Фармацевтическая композиция согласно данному изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно при помощи стандартной иглы и шприца. Кроме того, в отношении подкожной доставки шприц-ручка для доставки легко может применяться для доставки фармацевтической композиции согласно данному изобретению. Такая шприц-ручка может быть многоразовая или одноразовая. В многоразовой шприце-ручке используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Как только вся фармацевтическая композиция внутри картриджа была введена, а картридж становится пустым, пустой картридж можно легко извлечь и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручка для доставки может быть повторно использована. В одноразовой шприце-ручке нет сменного картриджа. Скорее, одноразовую шприц-ручку для доставки заполняют фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. После того как резервуар становится пустым от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывается.

Многочисленные повторно используемые шприц-ручки и шприц-тюбики имеют применение для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно данному изобретению. Примеры включают, но не ограничиваются ими, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бергдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин Лейке, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Франкфурт, Германия), и это лишь некоторые из них. Примеры одноразовых шприцев-ручек для доставки, которые применяются для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, шприц-ручку SOLOSTAR™ (санofi-авентис), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Окс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRATM (Abbott Labs, Абботт Парк, Иллинойс), и это лишь некоторые из них.

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может поставляться в системе контролируемого высвобождения. В одном варианте осуществления может использоваться насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте могут быть использованы полимерные материалы; см., Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Press., Бока-Ратон, Флорида. В еще одном варианте осуществления система контролируемого высвобождения может быть расположена вблизи мишени композиции, таким образом требуется лишь доля системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249: 1527-1533.

Инъекционные формы могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и тому подобного. Эти инъекционные формы могут быть получены общеизвестными способами. Например, инъекционные формы, могут быть получены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно применяемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существуют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и тому подобное, которые могут быть применены в комбинации с соответствующим солюбилизирующим агентом, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтилен (50 моль) аддукт гидрированного касторового масла)] и тому подобное. В качестве масляной среды применяют, например, кунжутное масло, соевое масло и тому подобное, которые могут быть применены в комбинации с солюбилизирующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и тому подобное. Инъекцию, полученную таким образом, предпочтительно, заполняют в соответствующую ампулу.

Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в лекарственной форме в однократной дозе, подбираемой так, чтобы в нее вмещалась доза активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и тому подобное. Количество

содержащегося вышеупомянутого антитела обычно составляет от 5 до 500 мг на лекарственную форму в единичной дозе; особенно в форме инъекции, предпочтительно, чтобы вышеупомянутое антитело сохранилось в количестве от около 5 до около 100 мг и от около 10 до около 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтическое применение антигенсвязывающих молекул.

Данное изобретение включает способы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтической композиции, содержащей анти-STEP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которые специфически связывают CD3 и STEAP2. Терапевтическая композиция может содержать любое из антител или биспецифических антигенсвязывающих молекул, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Используемое в данном документе, выражение "субъект, нуждающийся в этом" означает человека или животное, отличное от человека, которое проявляет один или более симптомов или признаков рака (например, субъект, экспрессирующий опухоль или страдающий от любого из видов рака, упомянутых в данном документе ниже), или того, кому в противном случае было бы полезно ингибирование или снижение активности STEAP2 или истощение STEAP2+ клеток (например, клеток рака предстательной железы).

Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению (и терапевтические композиции, содержащие то же самое) полезны, в частности, для лечения любого заболевания или расстройства, при которых стимуляция, активация и/или нацеливание иммунного ответа было бы полезным. В частности, анти-STEP2 антитела или анти-CD3/анти-STEP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению могут быть использованы для лечения, профилактики и/или ослабления любого заболевания или расстройства, связанного или опосредованного экспрессией или активностью STEAP2, или пролиферацией STEAP2+ клеток. Механизм действия, с помощью которого достигаются терапевтические способы согласно изобретению, включает уничтожение клеток, экспрессирующих STEAP2, в присутствии эффекторных клеток, например, посредством КЗЦ, апоптоза, АЗКЦ, фагоцитоза или путем комбинации двух или более из этих механизмов. Клетки, экспрессирующие STEAP2, которые можно ингибировать или уничтожать с использованием биспецифических антигенсвязывающих молекул согласно изобретению, включают, например, клетки опухоли предстательной железы.

Антигенсвязывающие молекулы согласно данному изобретению можно использовать для лечения, например, первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в предстательной железе, мочевом пузыре, шейке матки, легких, толстой кишке, почках, молочной железе, поджелудочной железе, желудке, матке и/или яичниках. В определенных вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению используют для лечения одного или более из следующих видов рака: рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака легкого, рака толстой кишки, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака матки и рака яичников. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения анти-STEP2 антитела или анти-STEP2/анти-CD3 биспецифические антитела полезны для лечения пациента, страдающего кастрационно-резистентным раком предстательной железы. Согласно другим связанным вариантам осуществления изобретения предложены способы, включающие введение анти-STEP2 антитела или анти-CD3/анти-STEP2 биспецифической антигенсвязывающей молекулы, как описано в данном документе, пациенту, страдающему кастрационно-резистентным раком предстательной железы.

Аналитические/диагностические способы, известные в данной области, такие как сканирование опухоли и т. д., могут быть использованы для определения того, имеет ли пациент опухоль, которая является резистентной к кастрации.

Данное изобретение также включает способы лечения остаточной опухоли у субъекта. Используемый в данном документе термин "остаточная опухоль" означает наличие или присутствие одной или более раковых клеток у субъекта после лечения противораковой терапией.

В соответствии с некоторыми аспектами, данное изобретение обеспечивает способы лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией STEAP2 (например, рака предстательной железы), включающий введение одной или более из анти-STEP2 или биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в другом месте данного документа, субъекту после того, как было определено, что субъект имеет рак предстательной железы (например, кастрационно-резистентный рак предстательной железы). Например, данное изобретение включает способы лечения рака предстательной железы, включающие введение анти-STEP2 антитела или анти-CD3/анти-STEP2 биспецифической антигенсвязывающей молекулы пациенту через 1 сутки, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год или более после того, как субъект получил гормональную терапию (например, антиандрогенную терапию).

Комбинированные терапии и составы.

Данное изобретение обеспечивает способы, которые включают введение фармацевтической композиции, содержащей любое из приведенных в качестве примера антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в данном документе, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами. Иллюстративные дополнительные терапевтические агенты, которые можно

комбинировать или вводить в комбинации с антигенсвязывающей молекулой согласно данному изобретению, включают, например, антагонист EGFR (например, анти-EGFR антитело [например, цетуксимаб или панитумумаб] или низкомолекулярный ингибитор EGFR [например, гефитиниб или эрлотиниб]), антагонист другого члена семейства EGFR, такого как Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, анти-ErbB2, анти-ErbB3 или анти-ErbB4 антитело или низкомолекулярный ингибитор активности ErbB2, ErbB3 или ErbB4), антагонист EGFRvIII (например, антитело, которое специфически связывает EGFRvIII), антагонист cMET (например, анти-cMET антитело), антагонист IGF1R (например, анти-IGF1R антитело), ингибитор B-raf (например, вемурафениб, сорафениб, GDC-0879, PLX-4720), ингибитор PDGFR- α (например, анти-PDGFR- α антитело), ингибитор PDGFR- β (например, анти-PDGFR- β антитело), антагонист VEGF (например, VEGF-ловушка, см., например, US 7087411, (также называемый в данном документе "VEGF-ингибирующий слитый белок"), анти-VEGF антитело (например, бевацизумаб), низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)), антагонист DLL4 (например, анти-DLL4 антитело, описанное в US 2009/0142354 такое как REGN421), антагонист Ang2 (например, анти-Ang2 антитело, описанное в US 2011/0027286, такое как H1H685P), антагонист FOLH1 (PSMA), антагонист PRLR (например, анти-PRLR антитело), антагонист STEAP1 или STEAP2 (например, анти-STEAP1 антитело или анти-STEP2 антитело), антагонист Tmprss2 (например, анти-Tmprss2 антитело), антагонист MSLN (например, анти-MSLN антитело), антагонист CA9 (например, анти-CA9 антитело), антагонист уроплакина (например, антитело против уроплакина) и др. Другие агенты, которые можно выгодно вводить в комбинации с антигенсвязывающими молекулами согласно изобретению, включают ингибиторы цитокинов, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-17, ИЛ-18 или их соответствующими рецепторами. Фармацевтические композиции согласно данному изобретению (например, фармацевтические композиции, содержащие анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, как описано в данном документе) также можно вводить как часть схемы лечения, включающей одну или более терапевтических комбинаций, выбранных из "ICE": ифосфамид (например, Ifex®), карбоплатин (например, Paraplatin®), этопозид (например, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16); "DHAP": дексаметазон (например, Decadron®), цитарабин (например, Cytosar-U®, цитозинарабинозид, ara-C), цисплатин (например, Platinol®-AQ); и "ESHAP": этопозид (например, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), метилпреднизолон (например, Medrol®), цитарабин в высокой дозе, цисплатин (например, Platinol®-AQ).

Данное изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любую из антигенсвязывающих молекул, упомянутых в данном документе, и ингибитор одного или более из VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, Tmprss2, MSLN, CA9, уроплакина или любой из вышеупомянутых цитокинов, причем ингибитор представляет собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, миРНК (малая интерферирующая РНК), пептидное тело, нанотело или фрагмент антитела (например, Fab-фрагмент; F(ab')₂-фрагмент; Fd-фрагмент; Fv-фрагмент; scFv; фрагмент dAt (доменное антитело) или другие сконструированные молекулы, например, диатела, триатела, тетрадела, миниантитела и минимальные единицы распознавания). Антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению также можно вводить и/или совместно составлять в комбинации с противовирусными средствами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами и/или НПВС (нестероидное противовоспалительное средство). Антигенсвязывающие молекулы согласно изобретению также можно вводить как часть схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или обычную химиотерапию.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить непосредственно перед, одновременно или вскоре после введения антигенсвязывающей молекулы согласно данному изобретению; (для целей данного изобретения такие схемы введения считаются введением антигенсвязывающей молекулы "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом).

Данное изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антигенсвязывающая молекула согласно данному изобретению совместно составляется с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентом(ами), как описано в данном документе в другом месте.

Схемы применения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения, несколько доз антигенсвязывающей молекулы (например, анти-STEP2 антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая специфически связывает STEAP2 и CD3) может вводиться субъекту в течение определенного периода времени. Способы в соответствии с данным аспектом изобретения включают последовательное введение субъекту нескольких доз антигенсвязывающей молекулы согласно изобретению. Применяемый в данном документе термин "последовательное введение" означает, что каждая доза антигенсвязывающей молекулы вводится субъекту в разные моменты времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Данное изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту единственной начальной дозы ан-

тигенсвязывающей молекулы, за которой следуют одна или более вторичных доз антигенсвязывающей молекулы, и необязательно сопровождаемая одной или более третичными дозами антигенсвязывающей молекулы.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антигенсвязывающей молекулы согласно изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которая вводится в начале курса лечения (также называемая "исходной дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, вводимые после начальной дозы; а "третичные дозы" представляют собой дозы, вводимые после вторичных доз. Начальные, вторичные и третичные дозы могут содержать одно и то же количество антигенсвязывающей молекулы, но обычно могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. Однако в определенных вариантах осуществления количество антигенсвязывающей молекулы, содержащейся в начальных, вторичных и/или третичных дозах, отличается друг от друга (например, скорректировано вверх или вниз по мере необходимости) в ходе лечения. В некоторых вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале схемы лечения в качестве "нагрузочных доз", а затем последующие дозы, которые вводят менее часто (например, "поддерживающие дозы").

В одном иллюстративном варианте осуществления данного изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят от 1 до 26 (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2}, или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", как она применяется в данном документе, означает, в последовательности множественных введений, дозу антигенсвязывающей молекулы, которую вводят пациенту до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы согласно данному аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антигенсвязывающей молекулы (например, анти-STEP2 антитела или биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывает STEAP2 и CD3). Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводится только одна вторичная доза. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В вариантах осуществления, включающих множественные вторичные дозы, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления изобретения, включающих множество третичных доз, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. Альтернативно, частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может изменяться в течение курса лечения. Частота введения может также регулироваться в ходе курса лечения лечащим врачом в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Диагностические применения антител.

Анти-STEAP2 антитела согласно данному изобретению также могут быть использованы для обнаружения и/или измерения STEAP2 или STEP2-экспрессирующих клеток в образце, например, для диагностических целей. Например, анти-STEP2 антитело или его фрагмент можно использовать для диагностики патологического состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, избыточной экспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) STEAP2. Иллюстративные диагностические анализы для STEAP2 могут включать, например, приведение в контакт образца, полученного от пациента, с анти-STEP2 антителом согласно изобретению, причем анти-STEP2 антитело метят обнаруживаемой меткой или репортерной молекулой. В альтернативном варианте, немеченое анти-STEP2 антитело может применяться в диагностических применениях в комбинации со вторичным антителом, которое само по себе является меченым для детекции. Детектируемая метка или репортерная молекула могут представлять собой радиоизотоп, такой как ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, или ¹²⁵I; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Другое иллюстративное диагностическое применение анти-STEP2 антител согласно изобретению включает ⁸⁹Zr-меченное, такое как ⁸⁹Zr-дезферриоксамин-меченное, антитело с целью неинвазивной идентификации и отслеживания опухолевых клеток у субъекта (например, визуализация позитронно-эмиссионной томографии (PET)). (См., например, Tavare, R. et al. *Cancer Res.* 2016 Jan 1;76 (1) :73-82; и Azad, BB. et al. *Oncotarget.* 2016 Mar 15;7(11):12344-58.) Конкретные иллюстративные анализы, которые могут быть применены для обнаружения или измерения STEAP2 в образце, включают иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (РИА) и проточную цитометрию (FACS).

Образцы, которые могут применяться в диагностических анализах STEAP2 в соответствии с данным изобретением, включают любой образец ткани или жидкости, который можно получить от пациен-

та, который содержит определяемые количества белка STEAP2 или его фрагментов в норме или при патологии. Как правило, уровни STEAP2 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием или патологическим состоянием, связанным с аномальными уровнями или активностью STEAP2) будут измеряться с целью первоначального установления исходного уровня или стандартного уровня STEAP2. Данный исходный уровень STEAP2 можно затем сравнить с уровнями STEAP2, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов, у которых предполагается в наличии связанного со STEAP2 заболевания (например, опухоли, содержащей клетки, экспрессирующие STEAP2) или патологического состояния.

Примеры

Следующие примеры приведены с тем, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как производить и применять способы и композиции изобретения, и не предназначены для ограничения объема изобретения, которое авторы изобретения считают своим изобретением. Предприняты меры для обеспечения точности в отношении применяемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но следует учитывать наличие некоторых экспериментальных погрешностей и отклонений. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1. Получение анти-STEP2 антител.

Анти-STEAP2 антитела получают путем иммунизации генетически модифицированной мыши с использованием человеческого антигена STEAP2 или путем иммунизации модифицированной мыши, содержащей ДНК, кодирующей вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи каппа иммуноглобулина человека с использованием человеческого антигена STEAP2.

Генетически модифицированные мыши были иммунизированы антигеном hSTEAP2 (SEQ ID: 1899). После иммунизации спленоциты забирали от каждой мыши и (1) сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и образования клеток гибридомы и скринировали на специфичность к STEAP2, или (2) сортировали В-клетки (как описано в US 2007/0280945A1) с использованием фрагмента STEAP2 человека в качестве сортирующего реагента, который связывает и идентифицирует реактивные антитела (антиген-позитивные В-клетки).

Первоначально были выделены химерные антитела к STEAP2, имеющие вариабельную область человека и константную область мыши. Антитела были охарактеризованы и отобраны по желаемым характеристикам, включая аффинность, селективность и т. д. При необходимости константные области мыши были заменены желаемой константной областью человека, например, константной областью дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4, для генерации полностью человеческого анти-STEP2 антитела. Несмотря на то, что выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, вариабельная область обеспечивает высокоаффинные антигенсвязывающие и специфичные к цели характеристики. Обозначения названий антител, такие как H1H11243N и H1M7804N, обозначают полностью человеческие антитела "H1H" или химерные антитела "H1M" с вариабельными областями человека/константными областями мыши. Антитела, идентифицированные гибридным способом, обозначены идентификационными номерами антител, заканчивающимися на "N" или "N2". Антитела, идентифицированные способом сортировки В-клеток, обозначены идентификационными номерами антител, заканчивающимися на "P" или "P2".

Некоторые биологические свойства иллюстративных анти-STEP2 антител, полученных в соответствии со способами данного примера, подробно описаны в примерах, приведенных ниже.

Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот вариабельной области тяжелой и легкой цепей анти-STEP2 антител.

В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотной последовательности вариабельных областей и CDR тяжелой и легкой цепи выбранных анти-STEP2 антител согласно изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты приведены в табл. 2.

Таблица 1

Идентификаторы аминокислотной последовательности

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H11243N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H11878P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H11880P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H11888P2	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H11892P2	66	68	70	72	58	60	62	64
H1H11893P2	74	76	78	80	58	60	62	64
H1H11894P2	82	84	86	88	58	60	62	64
H1H11895P2	90	92	94	96	58	60	62	64
H1H11896P2	98	100	102	104	58	60	62	64
H1H11897P2	106	108	110	112	114	116	118	120
H1H7968P	122	124	126	128	130	132	134	136
H1H7969P	138	140	142	144	146	148	150	152
H1H7970P	154	156	158	160	162	164	166	168
H1H7971P	170	172	174	176	178	180	182	184
H1H7972P	186	188	190	192	194	196	198	200
H1M7804N	202	204	206	208	210	212	214	216
H1M7814N	218	220	222	224	226	228	230	232
H1M7832N	234	236	238	240	242	244	246	248
H2M11162N	250	252	254	256	258	260	262	264
H2M11163N	266	268	270	272	274	276	278	280
H2M11164N	282	284	286	288	290	292	294	296
H2M7806N	298	300	302	304	306	308	310	312
H2M7807N	314	316	318	320	322	324	326	328
H2M7809N	330	332	334	336	338	340	342	344
H2M7810N	346	348	350	352	354	356	358	360
H2M7811N	362	364	366	368	370	372	374	376
H2M7812N	378	380	382	384	386	388	390	392

Таблица 2

Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H11243N	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H11878P	17	19	21	23	25	27	29	31

H1H11880P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H11888P2	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H11892P2	65	67	69	71	73	75	77	79
H1H11893P2	73	75	77	79	81	83	85	87
H1H11894P2	81	83	85	87	89	91	93	95
H1H11895P2	89	91	93	95	97	99	101	103
H1H11896P2	97	99	101	103	105	107	109	111
H1H11897P2	105	107	109	111	113	115	117	119
H1H7968P	121	123	125	127	129	131	133	135
H1H7969P	137	139	141	143	145	147	149	151
H1H7970P	153	155	157	159	161	163	165	167
H1H7971P	169	171	173	175	177	179	181	183
H1H7972P	185	187	189	191	193	195	197	199
H1M7804N	201	203	205	207	209	211	213	215
H1M7814N	217	219	221	223	225	227	229	231
H1M7832N	233	235	237	239	241	243	245	247
H2M11162N	249	251	253	255	257	259	261	263
H2M11163N	265	267	269	271	273	275	277	279
H2M11164N	281	283	285	287	289	291	293	295
H2M7806N	297	299	301	303	305	307	309	311
H2M7807N	313	315	317	319	321	323	325	327
H2M7809N	329	331	333	335	337	339	341	343
H2M7810N	345	347	349	351	353	355	357	359
H2M7811N	361	363	365	367	369	371	373	375

Пример 2. Антитела против STEAP2 человека селективно связываются с клеточными линиями, экспрессирующими STEAP2, посредством FACS.

Способность анти-STEP2 антител селективно связываться с клеточными линиями, эндогенно экспрессирующими человеческий шеститрансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2 (STEAP2), определяли с помощью анализа FACS.

Вкратце, 1×10^5 клеток инкубировали с 10 мкг/мл анти-STEAP2 антител или изотипических контрольных антител в течение 30 мин на льду в буфере для разведения антител. После одной промывки буфером для разведения антител клетки инкубировали с 10 мкг/мл ФЭ-конъюгированных вторичных антител против Fc человека или мыши в течение 30 мин на льду. После одной дополнительной промывки образцы инкубировали с Cytofix (1% формальдегид) в течение 20 мин. После последней промывки образцы фильтровали через 96-луночный фильтрующий блок Pall, проводили на цитометре Nuncpcyt® и анализировали в ForeCyt™ (IntelliCyt, Альбукерке, Нью-Мексико). Средние интенсивности флуоресценции (СИФ) выражали в виде кратного изменения выше неокрашенных уровней (фон). Средняя кратность выше фона была определена при концентрации антител 100-300 нМ. Для определения ЭК50 связывания клеток концентрации мкАт находились в диапазоне от 300 нМ до 5 пМ, а значения ЭК50 определяли из четырехпараметрического логистического уравнения по 12-точечной кривой зависимости от дозы (GraphPad Prism).

Таблицы 3А и 3В. Свойства связывания FACS анти-STEP2 антител к STEP2-экспрессирующим и STEAP2-отрицательным клеточным линиям.

Таблица 3А
Связывающие свойства выбранных антител против STEAP2 с Fc человека

		STEAP2- экспрессирующие		STEAP2-отрицательные		
Клеточная линия	HEK293	C4-2		FADU	SKBR3	Raji
Антитело	Средняя К.В.Ф.	Средняя К.В.Ф.	Средняя ЭК ₅₀ (нМ)	Средняя К.В.Ф.	Средняя К.В.Ф.	Средняя К.В.Ф.
H1H7809N	31	89	>50	21	37	3
H1H7810N	3	26	H/O	3	3	2
H1H7811N	5	65	>50	3	5	4
H1H7814N	2	96	4	2	2	2
H1H7972P	4	119	9	2	3	59
H1H11162N	10	104	1	3	3	2
H1H11163N	6	90	3	2	3	2
H1H11164N	10	117	2	3	2	2
H1H11243N	3	41	H/O	2	3	2
H1H11878P	5	27	>50	H/O	H/O	H/O
H1H11880P	7	6	5	H/O	H/O	H/O
H1H11888P2	9	6	3	H/O	H/O	H/O
H1H11892P2	3	4	H/O	H/O	H/O	H/O
H1H11893P2	3	9	21	H/O	H/O	H/O
H1H11894P2	4	7	H/O	H/O	H/O	H/O
H1H11895P2	4	6	16	H/O	H/O	H/O
H1H11896P2	7	6	21	H/O	H/O	H/O
H1H11897P2	16	29	>50	H/O	H/O	H/O
Изотипический контроль -I hIgG1	1	2	H/O	1	2	4
Изотипический контроль --II hIgG1	1,7 ± 0,5	2	H/O	3	2	H/O
античеловеческое ФЭ	1,1 ± 0,1	1	H/O	1	2	1
Неокрашенное	1 ± 0	1	H/O	1	1	H/O

К.В.Ф: кратность выше фона; H/O: не обнаружено.

Таблица 3В

Связывающие свойства анти-STEP2 антител, генерируемых гибридомой

Клеточная линия	НЕК293	STEP2-экспрессирующие		STEP2-отрицательные		
		C4-2		FADU	SKBR3	Raji
Антитело	Средняя К.В.Ф.	Средняя К.В.Ф.	Средняя ЭК ₅₀ (нМ)	Средняя К.В.Ф.	Средняя К.В.Ф.	Средняя К.В.Ф.
H1M11243N	Н/О	116	23	Н/О	Н/О	Н/О
H1M11249N	Н/О	11	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
H2M11160N	Н/О	8	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
H2M11162N	Н/О	365	4,9	Н/О	Н/О	Н/О
H2M11163N	Н/О	256	13	Н/О	Н/О	Н/О
H2M11164N	Н/О	360	3,7	Н/О	Н/О	Н/О
H2M11166N	Н/О	12	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
H2M11168N	Н/О	9	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
H2M11245N	Н/О	18	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
H2M11246N	Н/О	11	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
H2M11247N	Н/О	482	18	Н/О	Н/О	Н/О
H2M11248N	Н/О	50	>50	Н/О	Н/О	Н/О
H3M11161N	Н/О	5	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
H3M11165N	Н/О	13	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
H3M11167N	Н/О	14	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
H3M11244N	Н/О	2	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
Изотипический контроль mIgG1	Н/О	2	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
Изотипический контроль mIgG2	Н/О	3	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
Изотипический контроль mIgG3	Н/О	4	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
античеловеческое, ФЭ	1,1 ± 0,1	1	Н/О	1	2	1
Неокрашенное	1 ± 0	1	Н/О	1	1	Н/О

К.В.Ф: кратность выше фона; Н/О: не обнаружено.

Как демонстрируют результаты в табл. 3А и 3В, некоторые анти-STEP2 антитела специфически связываются с клеточными линиями аденокарциномы предстательной железы C4-2 с высокой экспрессией STEP2 на уровнях, более чем в 50 раз превышающих фоновые, с низкими нМ значениями ЭК₅₀, посредством FACS. Некоторые анти-STEP2 антитела также слабо связаны с клетками НЕК293 с низкой экспрессией STEP2. Незначительное связывание наблюдалось для большинства анти-STEP2 антител на STEP2-отрицательных клетках FADU, SK-BR-3 и Raji. Данный Пример иллюстрирует способность нескольких анти-STEP2 антител согласно данному изобретению специфически и селективно связываться с клеточными линиями с высокой экспрессией STEP2.

Пример 3. Антитела против STEP2 человека проявляют сильную интернализацию и специфичность для STEP2 человека.

Описана способность анти-STEP2 антител согласно данному изобретению селективно связываться с клеточными линиями, экспрессирующими STEP2 (см. Пример 2 - связывание FACS). Затем также были оценены свойства интернализации анти-STEP2 антител согласно данному изобретению.

Вкратце, 20000 клеток C4-2 высевали в 96-луночные планшеты, покрытые PDL. На следующий день клетки инкубировали с антителами против STEP2 человека (10 мкг/мл) в течение 30 мин на льду с последующим промыванием двумя ФСБ (фосфатно-солевой буфер). Затем клетки инкубировали с alexa488-конъюгированным вторичным антителом против hFc Fab в течение 30 мин на льду с последующими двумя дополнительными промывками ФСБ (фосфатно-солевого буфера). Антителам позволяли интернализироваться в течение 1 ч при 37°C в буфере для интернализации (ФСБ+2% FBS (фетальная бычья сыворотка)) или хранили при 4°C. Клетки фиксировали в 4% формальдегиде, ядра окрашивали DRAQ5 (Cell signaling) и получали изображения на ImageXpress micro XL (Molecular Devices).

Качественную визуальную оценку общей интенсивности связывания и интенсивности антител, которые интернализировались в везикулы, проводили и оценивали в соответствии со следующими критериями: - (нет интернализации или связывания), +(слабая интернализация или связывание), ++ (умеренная интернализация или связывание) и +++ (сильная интернализация или связывание).

Как демонстрируют результаты в табл. 4, некоторые антитела показали потенциал к сильной интер-

нализации на клеточной линии С4-2. В целом, сильная интернализация коррелировала с самыми высокими уровнями общей интенсивности связывания.

Затем выбранные антитела к STEAP2 тестировали на связывание с другими членами семейства STEAP человека (h) (STEAP1, STEAP3 и STEAP4). Для оценки специфичности анти-STEP2 антител плазмидные конструкторы, экспрессирующие hSTEAP1, hSTEAP2, hSTEAP3 или hSTEAP4, слитые с зеленым флуоресцентным белком (GFP), временно вводили в клетки НЕК293 с помощью методики, основанной на липофектине 2000. Через 48 ч транзientно трансфицированные клетки окрашивали анти-STEP2 антителами и визуализировали, как описано выше для анализа интернализации. Лунки с GFP-положительными клетками, которые связывали анти-STEP2 антитела, были оценены как положительные (+), а те, которые не связывали анти-STEP2 антитела, были оценены как отрицательные (-). Все протестированные антитела связывались с hSTEP2-GFP-положительными клетками, но не связывались с STEAP1-GFP, STEAP3-GFP или STEAP4-GFP-положительными клетками, подтверждающая специфичность связывания со STEAP2 человека. Результаты связывания приведены в табл. 5.

Вкратце, несколько анти-STEP2 антител согласно данному изобретению демонстрируют способность к сильной интернализации и являются специфическими связывающими веществами для STEAP2 человека.

Таблица 4

Качественная оценка свойств интернализации и общего связывания анти-STEP2 антител на клеточной линии С4-2 с высокой экспрессией STEAP2

	Интернализация (37°C, 1 час)	Общее связывание (4°C)
Антитело	Качественная оценка	Качественная оценка
H1H7814N	+	+
H1H11162N	+++	+++
H1H11163N	++	++
H1H11164N	+++	+++
H1H11878P	+	+
H1H11880P	+	+
H1H11888P2	+	+
H1H11892P2	+/-	+/-
H1H11893P2	+/-	+/-
H1H11894P2	+/-	+
H1H11895P2	+	+
H1H11896P2	+	+
H1H11897P2	-	-
H1H7972P	+	+
H1M11243N	+	+
H2M11162N	+++	+++
H2M11163N	++	++
H2M11164N	+++	+++
H2M11247N	+++	+++
Изотипический контроль hlgG1 (Ат для нерелевантного антигена)	-	-

Таблица 5

Специфичность анти-STEP2 антител: оценка связывания с hSTEAP1, hSTEAP2, hSTEAP3 или hSTEAP4, слитыми с GFP

Антитела	Клетки НЕК293, трансфицированные гибридными плазмидами STEAP/GFP			
	hSTEAP1	hSTEAP2	hSTEAP3	hSTEAP4
H2M7807	-	+	-	-
H2M7810	-	+	-	-
H2M7811	-	+	-	-
H1M7814	-	+	-	-
H1H7972	-	+	-	-

Пример 4. Генерация биспецифических антител, которые связывают STEAP2 и CD3.

Данное изобретение обеспечивает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связывают CD3 и STEAP2; такие биспецифические антигенсвязывающие молекулы также обозначаются в данном документе как "анти-STEP2/анти-CD3 или анти-STEAP2xCD3 биспецифические молекулы". Анти-STEP2 часть анти-STEAP2/анти-CD3 биспецифической молекулы является полезной для нацеливания на опухолевые клетки, которые экспрессируют шеститрансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2 (STEAP2) (STEAP2), и анти-CD3 часть биспецифической молекулы является полезной для активации Т-клеток. Одновременное связывание STEAP2 на опухолевой клетке и CD3 на Т-клетке облегчает направленное уничтожение (лизис клеток) целевой опухолевой клетки при помощи активированной Т-клетки.

Биспецифические антитела, содержащие анти-STEP2-специфический связывающий домен и анти-CD3-специфический связывающий домен, были рекомбинантно сконструированы с помощью стандартных методик молекулярного клонирования и экспрессированы в клетках CHO, причем анти-STEP2 антигенсвязывающий домен и анти-CD3 антигенсвязывающий домен, каждый из которых содержит разные, определенные HCVR, спаренные с общей LCVR. В приведенных биспецифических антителах молекулы были сконструированы с использованием тяжелой цепи из анти-CD3 антитела, тяжелой цепи из анти-STEP2 антитела и общей легкой цепи из анти-STEP2 антитела, и экспрессированы в клетках CHO. В некоторых случаях биспецифические антитела могут быть сконструированы с использованием тяжелой цепи из анти-CD3 антитела, тяжелой цепи из анти-STEP2 антитела и легкой цепи из анти-CD3 антитела или легкой цепи антитела, о которой известно, что она является разнородной или эффективно соединяется с различными плечами тяжелой цепи, такими как V_κ1-39JK5 или V_κ3-20JK1.

Биспецифические антитела, описанные в следующих примерах, состоят из анти-CD3-связывающих плеч, имеющих различные аффинности связывания с человеческим растворимым гетеродимерным белком hCD3 ϵ/δ (как описано в примере 12 в данном документе); и STEAP2 человека (см. примеры 1-2 выше). Приведенные в качестве примера биспецифические антитела были получены с использованием модифицированного (химерного) Fc-домена IgG4, как указано в публикации заявки на патент США № US20140243504A1, опубликованной 28 августа 2014 года.

Краткое описание составных частей антигенсвязывающих доменов различных сконструированных анти-STEAP2xCD3 биспецифических антител, как изложено в табл. 6.

Таблица 6

Конструирование биспецифических антител STEAP2xCD3

Идентификатор биспецифического антитела	Анти-STEAP2	Анти-CD3	Общая переменная область легкой цепи
	Антигенсвязывающий домен	Антигенсвязывающий домен	
	Переменная область тяжелой цепи	Переменная область тяжелой цепи	
BSSTEAP2/CD3-001		CD3-VH-G (SEQ ID NO: 1730)	
BSSTEAP2/CD3-002	H2M11162N (SEQ ID NO:250)	CD3-VH-G5 (SEQ ID NO: 1762)	H2M11162N (SEQ ID NO: 258)
BSSTEAP2/CD3-003		CD3-VH-G20 (SEQ ID NO:1866)	
BSSTEAP2/CD3-004	H1H7814N (SEQ ID NO:218)	H1H7251P (SEQ ID NO: 1570)	H1H7814N (SEQ ID NO: 226)
BSSTEAP2/CD3-005		H1H7208P (SEQ ID NO:1490)	
BSSTEAP2/CD3-006	H1H11162 (SEQ ID NO:250)	CD3-VH-P (SEQ ID NO:1882)	H1H11162 (SEQ ID NO: 258)
BSSTEAP2/CD3-007		H1H7195P (SEQ ID NO:1450)	

BSSTEAP2/CD3-008	H1H11163 (SEQ ID NO:266)	H1H7208P (SEQ ID NO:1490)	H1H11163 (SEQ ID NO:274)
BSSTEAP2/CD3-009	H1H11164 (SEQ ID NO:282)	H1H7208P (SEQ ID NO:1490)	H1H11164 (SEQ ID NO:290)
BSSTEAP2/CD3-010	H1H7809N (SEQ ID NO:330)	H1H7198P (SEQ ID NO:1466)	H1H7809N (SEQ ID NO:339)
BSSTEAP2/CD3-011		H1H7203P (SEQ ID NO:1474)	

Легкие цепи, перечисленные в табл. 6, были общими как для CD3-, так и STEP2-нацеливающих плечей биспецифических антител. в табл. 1 и 2 приведены идентификаторы последовательностей аминокислот и нуклеиновых кислот, соответственно, для различных варибельных областей тяжелой цепи и их соответствующих CDR, анти-STEP2 плеч (т.е. HCVR и LCVR получают из H2M11162N) для конструирования биспецифических антител данного примера. в табл. 15 и 16 приведены идентификаторы последовательностей аминокислот и нуклеиновых кислот, соответственно, для различных варибельных областей тяжелой цепи и их соответствующих CDR, анти-CD3 плеч биспецифических антител данного примера.

Пример 5. Анти-STEP2/анти-CD3 биспецифические антитела проявляют сильную противоопухолевую эффективность *in vivo*.

Для определения эффективности иллюстративных анти-STEAP2/анти-CD3 биспецифических антител *in vivo*, были проведены исследования на иммунокомпрометированных мышах, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы.

Эффективность анти-STEP2/анти-CD3 биспецифических антител на моделях ксенотрансплантата опухоли человека

Для оценки эффективности *in vivo* биспецифических анти-STEAP2/анти-CD3 в исследованиях на ксенотрансплантатах опухолей человека, NOD scid gamma (NSG) мышам (NOD - диабет без ожирения)/SCID - тяжелый комбинированный иммунодефицит (Jackson Laboratories, Бар-Харбор, Мэн) совместно с мононуклеарными клетками периферической крови человека (МКПК; ReachBio LLC., СिएТЛ, Вашингтон) имплантировали клетки рака предстательной железы человека C4-2 (MD Anderson Cancer Center, Хьюстон, Техас), которые эндогенно экспрессируют STEAP2.

Вкратце, $5,0 \times 10^6$ клеток C4-2 совместно имплантировали подкожно (п/к) с $1,25 \times 10^6$ МКПК человека в смеси 50/50 матрицы матригеля (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) в правый бок самцов NSG мышей. Мышей лечили внутривенно (и/п) в день имплантации (модель немедленного лечения) биспецифическими анти-STEAP2/анти-CD3 BSSTEAP2/CD3-001, BSSTEAP2/CD3-002 или BSSTEAP2/CD3-003 или изотипическим контролем в дозе 0,1 или 0,01 мг/кг (N=5 мышей/группа).

Размер опухоли измеряли 2 раза в неделю, используя циркуль, и объем опухоли рассчитывали как $\text{объем} = (\text{длина} \times \text{ширина}^2) / 2$. Данные представлены в виде размера опухоли (мм^3) в конечной точке исследования, 46 суток после имплантации опухоли (табл. 7).

Таблица 7

Эффективность анти-STEP2/анти-CD3 биспецифических антител в иммунокомпрометированной модели ксенотрансплантата: немедленное введение дозы

Опухолевая модель / линия мышей	Идентификатор биспецифического антитела	Доза (мг/кг)	N	Размер опухоли (мм^3) 46 суток после имплантации опухоли (среднее значение \pm СКО)
C4-2/NSG	BSSTEAP2/CD3-001	0,1	5	18,0 \pm 14,0
		0,01	5	23,0 \pm 220
	BSSTEAP2/CD3-002	0,1	5	15,0 \pm 12,0
		0,01	5	17,0 \pm 8,0
	BSSTEAP2/CD3-003	0,1	5	19,0 \pm 12,0
		0,01	5	25,0 \pm 21,0
	Контрольное биспецифическое антитело	0,1	5	1020,0 \pm 922,0

Как демонстрируют результаты в табл. 7 BSSTEAP2/CD3-001, BSSTEAP2/CD3-002 и BSSTEAP2/CD3-003 значительно подавляли рост опухоли по сравнению с изотипическим контролем в случае, если размеры опухоли измеряли в конечной точке исследования. Важно отметить, что анти-STEP2/анти-CD3 биспецифические антитела были эффективны в ингибировании роста опухоли C4-2 даже при самой низкой дозе 0,1 мг/кг.

Пример 6. Получение и характеристика конъюгата.

Все моноклональные антитела были экспрессированы в клетках CHO и очищены при помощи белка А. Изотипический контроль также был приготовлен аналогичным образом. Несвязывающее изотипическое контрольное антитело получали из иммунологического антигена, не имеющего отношения к онкологии.

Антитело (10 мг/мл) в 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, при pH 7,5 обрабатывали 1 mM дитиотреитолом при 37°C в течение 30 мин. После гель-фильтрации (G-25, pH 4,5, ацетат натрия) к восстановленному антителу добавляли производное Соединения 7 полезной нагрузки с малеинимидным линкером (1,2 эквивалента/SH группа) в ДМСО (10 мг/мл), и смесь доводили до pH 7,0 с помощью 1 M HEPES (pH 7,4). Соединение 7 и способы получения соединения описаны в публикации PCT № WO2014/145090, опубликованной 18 сентября 2014 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Через 1 ч реакцию гасили избытком N-этилмалеимида. Конъюгаты очищали методом эксклюзионной хроматографии и стерильно фильтровали. Концентрации белка и линкера с полезной нагрузкой определяли с помощью УФ-спектрального анализа. При помощи эксклюзионной ВЭЖХ установлено, что все используемые конъюгаты были на >95% мономерными, а при помощи ОФ-ВЭЖХ установлено, что полезная нагрузка неконъюгированного линкера была <0,5%. Выход приведен в табл. 8 на основе определения титра белка. Все конъюгированные антитела были проанализированы ультрафиолетовым излучением на содержание линкера с полезной нагрузкой в соответствии с Hamblett et al., Cancer Res 2004 10 7063. Результаты приведены в табл. 8.

Конъюгат, содержащий соединение 60, может быть получен с использованием аналогичного способа. Соединение 60 и способы получения соединения описаны в публикации PCT № WO2016/160615 (пример 20), опубликованной 6 октября 2016 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Соединение 60 представляет собой майтанзин-N-метил-L-аланин-(3-метокси-4-амино)бензамидо-Cit-Val-Cap-Mal.

Таблица 8

Краткая информация о параметрах полезной нагрузки (хемотоксическое лекарственное средство) и конъюгата антитело-лекарственное средство

Соединение	в 252 нм (см ⁻¹ М ⁻¹)	в 280 нм (см ⁻¹ М ⁻¹)
7 [Майтанзин-3-N-метил-L-(S)-аланин-пропанамидил-3-N-метил-N-[4-(амино-цитруллин-валин-гексанамид-6-малеимидил)бензил]карбамат]	50600	8100
Антитело	в 252 нм (см⁻¹ М⁻¹)	в 280 нм (см⁻¹ М⁻¹)
H1H7814N	110440	212400
Изотипический контроль	75113	218360
Конъюгат антитела	Полезная нагрузка: антитело (УФ)	Выход, %
H1H7814N-7	2,7	48
Изотипический контроль-7	3,0	48

Пример 7. Конъюгаты лекарственное средство-анти-STEP2 антитело (ADC) являются мощными ингибиторами роста опухоли в STEP2-положительных моделях ксенотрансплантата рака предстательной железы In vivo.

А. Для определения эффективности в условиях in vivo анти-STEP2 антител, конъюгированных с соединением 7, были проведены исследования на иммунокомпрометированных мышах, несущих STEP2-положительные ксенотрансплантаты рака предстательной железы.

Для этих исследований самцам SCID мышей (Taconic, Хадсон, Нью-Йорк) имплантировали клетки

C4-2, эндогенно экспрессирующие STEAP2. Как только опухоли достигли среднего объема 200-250 мм³ (~13-17 сутки), мышей рандомизировали на группы лечения и вводили или анти-STEP2-конъюгированные антитела, несвязывающее конъюгированное антитело, или носитель. В этих исследованиях *in vivo* антитела вводили один раз, а опухоли затем контролировали до достижения среднего размера опухоли приблизительно 1500-2000 мм³ в группе, получавшей только носитель (~ 40-50 суток). Группы лечения, демонстрирующие эффективность, контролировали в течение более длительного периода времени (80-110 суток).

В начальном исследовании иллюстративное анти-STEP2 антитело, конъюгированное с соединением 7, исследовали на эффективность в уменьшении объема опухоли C4-2. Мыши получали однократную дозу анти-STEP2 и контрольных ADC в дозе 10, 20 или 40 мг/кг на 13 сутки после имплантации. Как изображено на фиг. 1, H1H7 8 41N-7 (DAR 2.92) сильно ингибировал рост опухоли при всех испытанных дозах. При самой высокой дозе (40 мг/кг) H1H784N-7 эффективно уменьшал размер опухоли, хотя несвязывающее контрольное антитело (40 мг/кг) также демонстрировало эффект на объем опухоли. Во всех исследованных дозах H1H784N-7 уменьшал размер опухоли сильнее, чем контрольное конъюгированное антитело.

Во втором исследовании анти-STEP2 ADC вводили в дозе 5 и 20 мг/кг, а контрольное антитело - в дозе 20 мг/кг на 14 сутки после имплантации. Как изображено на фиг. 2, H1H7841N-7 (DAR 2.92) сильно ингибировал рост опухоли при дозе 20 мг/кг, как и в предыдущем эксперименте, но продемонстрировал сниженную эффективность при дозе 5 мг/кг. Контрольное антитело в дозе 20 мг/кг не продемонстрировало никакой разницы с контролем растворителем.

В дополнительном исследовании H1H7841N-7 (DAR 2.7) и контрольное антитело вводили в эквивалентах лекарственного средства мкг/кг на основе соотношений лекарственного средство ADC: антитело ("DAR"). Доза составляла 150 мкг/кг, вводимая на 17 сутки после имплантации (фиг. 3). H1H7841N-7 сильно ингибировал рост опухоли при дозе 150 мкг/кг, демонстрируя регрессию опухоли в течение 42 суток после имплантации и 25 суток после инъекции. В этот момент рост опухоли начал восстанавливаться. Рост опухоли с контрольным антителом в этой дозе не отличался от контроля растворителем.

В. В аналогичных исследованиях самцам SCID мышей (Taconic, Хадсон, Нью-Йорк) имплантировали клетки C4-2, эндогенно экспрессирующие STEAP2. Иллюстративное анти-STEP2 (H1H7814N) антитело, конъюгированное с соединением 60, исследовали на эффективность в отношении регрессии опухоли C4-2. Мыши получали однократную дозу анти-STEP2 ADC, изотипического контрольного ADC (связывается с нерелевантным антигеном) или носителя (ФСБ) в дозе 2,5 мг/кг на 29 сутки после имплантации. Объем опухоли и массу тела фиксировали на 0 сутки (день введения) и на 4, 6, 8, 12, 14 сутки и 20 сутки после введения. Как изображено на фиг. 4, H1H7814N-60 (DAR 3.6) сильно ингибировал рост опухоли при испытанной дозе, демонстрируя регрессию опухоли до 20 суток после инъекции (49 суток после имплантации). Процентное изменение массы тела для исследуемого ADC не превышало -2,01% после 14 суток (после введения H1H7814N-60) по сравнению с мышами, получавшими контрольный Ab-ADC (антитело- конъюгат антитело-лекарственное средство), у которых процентное изменение Массы тела наблюдали от - 4,02% до - 11,55% после 14 суток.

Пример 8. Получение анти-CD3 антител.

Анти-CD3 антитела были получены путем иммунизации модифицированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой цепи каппа человеческого иммуноглобулина, с клетками, экспрессирующими CD3, или с ДНК, кодирующей CD3. Иммунный ответ антител наблюдали с помощью CD3-специфического иммуноанализа. Когда желаемый иммунный ответ был достигнут, спленоциты собирали и сливали с клетками миеломы мыши, чтобы сохранить их жизнеспособность и образовать линии клеток гибридомы. Линии клеток гибридомы подвергали скринингу и отбирали для идентификации линий клеток, которые продуцируют CD3-специфические антитела. Используя эту методику, было получено несколько химерных анти-CD3 антител (то есть антител, имеющих человеческими вариабельными доменами и константными доменами мыши). Кроме того, несколько полностью человеческих анти-CD3 антител были выделены непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в US 2007/0280945A1.

Биологические свойства иллюстративных анти-CD3 антител, полученных в соответствии со способами данного Примера, подробно описаны в примерах, приведенных ниже.

Пример 9. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот вариабельных областей тяжелой и легкой цепей

В табл. 9 приведены идентификаторы аминокислотной последовательности вариабельных областей и CDR тяжелых и легких цепей выбранных анти-CD3 антител согласно изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты приведены в табл. 10. Способы получения анти-CD3 антител, описанных в данном документе, также можно найти в публикации США 2014/0088295, опубликованной 27 марта 2014 г.

Таблица 9

Идентификаторы аминокислотной последовательности

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR11	LCDR2	LCDR3
H1H2712N	402	404	406	408	410	412	414	416
H1M2692N	418	420	422	424	426	428	430	432
H1M3542N	434	436	438	440	442	444	446	448
H1M3544N	450	452	454	456	458	460	462	464
H1M3549N	466	468	470	472	474	476	478	480
H1M3613N	482	484	486	488	490	492	494	496
H2M2689N	498	500	502	504	506	508	510	512
H2M2690N	514	516	518	520	522	524	526	528
H2M2691N	530	532	534	536	538	540	542	544
H2M2704N	546	548	550	552	554	556	558	560
H2M2705N	562	564	566	568	570	572	574	576
H2M2706N	578	580	582	584	586	588	590	592
H2M2707N	594	596	598	600	602	604	606	608
H2M2708N	610	612	614	616	618	620	622	624
H2M2709N	626	628	630	632	634	636	638	640
H2M2710N	642	644	646	648	650	652	654	656
H2M2711N	658	660	662	664	666	668	670	672
H2M2774N	674	676	678	680	682	684	686	688
H2M2775N	690	692	694	696	698	700	702	704
H2M2776N	706	708	710	712	714	716	718	720
H2M2777N	722	724	726	728	730	732	734	736
H2M2778N	738	740	742	744	746	748	750	752
H2M2779N	754	756	758	760	762	764	766	768
H2M2789N	770	772	774	776	778	780	782	784
H2M2862N	786	788	790	792	794	796	798	800
H2M2885N	802	804	806	808	810	812	814	816
H2M2886N	818	820	822	824	826	828	830	832
H2M3540N	834	836	838	840	842	844	846	848
H2M3541N	850	852	854	856	858	860	862	864
H2M3543N	866	868	870	872	874	876	878	880
H2M3547N	882	884	886	888	890	892	894	896
H2M3548N	898	900	902	904	906	908	910	912
H2M3563N	914	916	918	920	922	924	926	928
H1H5751P	930	932	934	936	938	940	942	944
H1H5752P	946	948	950	952	954	956	958	960
H1H5753B	962	964	966	968	970	972	974	976
H1H5754B	978	980	982	984	986	988	990	992
H1H5755B	994	996	998	1000	1002	1004	1006	1008

044194

H1H5756B	1010	1012	1014	1016	1018	1020	1022	1024
H1H5757B	1026	1028	1030	1032	1034	1036	1038	1040
H1H5758B	1042	1044	1046	1048	1050	1052	1054	1056
H1H5761P	1058	1060	1062	1064	1066	1068	1070	1072
H1H5763P	1074	1076	1078	1080	1082	1084	1086	1088
H1H5764P	1090	1092	1094	1096	1098	1100	1102	1104
H1H5769P	1106	1108	1110	1112	1114	1116	1118	1120
H1H5771P	1122	1124	1126	1128	1130	1132	1134	1136
H1H5772P	1138	1140	1142	1144	1146	1148	1150	1152
H1H5777P	1154	1156	1158	1160	1162	1164	1166	1168
H1H5778P	1170	1172	1174	1176	1178	1180	1182	1184
H1H5780P	1186	1188	1190	1192	1194	1196	1198	1200
H1H5781P	1202	1204	1206	1208	1210	1212	1214	1216
H1H5782P	1218	1220	1222	1224	1226	1228	1230	1232
H1H5785B	1234	1236	1238	1240	1242	1244	1246	1248
H1H5786B	1250	1252	1254	1256	1258	1260	1262	1264
H1H5788P	1266	1268	1270	1272	1274	1276	1278	1280
H1H5790B	1282	1284	1286	1288	1290	1292	1294	1296
H1H5791B	1298	1300	1302	1304	1306	1308	1310	1312
H1H5792B	1314	1316	1318	1320	1322	1324	1326	1328
H1H5793B	1330	1332	1334	1336	1338	1340	1342	1344
H1H5795B	1346	1348	1350	1352	1354	1356	1358	1360
H1H5796B	1362	1364	1366	1368	1370	1372	1374	1376
H1H5797B	1378	1380	1382	1384	1386	1388	1390	1392
H1H5798B	1394	1396	1398	1400	1402	1404	1406	1408
H1H5799P	1410	1412	1414	1416	1418	1420	1422	1424
H1H5801B	1426	1428	1430	1432	1434	1436	1438	1440
H1H7194B	1442	1444	1446	1448	1634	1636	1638	1640
H1H7195B	1450	1452	1454	1456	1634	1636	1638	1640
H1H7196B	1458	1460	1462	1464	1634	1636	1638	1640
H1H7198B	1466	1468	1470	1472	1634	1636	1638	1640

H1H7203B	1474	1476	1478	1480	1634	1636	1638	1640
H1H7204B	1482	1484	1486	1488	1634	1636	1638	1640
H1H7208B	1490	1492	1494	1496	1634	1636	1638	1640
H1H7211B	1498	1500	1502	1504	1634	1636	1638	1640
H1H7221B	1506	1508	1510	1512	1634	1636	1638	1640
H1H7223B	1514	1516	1518	1520	1634	1636	1638	1640
H1H7226B	1522	1524	1526	1528	1634	1636	1638	1640
H1H7232B	1530	1532	1534	1536	1634	1636	1638	1640
H1H7233B	1538	1540	1542	1544	1634	1636	1638	1640
H1H7241B	1546	1548	1550	1552	1634	1636	1638	1640
H1H7242B	1554	1556	1558	1560	1634	1636	1638	1640
H1H7250B	1562	1564	1566	1568	1634	1636	1638	1640
H1H7251B	1570	1572	1574	1576	1634	1636	1638	1640
H1H7254B	1578	1580	1582	1584	1634	1636	1638	1640
H1H7258B	1586	1588	1590	1592	1634	1636	1638	1640
H1H7269B	1594	1596	1598	1600	1634	1636	1638	1640
H1H7279B	1602	1604	1606	1608	1634	1636	1638	1640
H1xH7221 G	1610	1612	1614	1616	1634	1636	1638	1640
H1xH7221 G3	1618	1620	1622	1624	1634	1636	1638	1640
H1xH7221 G5	1626	1628	1630	1632	1634	1636	1638	1640

Таблица 10

Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2712N	401	403	405	407	409	411	413	415
H1M2692N	417	419	421	423	425	427	429	431
H1M3542N	433	435	437	439	441	443	445	447
H1M3544N	449	451	453	455	457	459	461	463
H1M3549N	465	467	469	471	473	475	477	479

044194

H1M3613N	481	483	485	487	489	491	493	495
H2M2689N	497	499	501	503	505	507	509	511
H2M2690N	513	515	517	519	521	523	525	527
H2M2691N	529	531	533	535	537	539	541	543
H2M2704N	545	547	549	551	553	555	557	559
H2M2705N	561	563	565	567	569	571	573	575
H2M2706N	577	579	581	583	585	587	589	591
H2M2707N	593	595	597	599	601	603	605	607
H2M2708N	609	611	613	615	617	619	621	623
H2M2709N	625	627	629	631	633	635	637	639
H2M2710N	641	643	645	647	649	651	653	655
H2M2711N	657	659	661	663	665	667	669	671
H2M2774N	673	675	677	679	681	683	685	687
H2M2775N	689	691	693	695	697	699	701	703
H2M2776N	705	707	709	711	713	715	717	719
H2M2777N	721	723	725	727	729	731	733	735
H2M2778N	737	739	741	743	745	747	749	751
H2M2779N	753	755	757	759	761	763	765	767
H2M2789N	769	771	773	775	777	779	781	783
H2M2862N	785	787	789	791	793	795	797	799
H2M2885N	801	803	805	807	809	811	813	815
H2M2886N	817	819	821	823	825	827	829	831
H2M3540N	833	835	837	839	841	843	845	847
H2M3541N	849	851	853	855	857	859	861	863
H2M3543N	865	867	869	871	873	875	877	879
H2M3547N	881	883	885	887	889	891	893	895
H2M3548N	897	899	901	903	905	907	909	911
H2M3563N	913	915	917	919	921	923	925	927
H1H5751P	929	931	933	935	937	939	941	943
H1H5752P	945	947	949	951	953	955	957	959
H1H5753B	961	963	965	967	969	971	973	975
H1H5754B	977	979	981	983	985	987	989	991
H1H5755B	993	995	997	999	1001	1003	1005	1007
H1H5756B	1009	1011	1013	1015	1017	1019	1021	1023

044194

H1H5757B	1025	1027	1029	1031	1033	1035	1037	1039
H1H5758B	1041	1043	1045	1047	1049	1051	1053	1055
H1H5761P	1057	1059	1061	1063	1065	1067	1069	1071
H1H5763P	1073	1075	1077	1079	1081	1083	1085	1087
H1H5764P	1089	1091	1093	1095	1097	1099	1101	1103
H1H5769P	1105	1107	1109	1111	1113	1115	1117	1119
H1H5771P	1121	1123	1125	1127	1129	1131	1133	1135
H1H5772P	1137	1139	1141	1143	1145	1147	1149	1151
H1H5777P	1153	1155	1157	1159	1161	1163	1165	1167
H1H5778P	1169	1171	1173	1175	1177	1179	1181	1183
H1H5780P	1185	1187	1189	1191	1193	1195	1197	1199
H1H5781P	1201	1203	1205	1207	1209	1211	1213	1215
H1H5782P	1217	1219	1221	1223	1225	1227	1229	1231
H1H5785B	1233	1235	1237	1239	1241	1243	1245	1247
H1H5786B	1249	1251	1253	1255	1257	1259	1261	1263
H1H5788P	1265	1267	1269	1271	1273	1275	1277	1279
H1H5790B	1281	1283	1285	1287	1289	1291	1293	1295
H1H5791B	1297	1299	1301	1303	1305	1307	1309	1311
H1H5792B	1313	1315	1317	1319	1321	1323	1325	1327
H1H5793B	1329	1331	1333	1335	1337	1339	1341	1343
H1H5795B	1345	1347	1349	1351	1353	1355	1357	1359
H1H5796B	1361	1363	1365	1367	1369	1371	1373	1375
H1H5797B	1377	1379	1381	1383	1385	1387	1389	1391
H1H5798B	1393	1395	1397	1399	1401	1403	1405	1407
H1H5799P	1409	1411	1413	1415	1417	1419	1421	1423
H1H5801B	1425	1427	1429	1431	1433	1435	1437	1439
H1H7194B	1441	1443	1445	1447	1633	1635	1637	1639
H1H7195B	1449	1451	1453	1455	1633	1635	1637	1639
H1H7196B	1457	1459	1461	1463	1633	1635	1637	1639
H1H7198B	1465	1467	1469	1471	1633	1635	1637	1639
H1H7203B	1473	1475	1477	1479	1633	1635	1637	1639
H1H7204B	1481	1483	1485	1487	1633	1635	1637	1639
H1H7208B	1489	1491	1493	1495	1633	1635	1637	1639
H1H7211B	1497	1499	1501	1503	1633	1635	1637	1639

H1H7221B	1505	1507	1509	1511	1633	1635	1637	1639
H1H7223B	1513	1515	1517	1519	1633	1635	1637	1639
H1H7226B	1521	1523	1525	1527	1633	1635	1637	1639
H1H7232B	1529	1531	1533	1535	1633	1635	1637	1639
H1H7233B	1537	1539	1541	1543	1633	1635	1637	1639
H1H7241B	1545	1547	1549	1551	1633	1635	1637	1639
H1H7242B	1553	1555	1557	1559	1633	1635	1637	1639
H1H7250B	1561	1563	1565	1567	1633	1635	1637	1639
H1H7251B	1569	1571	1573	1575	1633	1635	1637	1639
H1H7254B	1577	1579	1581	1583	1633	1635	1637	1639
H1H7258B	1585	1587	1589	1591	1633	1635	1637	1639
H1H7269B	1593	1595	1597	1599	1633	1635	1637	1639
H1H7279B	1601	1603	1605	1607	1633	1635	1637	1639
H1xH7221G	1609	1611	1613	1615	1633	1635	1637	1639
H1xH7221G 3	1617	1619	1621	1623	1633	1635	1637	1639
H1xH7221G 5	1625	1627	1629	1631	1633	1635	1637	1639

Антитела обычно упоминаются в данном документе в соответствии со следующей номенклатурой: приставка Fc (например, "H1H", "H1M", "H2M" и т.д.), за которым следует числовой идентификатор (например, "2712", "2692" и т.д., как показано в табл. 1, за которым следует суффикс "P", "N", или "B". Таким образом, согласно этой номенклатуре, антитело может упоминаться в данном документе, например, как "H1H2712N", "H1M2692N", "H2M2689N" и т.д. Приставки H1H, H1M и H2M в обозначениях антител, используемых в данном документе, указывают конкретную Fc-область изотипа антитела. Например, антитело "H1H" имеет Fc IgG1 человека, антитело "H1M" имеет Fc IgG1 мыши, а антитело "H2M" имеет Fc IgG2 мыши (все переменные области являются полностью человеческими, как обозначено первым "H" в обозначении антител). Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, имеющее конкретный изотип Fc, может быть превращено в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши может быть превращено в антитело с IgG4 человека и тому подобное), но в любом случае, переменные домены (включая CDR), -которые обозначены численными идентификаторами, приведенными в табл. 1, останутся неизменными, и ожидается, что свойства связывания будут идентичными или практически одинаковыми независимо от природы Fc-домена.

В табл. 11 и 12 изложены идентификаторы аминокислотной последовательности для переменных областей тяжелой цепи (табл. 13) и переменных областей легкой цепи (табл. 14), и соответствующие им CDR, дополнительные анти-CD3 HCVR и LCVR, применимых в анти-STEP2 x анти-CD3 биспецифических антителах согласно изобретению.

Таблица 11

Аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи

Идентификатор тяжелой цепи	SEQ ID NO:			
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CD3-VH-AA	1642	1644	1646	1648
CD3-VH-B	1658	1660	1662	1664
CD3-VH-C	1674	1676	1678	1680
CD3-VH-D	1690	1692	1694	1696
CD3-VH-E	1706	1708	1710	1712
CD3-VH-F#	1721	1722	1723	1724

Таблица 12

Аминокислотные последовательности варибельного области легкой цепи

Идентификатор легкой цепи	SEQ ID NO:			
	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-AA	1650	1652	1654	1656
CD3-VL-B	1666	1668	1670	1672
CD3-VL-C	1682	1684	1686	1688
CD3-VL-D	1698	1700	1702	1704
CD3-VL-E	1714	1716	1718	1720
CD3-VL-F [#]	1725	1726	1727	1728

Варибельные области тяжелой и легкой цепей CD3-VH-F и CD3-VL-F были получены из анти-CD3 антитела, обозначенного "L2K", как указано в WO 2004/106380.

Кроме того, в табл. 13 и 14 изложены идентификаторы последовательностей для нуклеотидных последовательностей, кодирующих варибельные области тяжелой цепи (табл. 13) и варибельные области легкой цепи (табл. 14), и их соответствующие CDR, дополнительных анти-CD3 HCVR и LCVR, применимых в анти-STEP2 x анти-CD3 биспецифических антителах согласно изобретению.

Таблица 13

Нуклеотидные последовательности, кодирующие последовательности варибельной области тяжелой цепи

Идентификатор тяжелой цепи	SEQ ID NO:			
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CD3-VH-AA	1641	1643	1645	1647
CD3-VH-B	1657	1659	1661	1663
CD3-VH-C	1673	1675	1677	1679
CD3-VH-D	1689	1691	1693	1695
CD3-VH-E	1705	1707	1709	1711

Таблица 14

Нуклеотидные последовательности, кодирующие последовательности варибельной области легкой цепи

Идентификатор легкой цепи	SEQ ID NO:			
	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD3-VL-AA	1649	1651	1653	1655
CD3-VL-B	1665	1667	1669	1671
CD3-VL-C	1681	1683	1685	1687
CD3-VL-D	1697	1699	1701	1703
CD3-VL-E	1713	1715	1717	1719

Контрольные конструкции, используемые в следующих примерах.

Различные контрольные конструкции (анти-CD3 антитела), были включены в следующих экспериментах для сравнительных целей: "ОКТ-3", мышинные моноклональные антитела против антигенов Т-клеточной поверхности человека доступны в Американской коллекции типовых культур (ATCC) по каталогу №. CRL-8001; и "SP34", коммерчески доступное мышинное моноклональное антитело, получено от, например, Biologend, Сан-Диего, Калифорния (кат. № 302914) или BD Pharmagen, кат. 55052, реагирует против эpsilon-цепи комплекса T3 на клетках Т-лимфоцитов человека.

Пример 10. Получение дополнительных анти-CD3 антител.

Следующие процедуры были направлены на выявление антител, которые специфически распознавали CD3 (корцептор Т-клеток) в качестве антигена.

Пул анти-CD3 антител был получен от генетически модифицированной мыши. Вкратце, мышей иммунизировали антигеном CD3 и генерировали В-клетки, которые содержали множество реаранжировок VH человека, чтобы экспрессировать разнообразный репертуар высокоаффинных антигенспецифических антител. Антитела, описанные в табл. 15-18 имеют одинаковую последовательность легкой цепи VK1-39JK5 (LCVR представлены в SEQ ID NO: 1890).

Генерируемые антитела были протестированы на связывание с антигеном CD3 человека и яванско-

го макака в *in vitro* анализе связывания, и, например, было идентифицировано одно антитело к CD3: обозначенное CD3-VH-P (HCVR, представленное в SEQ ID NO: 1882), среди нескольких других, которые, как было обнаружено, связываются с CD3 как человека, так и яванского макака, имеющими связывание ЭК₅₀ между 1 и 40 нМ (или титрование связывания клеток), как определено в титровании FACS клеток Jurkat и Т-клеток яванского макака, соответственно. См., например, эксперименты по связыванию FACS, описанные в примере 12 и в PCT/US2016/044732, поданной 29 июля 2016 года.

Затем были идентифицированы аминокислотные остатки зародышевой линии CD3-VH-P, и антитело, обозначенное "CD3-VH-G", было сконструировано так, чтобы оно содержало только каркасные области линии зародышевой линии. Другие производные антител были разработаны с помощью хорошо известных методов молекулярного клонирования для замены аминокислотных остатков ступенчатым образом на основе различий между последовательностью зародышевой линии и последовательностью CD3-VH-P. Каждое производное антитела имеет цифровое обозначение "CD3-VH-G". См. табл. 15.

В то время как CD3-VH-G и некоторые другие сконструированные антитела сохраняли свою аффинность связывания, как видно из анализов FACS, несколько анти-CD3 антител в биспецифическом формате связывались с CD3 человека или яванского макака *in vitro* со слабой или неизмеримой аффинностью связывания, такой как более высокая, чем ЭК₅₀ 100 нМ. Аффинность связывания, кинетика связывания и другие биологические свойства для выяснения токсикологического и фармакокинетического (рК) профилей были впоследствии дополнительно исследованы для биспецифических антител, содержащих иллюстративных анти-CD3 антител, и были получены в соответствии со способами данного примера.

Пример 11. Варибельные области тяжелой и легкой цепей (аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновой кислоты CDR).

В табл. 15 приведены идентификаторы аминокислотной последовательности варибельных областей и CDR тяжелой цепи выбранных анти-CD3 антител согласно изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты приведены в табл. 16.

Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот определяли для каждой последовательности тяжелой цепи антитела. Каждая тяжелая цепь антитела, полученная из последовательности зародышевой линии (SEQ ID NO: 1910), было присвоено обозначение "G" для последовательной номенклатуры. в табл. 15 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей варибельных областей тяжелой цепи и CDR сконструированных анти-CD3 антител согласно изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты приведены в табл. 16. Идентификаторы последовательности аминокислоты и нуклеиновой кислоты варибельной области легкой цепи и CDR также указаны ниже в табл. 17 и 18, соответственно.

Таблица 15

Идентификаторы аминокислотной последовательности тяжелой цепи

Антитело Обозначение CD3-VH	SEQ ID NO:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G	1730	1732	1734	1736
CD3-VH-G2	1738	1740	1742	1744
CD3-VH-G3	1746	1748	1750	1752
CD3-VH-G4	1754	1756	1758	1760
CD3-VH-G5	1762	1764	1766	1768
CD3-VH-G8	1770	1772	1774	1776
CD3-VH-G9	1778	1780	1782	1784
CD3-VH-G10	1786	1788	1790	1792
CD3-VH-G11	1794	1796	1798	1800
CD3-VH-G12	1802	1804	1806	1808
CD3-VH-G13	1810	1812	1814	1816
CD3-VH-G14	1818	1820	1822	1824
CD3-VH-G15	1826	1828	1830	1832
CD3-VH-G16	1834	1836	1838	1840
CD3-VH-G17	1842	1844	1846	1848
CD3-VH-G18	1850	1852	1854	1856
CD3-VH-G19	1858	1860	1862	1864
CD3-VH-G20	1866	1868	1870	1872
CD3-VH-G21	1874	1876	1878	1880
CD3-VH-P	1882	1884	1886	1888

Таблица 16

Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты тяжелой цепи

Антитело Обозначение CD3-VH	SEQ ID NO:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G	1729	1731	1733	1735
CD3-VH-G2	1737	1739	1741	1743
CD3-VH-G3	1745	1747	1749	1751
CD3-VH-G4	1753	1755	1757	1759
CD3-VH-G5	1761	1763	1765	1767
CD3-VH-G8	1769	1771	1773	1775
CD3-VH-G9	1777	1779	1781	1783
CD3-VH-G10	1785	1787	1789	1791

CD3-VH-G11	1793	1795	1797	1799
CD3-VH-G12	1801	1803	1805	1807
CD3-VH-G13	1809	1811	1813	1815
CD3-VH-G14	1817	1819	1821	1823
CD3-VH-G15	1825	1827	1829	1831
CD3-VH-G16	1833	1835	1837	1839
CD3-VH-G17	1841	1843	1845	1847
CD3-VH-G18	1849	1851	1853	1855
CD3-VH-G19	1857	1859	1861	1863
CD3-VH-G20	1865	1867	1869	1871
CD3-VH-G21	1873	1875	1877	1879
CD3-VH-P	1881	1883	1885	1887

Таблица 17

Идентификаторы аминокислотной последовательности легкой цепи

Антитело Обозначение	SEQ ID NO:			
	LCVR	CDR1	CDR2	CDR3
VK1-39JK5	1890	1892	1894	1896

Таблица 18

Идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты легкой цепи

Антитело Обозначение	SEQ ID NO:			
	LCVR	CDR1	CDR2	CDR3
VK1-39JK5	1889	1891	1893	1895

Антитело контроля 1, обозначенное "CD3-L2K", было сконструировано на основе известного анти-CD3 антитела (т.е. анти-CD3 антитела "L2K", как указано в WO 2004/106380).

Изотипическое контрольное антитело, упомянутое в примерах, приведенных в данном документе, представляет собой изотип, соответствующий (модифицированный IgG4) антителу, которое взаимодействует с нерелевантным антигеном, т.е. антигеном FelD1.

Пример 12. Исследования *in vitro* и *in vivo* на человеческих моноклональных анти-CD3 антителах.

Исследования *in vivo* и *in vitro* человеческих моноклональных анти-CD3 антител проводили, как описано в публикации США 2014/0088295, опубликованной 27 марта 2014 г., и в PCT/US2016/044732, поданной 29 июля 2016 г., которые тем самым включены посредством ссылки.

Некоторые человеческие моноклональные анти-CD3 антитела согласно данному изобретению связывают растворимый гетеродимерный белок CD3, или в антитело-захват или антиген-захват форматах, с высокой аффинностью. Растворимый гетеродимерный белок CD3 (hCD3-эпсилон/hCD3-дельта; SEQ ID NO: 1900/1901) получали или с меткой Fc человека (hFcΔAdp/hFc; SEQ ID NO: 1931/1932), или с меткой Fc мыши (mFcΔAdp/mfc; SEQ ID NO: 1933/1934). Гетеродимерный белок CD3 очищали с использованием метода, описанного в Davis et al. (US2010/0331527).

Некоторые человеческие моноклональные анти-CD3 антитела согласно изобретению связывались с Т-клетками человека и индуцировали пролиферацию Т-клеток. Некоторые человеческие моноклональные анти-CD3 антитела согласно изобретению связывались с CD2+CD4+ Т-клетками обезьяны и индуцировали их пролиферацию. Некоторые человеческие моноклональные анти-CD3 антитела поддерживали перенаправленное опосредованное Т-клетками уничтожение посредством взаимодействия Fc/FcR в анализе уничтожения U937 на основе кальцеина. Наблюдаемое уничтожение, которое, как полагают, зависит от взаимодействия Fc антитела с Fc-рецептором на клетках U937, приводящего к кластеризации CD3 на соседних Т-клетках, подавляли путем добавления неспецифического человеческого IgG (данные не показаны).

Пример 13. Исследования *in vitro* на человеческих биспецифических антителах STEAP2хCD3.

Титрование связывания FACS на клетках Jurkat, клетках PC3_STEAP2/1 и Т-клетках яванского макака. Для определения связывания биспецифических антител STEAP2хCD3 с химерными клетками Jurkat, PC3_STEAP2/1, химерными Т-клетками и Т-клетками яванского макака с последующим обнаружением с помощью меченого фикоэритрином антитела против IgG человека использовали анализ точной цитометрии. Вкратце, 2×10^5 клеток/лунку инкубировали в течение 30 мин при 4°C с серийным разведением биспецифических антител STEAP2хCD3 или контрольного антитела (антитело IgG1 человека, которое связывает кошачий антиген без перекрестной реактивности со STEAP2 или CD3 человека).

или яванского макака) от 66, 6 до 0,001 нМ После инкубации клетки дважды промывали холодным ФСБ, содержащим 1% фильтрованный FBS (фетальная бычья сыворотка), и к клеткам добавляли ФЭ-конъюгированное вторичное античеловеческое антитело и инкубировали в течение дополнительных 30 минут. Лунки, не содержащие антитело или только вторичное антитело, использовали в качестве контроля. После инкубации клетки промывали, ресуспендировали в 200 мкл холодного ФСБ, содержащего 1% фильтрованной FBS, и анализировали при помощи проточной цитометрии на BD FACS Canto II.

Таблица 19

Связывание FACS выбранных биспецифических антител STEAP2xCD3 с Jurkat, PC3_STEAP2/1 и Т-клетками яванского макака

Обозначение биспецифического антитела	FACS Jurkat ЭК50 [М]	FACS PC3_STEAP2/1, ЭК50 [М]	Т-клетки яванского макака ЭК50 [М]
BSSTEAP2/CD3-0010	1.36E-08	Связывание отсутствует	Очень слабое
BSSTEAP2/CD3-004	6.88E-10	7.91E-08	1.99E-09
BSSTEAP2/CD3-0011	8.63E-09	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует
BSSTEAP2/CD3-005	1.41E-08	3.18E-08	Связывание отсутствует
BSSTEAP2/CD3-001	7.19E-09	3.44E-09	7.27E-09
BSSTEAP2/CD3-006	3.98E-09	1.22E-08	7.99E-09
BSSTEAP2/CD3-007	6.15E-10	5.37E-09	1.73E-08
BSSTEAP2/CD3-008	1.52E-09	6.88E-08	1.66E-08
BSSTEAP2/CD3-009	4.14E-09	4.21E-08	Связывание отсутствует

Клетки Jurkat получают из Т-лимфобластной клеточной линии, которая экспрессирует CD3 человека. Все протестированные биспецифические антитела (табл. 19 и фиг. 5) связывались с клетками Jurkat с ЭК50 в диапазоне от 1.41E-08 М до 6.15E-10 М. Клетки PC3, клеточная линия рака предстательной железы человека, были модифицированы для экспрессии химерного конструкта STEAP2/1. Несколько биспецифических антител связывались с клетками PC3_STEAP2/1, с ЭК50 в диапазоне от 7.91E-08 М до 3.44E-09 М (табл. 19 и фиг. 6).

Было также протестировано связывание биспецифических антител STEAP2xCD3 с поверхностью очищенных Т-клеток яванского макака. Несколько биспецифических антител связывали с ЭК50 в диапазоне от 1.73E-08 М до 7.27E-09 М. Контрольные антитела не связывались ни с одной клеточной линией. Смотрите табл. 19 и фиг. 7 и 8.

Анализ пролиферации Т-клеток: оттаявшие МКПК человека или свежeweделенные МКПК яванского макака (50000 клеток/лунка) инкубировали в 3-кратных (человек, диапазон концентраций: от 5E-10M до 2.82E-15M; яванский макак, диапазон концентраций: от 1E-09M до 4.57E-13M) серийных разведениях биспецифического STEAP2xCD3 или изотипического контроля в полной среде (RPMI с добавлением 10% FBS, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 292 мкг/мл L-глутамин) и фиксированной концентрации (человек: 200 нг/мл, яванский макак: 500 нг/мл) коммерческого анти-CD28 антитела (BioLegend, кат. № 302914) в белых 96-луночных планшетах с плоским дном в течение 72 часов при 37°C. Выделенные МКПК обезьян были получены от двух доноров (идентифицированы как mk8781M или mk9381M). После инкубации добавляли CellTiter Glo® (Promega, кат. № 7573) и измеряли люминесценцию, как величину жизнеспособности клеток, с использованием многоканального планшета-ридера VICTOR X5. Титр клеток рассчитывали путем деления люминесценции стимулированных клеток на исходную люминесценцию нестимулированных клеток.

Все биспецифические антитела aSTEAP2xаCD3 индуцируют пролиферацию МКПК человека в присутствии костимулирующего анти-CD28 антитела (см. табл. 20 и фиг. 9). МКПК инкубировали с серийным разведением биспецифических антител или контрольного антитела и фиксированной концентрацией анти-CD28 в течение 72 ч, и жизнеспособность клеток измеряли в люминесцентном анализе для обнаружения живых клеток. Пролиферацию определяли путем сравнения люминесценции стимулированных биспецифическими антителами клеток с клетками без антител. Значения ЭК₅₀ (определяемые как концентрация антител, необходимая для генерации полумаксимальной пролиферации) варьировались от 3.68E-13M до 1.60E-10M. Напротив, контрольное антитело не проявляло активности в тех же условиях.

Таблица 20

Активация пролиферации Т-клеток, индуцированная выбранными биспецифическими антителами STEAP2хCD3

Обозначение биспецифического антитела	Пролиферация	
	МКПК человека [М]	Пролиферация МКПК яванского макака [М] (донор)
BSSTEAP2/CD3-0010	6.55E-12	7.034E-13 (mk8781M)
BSSTEAP2/ CD3-004	7.10E-13	[++] (mk8781M) [-] (mk9381M)
BSSTEAP2/CD3-011	8.62E-12	3.597E-12 (mk8781M)
BSSTEAP2/ CD3-005	2.76E-12	[-] (mk9381M) (mk8781M)
BSSTEAP2/ CD3-001	1.60E-10	4.592E-12 (mk9381M) [+] (mk8781M)
BSSTEAP2/ CD3-006	8.14E-13	1.532E-11 (mk9381M) [+] (mk8781M)
BSSTEAP2/ CD3-007	8.26E-11	[+/-] (mk9381M) [+] (mk8781M)
BSSTEAP2/ CD3-008	7.76E-12	[+/-] (mk9381M) [+] (mk8781M)
BSSTEAP2/ CD3-009	3.68E-13	[-] (mk9381M) (mk8781M)

Биспецифические антитела BSSTEAP2/CD3-0010 и BSSTEAP2/CD3-011 также индуцировали пролиферацию МКПК яванского макака (с донором mk8781M), демонстрируя ЭК₅₀ 7E-13 и 3.6E-12, соответственно. Активность BSSTEAP2/CD3-004 зависела от донора. Два дополнительных биспецифических антитела, BSSTEAP2/CD3-001 и BSSTEAP2/CD3-006, индуцировали устойчивую пролиферацию МКПК яванского макака у всех протестированных доноров. Значения ЭК₅₀ с использованием донора mk9381M были 4.6E-12M и 1.53E-11M, соответственно (см. табл. 20 и фиг. 10).

Активность BSSTEAP2/CD3-007 и BSSTEAP2/CD3-008 зависела от донора. Напротив, BSSTEAP2/CD3-005, BSSTEAP2/CD3-009 и изотипический контроль не проявили активности.

Анализ цитотоксичности при нацеливании на клетки С4-2 в присутствии анти-STEAP2хCD3 биспецифических антител и Т-клеток человека. Для контроля специфического уничтожения целевых клеток, содержащих STEAP2, с помощью проточной цитометрии, клетки С4-2 были помечены 1 мкМ флуоресцентного отслеживающего красителя Violet Cell Tracker (набор Life Technologies, № C34557). После мечения клетки инкубировали в течение ночи при 37°C. Отдельно МКПК человека высевали в среду RPMI с добавлением 1×10^6 клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37°C для обогащения лимфоцитов путем истощения адгезивных макрофагов, дендритных клеток и некоторых моноцитов. На следующий день целевые клетки инкубировали совместно с наивными МКПК с истощенными адгезивными клетками (соотношение эффектор/целевая клетка 4: 1) и серийным разведением биспецифических антител STEAP2хCD3 или контрольного антитела IgG1 (не связывается со STEAP2) (диапазон концентраций: от 66,7 нМ до 0,25 мкМ) в течение 48 ч при 37°C. Клетки извлекали из планшетов для культивирования клеток с использованием буфера для диссоциации клеток без ферментов и анализировали с помощью FACS. Для анализа FACS клетки окрашивали dead/live far red cell tracker (Invitrogen). 5×10^5 гранул для подсчета добавляли в каждую лунку непосредственно перед анализом FACS. 1×10^5 гранул были собраны для каждого образца. Для оценки специфичности уничтожения клетки были гейтированы на живых популяциях, меченных Violet. Процент живой популяции был записан и использован для расчета нормированной выживаемости.

Активацию Т-клеток оценивали путем инкубации клеток с непосредственно конъюгированными антителами с CD2 и CD69, а также путем анализа процента активированных (CD69+) Т-клеток от общего числа Т-клеток (CD2+). Несколько анти-STEAP2хCD3 биспецифических антител были протестированы на их способность индуцировать наивные Т-клетки на уничтожение целевых клеток, экспрессирующих STEAP2 человека (см. табл. 21 и фиг. 11). Все протестированные антитела активировали и направляли человеческие Т-клетки на истощение клеток С4-2 (сублинии аденокарциномы предстательной железы человека, полученные из клеток LnCap). Уничтожение целевых клеток наблюдали только в присутствии биспецифических антител, при этом клетки С4-2 истощались дозозависимым образом с пМ значениями ЭК₅₀. Кроме того, наблюдаемый лизис целевых клеток был связан с повышением количества CD69 клеток на CD2+ Т-клетках с пМ значениями ЭК₅₀ (см. табл. 21 и фиг. 12).

Таблица 21

Цитотоксичность и свойства активации Т-клеток выбранных биспецифических антител STEAP2хCD3

Биспецифическое антитело Обозначение	Истощение клеток С4-2, ЭК50 [М]	Активация Т-клеток, ЭК50 [М]
BSSTEAP2/ CD3-004	3.11E-12	9.40E-13
BSSTEAP2/ CD3-005	7.29E-12	+++
BSSTEAP2/ CD3-001	4.68E-12	1.61E-12
BSSTEAP2/ CD3-006	3.93E-12	+++
BSSTEAP2/ CD3-007	8.11E-12	+++
BSSTEAP2/ CD3-008	4.11E-12	+++
BSSTEAP2/ CD3-009	2.73E-12	+++

Данное изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами осуществления изобретения, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые описаны в данном документе, станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания. Такие модификации предназначены для того, чтобы охватываться прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий антитело к шеститрансмембранному эпителиальному антигену предстательной железы 2 (анти-STEP2 антитело) или его антигенсвязывающий фрагмент и цитотоксический агент, причем указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент и указанный цитотоксический агент ковалентно связаны через линкер, где указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218, и CDR вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226.

2. ADC по п.1, отличающийся тем, что указанные анти-STEP2 антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 220-222-224-228-230-232.

3. ADC по п.1, отличающийся тем, что указанные анти-STEP2 антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226.

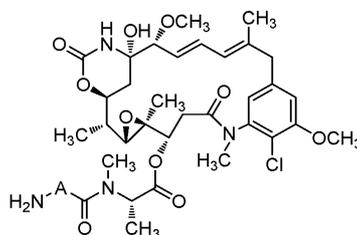
4. ADC по любому из пп.1-3, который интернализуется клетками, экспрессирующими STEAP2 человека.

5. ADC по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанное антитело является полностью человеческим.

6. ADC по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что цитотоксический агент выбирают из ауристина, майтанзиноида, тубулизина, производного томаймицина или производного доластатина.

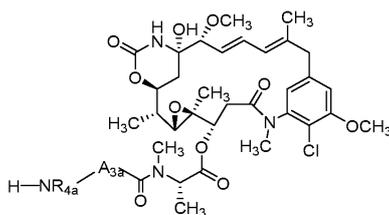
7. ADC по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что цитотоксический агент представляет собой ауристатин, выбранный из MMAE или MMAF, или майтанзиноид, выбранный из DM1 или DM4.

8. ADC по любому из пп.1-5, где цитотоксический агент представляет собой майтанзиноид, имеющий структуру:



(Формула I),

где А представляет собой арилен или гетероарилен, или



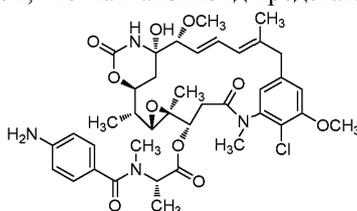
(Формула II)

где A_{3a} представляет собой аминокислоту, пептид, имеющий 2-20 аминокислот, алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероциклил, $-CR_5R_6-$, $-O-$, $-C(=O)-$, $-O-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-O-$, $-C(=O)-(CH_x)_{p1}-$, $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$, $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$, $-(O-(CH_2)_{p2})_{p3}-((CH_2)_{p2}-O)_{p3}-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)-S-$, $-C(=S)-NH-$, $-S-C(=S)-$, $-S-C(=S)-S-$, $-S-$, $-SO-$, $-SO_2-$, $-NR_4-$, $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$, $-N(R_4)-C(=O)O-$, $-N(R_4)-C(=O)-$, $-C(=O)-N(R_4)-$, $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$ или $-O-C(=O)-NR_4-$, где алкил, алкинил, алкенил, циклоалкил, арил, гетероарил и гетероциклил необязательно замещены; и $p1$, $p2$ и $p3$ каждый независимо представляет собой 0 или целое число от 1 до 100; x представляет собой 0, 1 или 2;

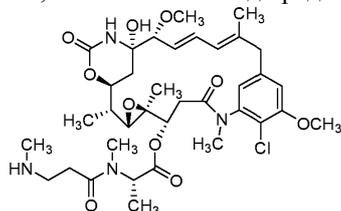
R_4 , R_5 , R_6 и R_8 каждый независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный: алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил или гетероциклил; и

R_{4a} представляет собой замещенный или незамещенный: алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил или гетероциклил.

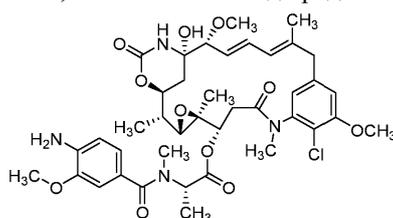
9. ADC по п.8, отличающийся тем, что майтанзиноид представляет собой:



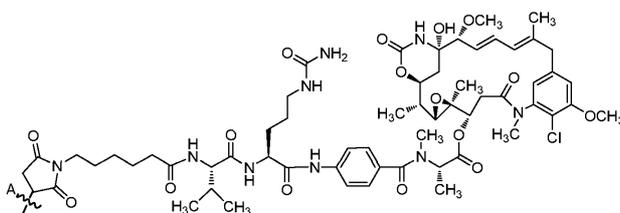
10. ADC по п.8, отличающийся тем, что майтанзиноид представляет собой:



11. ADC по п.8, отличающийся тем, что майтанзиноид представляет собой:

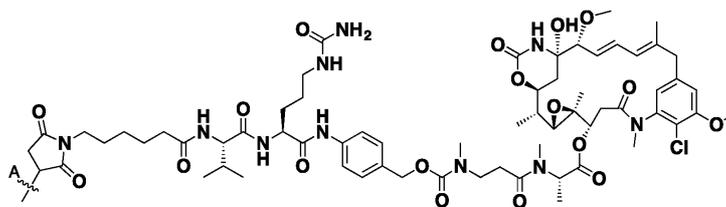


12. ADC по любому из пп.1-5, содержащий анти-STEP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и



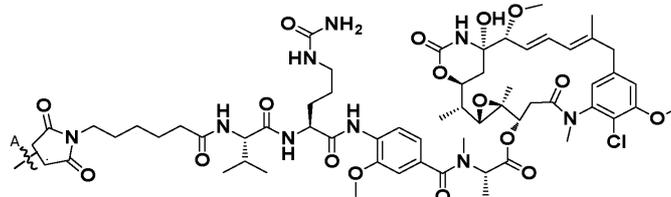
где $\overset{A}{\text{---}}$ представляет собой связь с анти-STEP2 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

13. ADC по любому из пп.1-5, содержащий анти-STEP2 антитело или его фрагмент, и



где ---A представляет собой связь с анти-STEP2 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

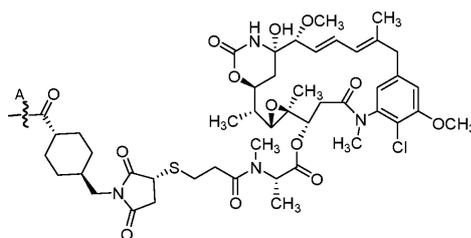
14. ADC по любому из пп.1-5, содержащий анти-STEP2 антитело или его фрагменты, и



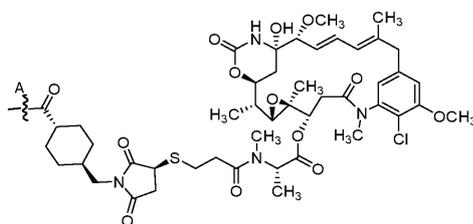
где ---A представляет собой связь с анти-STEP2 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

15. ADC по любому из пп.12-14, отличающийся тем, что связь с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом осуществляется через серную составляющую остатка цистеина.

16. ADC по любому из пп.1-5, содержащий анти-STEP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и



, ИЛИ



где ---A представляет собой связь с анти-STEP2 антителом или его фрагментом.

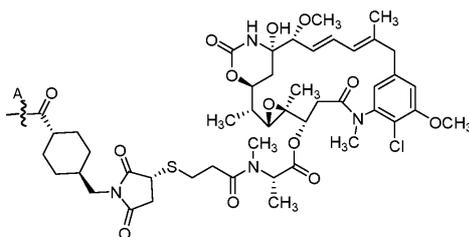
17. ADC по п.16, где связь с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом осуществляется через азотную составляющую остатка лизина.

18. ADC по любому из пп.1-17, отличающийся тем, что ADC содержит от 1 до 4 цитотоксических агентов на анти-STEP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

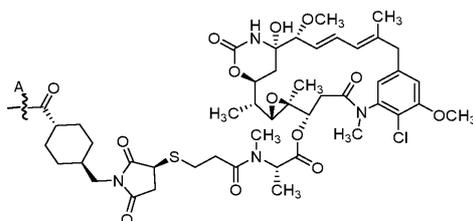
19. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-18 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, для лечения рака, связанного с экспрессией STEP-2, выбранного из группы, состоящей из рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака легкого, рака толстой кишки, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака матки и рака яичника.

20. Фармацевтическая композиция по п.19, содержащая смесь ADC, где смесь ADC содержит:

ADC по любому из пп.1-5, содержащий анти-STEP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и



ADC по любому из пп.1-5, содержащий анти-STEP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и



где $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{~}}\text{---}$ представляет собой связь с анти-STEP2 антителом или его фрагментом.

21. Фармацевтическая композиция по п.19 или 20, отличающаяся тем, что рак представляет собой рак предстательной железы.

22. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают шеститранс-мембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2 (STEAP2) человека, где указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат определяющие комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218, и CDR варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 6.

23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.22, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 220-222-224-228-230-232.

24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.22, отличающиеся тем, что указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218, и варибельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226.

25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.22-24, которые интернализуются клетками, экспрессирующими STEAP2 человека.

26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.22-25, отличающиеся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются полностью человеческими.

27. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают шеститранс-мембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2 (STEAP2) человека и CD3 человека, где указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат анти-STEP2 антигенсвязывающий домен, содержащий определяющие комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218, и CDR варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226.

28. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.27, отличающиеся тем, что анти-STEP2 антигенсвязывающий домен содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 220-222-224-228-230-232.

29. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.28, отличающиеся тем, что анти-STEP2 антигенсвязывающий домен содержит варибельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218, и варибельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226.

30. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.22-26 или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.27-29 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, для лечения рака, связанного с экспрессией STEAP-2, где рак, связанный с экспрессией STEAP-2, выбран из группы, состоящей из рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака легкого, рака толстой кишки, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака матки и рака яичника.

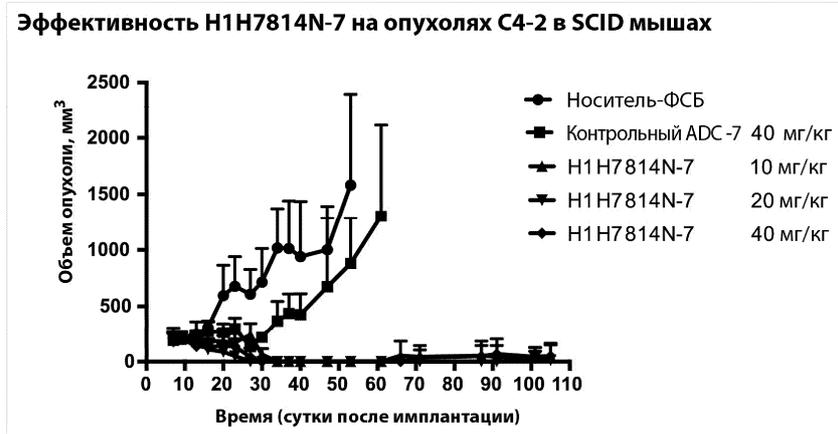
31. Фармацевтическая композиция по п.30, отличающаяся тем, что рак представляет собой рак предстательной железы.

32. Применение ADC по любому из пп.1-18 для изготовления лекарственного средства, предназна-

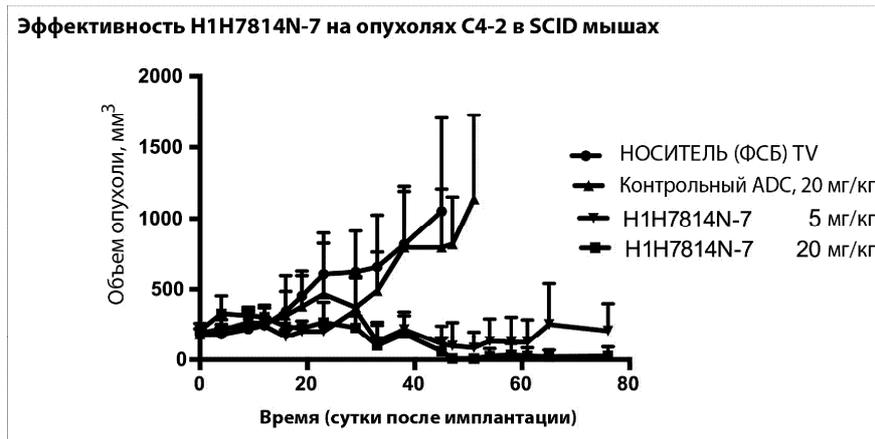
ченного для лечения рака, связанного с экспрессией STEAP-2, где рак, связанный с экспрессией STEAP-2, выбран из группы, состоящей из рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака легкого, рака толстой кишки, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака матки и рака яичника.

33. Применение по п.32, отличающееся тем, что рак, связанный с экспрессией STEAP-2, представляет собой рак предстательной железы.

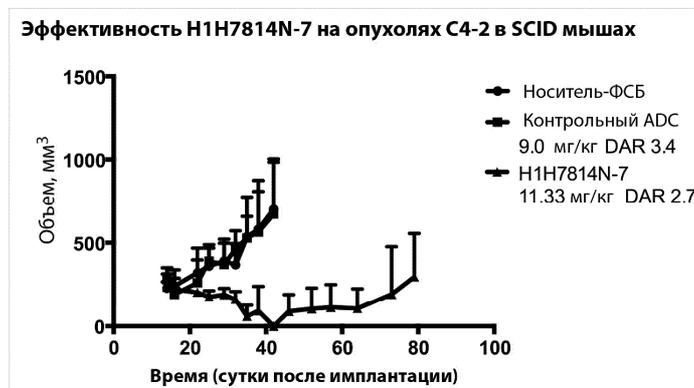
34. Применение по п.33, где рак предстательной железы представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы.



Фиг. 1



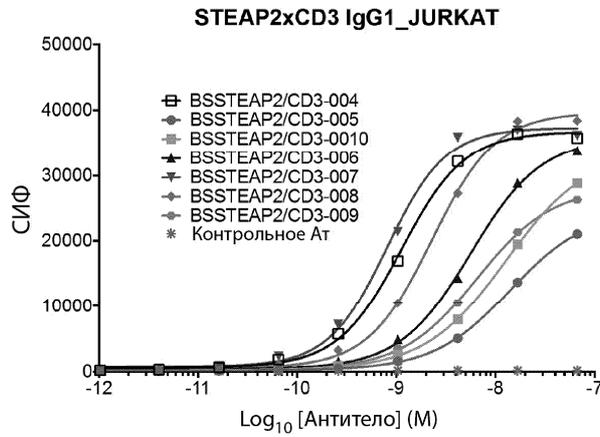
Фиг. 2



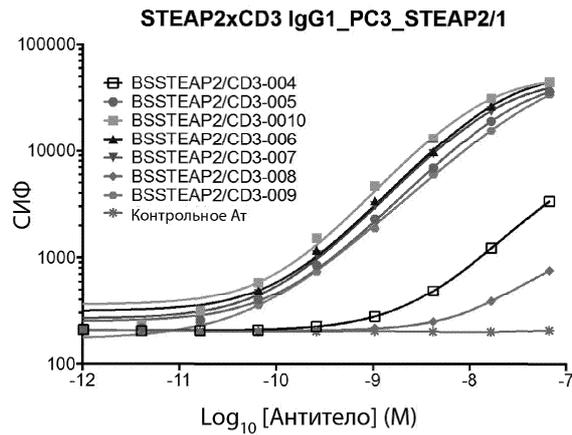
Фиг. 3



Фиг. 4

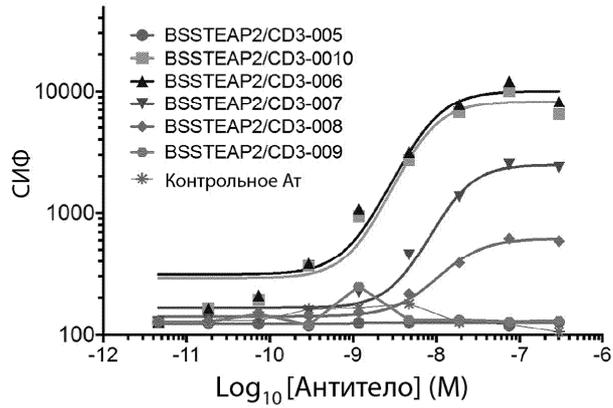


Фиг. 5



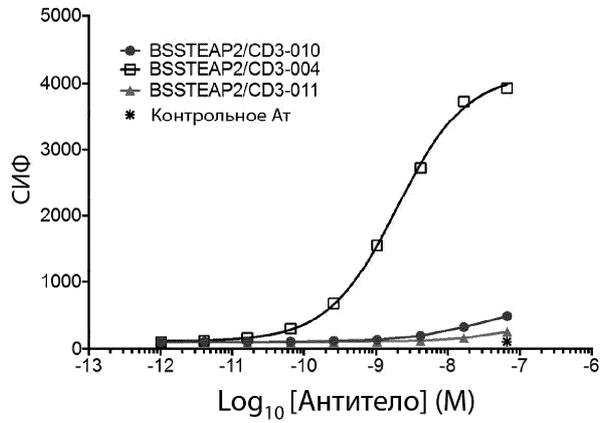
Фиг. 6

STEAP2xCD3 - Т-клетки яванского макака



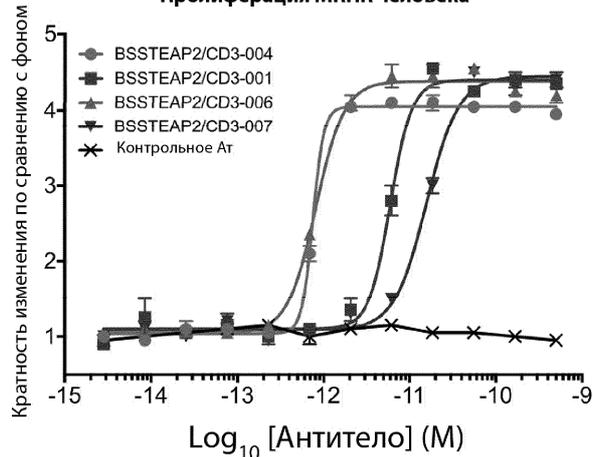
Фиг. 7

STEAP2xCD3 - Т-клетки яванского макака



Фиг. 8

**Биспецифические антитела αSTEAP2 x CD3
Пролиферация МКПК человека**



Фиг. 9

