

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292350 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.18

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

(22) Дата подачи заявки
2021.03.17

(54) АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С В7Н4

(31) 20164059.6
(32) 2020.03.18
(33) EP
(86) PCT/EP2021/056879
(87) WO 2021/185934 2021.09.23
(71) Заявитель:
ГЕНМАБ А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Копман Луис, Энгелбертс Патрик,
Верзейл Деннис, Ван Ден Бринк
Эдвард Н, Радемакер Рик, Босгра
Сието (NL), Эгерод Фредерикке Л
(DK), Сатейн Давид, Брей Эстер К В
(NL)

(74) Представитель:
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Костюшенкова М.Ю. (RU)

(57) Изобретение относится к антителам, связывающимся с В7Н4, включая биспецифические антитела, связывающиеся с В7Н4 и CD3. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела, и к применению антител для терапевтических и диагностических процедур, в частности, для лечения рака.

A1

202292350

202292350

A1

АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С В7Н4

ОПИСАНИЕ

Область техники настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам, связывающимся с В7Н4, в частности к биспецифическим антителам, связывающимся с В7Н4 и CD3. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела, и к применению антител для терапевтических и диагностических процедур, в частности, для лечения рака.

Введение

В7Н4 (В7-Н4, ингибитор Т-клеточной активации 1, содержащий домен V-set, или VTCN1) является членом семейства белков В7, где семейство содержит лиганды белков клеточной поверхности, которые связываются с рецепторами на лимфоцитах. Семейство В7 играет важную роль в регуляции иммунных реакций. В7Н4 отрицательно регулирует опосредованные Т-клетками иммунные ответы путем ингибирования Т-клеточной активации, пролиферации, продукции цитокинов и цитотоксической активности (Prasad et al., 2003, Immunity 18: 863-873). В7Н4 представляет собой трансмембранный белок типа I, который включает короткий внутриклеточный домен, гидрофобный трансмембранный домен и внеклеточный домен с IgV- и IgC-подобными доменами с четырьмя консервативными цистеиновыми остатками и семью сайтами для N-связанного гликозилирования. (Sica et al., 2003, Immunity 18: 849-861). На сегодняшний день рецептор для В7Н4 не идентифицирован.

В нормальной взрослой ткани экспрессия В7Н4 очень ограничена, тогда как экспрессия В7Н4 обнаруживается на опухолевых клетках во многих раковых тканях (Kaig and Janakiram, 2019, ESMO Open 4:e000554). При раке экспрессия В7Н4 коррелирует с поздними стадиями рака, плохим прогнозом и снижением общей выживаемости пациентов.

Следовательно, нацеливание на В7Н4 было предложено для лечения рака (Podojil and Miller, Immunological Reviews, 2017: 276, 40-51). В настоящее время разрабатывают антитела, связывающиеся с В7Н4, для лечения рака. Например, FPA150 представляет собой афукозилированное человеческое антитело, которое ослабляет опосредованное В7Н4 подавление Т-клеточной активации и проявляет активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (Wainberg et al., 2019, Annals of Oncology 30, Suppl. 5, v489 (1198P)). В настоящее время оно проходит ранние клинические испытания в качестве

монотерапии или в комбинации с пембролизумабом при развитых солидных опухолях.

Также были предприняты попытки нацелить Т-клетки на B7H4. B7H4/CD3-биспецифическое одноцепочечное антитело, Fab scFv, было получено на основе структуры Fab и одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv) мышинового антитела против B7H4 человека и мышинового антитела против CD3 человека (Iizuka et al., 2019, Clin Cancer Res 25: 2925-2934). Smith et al. описали сконструированные Т-клетки с B7H4-специфическими химерными антигенными рецепторами (CAR), которые проявляли противоопухолевую активность против B7H4-положительных ксенотрансплантатов опухоли яичников человека, но которые также демонстрировали полиорганную лимфоцитарную инфильтрацию и летальную токсичность (Smith et al. 2016, Molecular Therapy, Vol.24 Iss. 11 pp 1987-99) у мышей.

Хотя был достигнут некоторый прогресс, существует потребность в разработке основанной на антителах терапии рака, нацеленной на B7H4, которая была бы эффективной и/или безопасной для использования человеком.

Сущность настоящего изобретения

Задача настоящего изобретения состоит в предоставлении антител, содержащих антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4 человека, и антигенсвязывающую область, которая связывается с CD3, как например, CD3ε (эпсилон) человека. Антигенсвязывающие области таких антител содержат по меньшей мере каркасные области человека, как например, FR1, FR2, FR3 и FR4. Наиболее предпочтительно все каркасные области являются человеческими. Такие антигенсвязывающие области являются гуманизированными и/или человеческими антигенсвязывающими областями. Эти антитела полезны для лечения состояний, при которых желательно специфическое нацеливание и опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих B7H4, например, при состояниях, как например, рак. Предпочтительно такое антитело является подходящим для использования человеком, например, при лечении. Рак, который может быть подходящим для лечения, представляет собой солидные опухоли. Указанная экспрессия B7H4 и опосредованное Т-клетками уничтожение, например, в раковых клетках, могут варьироваться согласно настоящему изобретению от относительно низкой экспрессии B7H4, например, в клетках MCF-7, до относительно высокой экспрессии B7H4, как например, в клетках SK-BR3, как показано, например, в Примере 12. Более предпочтительно, такие биспецифические антитела имеют замены в константной области, что делает область Fc, если она присутствует, инертной.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к

биспецифическому антителу, содержащему антигенсвязывающую область, способную связываться с В7Н4 человека, и антигенсвязывающую область, которая способна связываться с CD3, как например, CD3ε (эпсилон) человека, где антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4 человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO. 25, 29 или 31, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO. 33, и где антигенсвязывающая область, которая способна связываться с CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO. 18, 19 и 21, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 23, GTN и 24, соответственно.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, как например, ДНК или РНК, кодирующим антитела, как определено в настоящем документе, а также к способам получения антител или их компонентов, как определено в настоящем документе.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к указанным антителам или нуклеиновым кислотам согласно настоящему изобретению для применения для лечения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Определение домена В7Н4, участвующего в связывании, с использованием химерных молекул В7Н4-В7Н3. Специфичность домена В7Н4 антител против В7Н4 определяли с использованием панели клеток, трансфицированных для экспрессии В7Н4 человека, химерных молекул В7Н4-В7Н3 человека В7Н3-IgV/В7Н4-IgC (II) или В7Н4-IgV/В7Н3-IgC (III), или В7Н3 человека (IV). Связывание определяли посредством проточной цитометрии. A = bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C4-FEAR, B = bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C3-FEAR, C = bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C2-FEAR, D = bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C1-FEAR, E = IgG1-В7Н3-BRCA84D.

Фиг 2. Связывание антител против В7Н4 с В7Н4, В7Н3 или химерными молекулами В7Н4-В7Н3. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C1-N52S-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C2-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C3-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C4-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7Н4-C5-FEAR с клетками НЕК, транзигентно трансфицированным для экспрессии В7Н4 человека или В7Н4-В7Н3 химерных молекул В7Н3-IgV/В7Н4-IgC или В7Н4-IgV/В7Н3-IgC, определяли посредством проточной цитометрии.

Фиг. 3. Связывание антител против B7H4 с вариантами B7H4 с аланиновыми мутациями в ECD. Связывание выражали как кратное изменение по сравнению с эталонным антителом. Кратное изменение определяли как $\text{Log}_{10}(\text{нормализованный gMFI}[\text{мутант ala}]/\text{нормализованный gMFI}[\text{wt}])$. Остатки, для которых кратное изменение связывания было ниже среднего кратного изменения — $1,5 \times \text{SD}$, считали «мутантами с потерей связывания». Остатки с положительным кратным изменением связывания представляют собой потерю связывающих остатков для эталонного антитела. Цифры под осью x относятся к аминокислотным положениям. (A) Результаты для C1-N52S с C2 в качестве эталонного антитела. (B) Результаты для C2 с C1-N52S в качестве эталонного антитела. (C) Результаты для C3 с C2 в качестве эталонного антитела.

Фиг. 4. Связывание антитела против B7H4 и биспецифического антитела CD3×B7H4 с B7H4 человека и яванского макака. Связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (A) и bsIgG1-huCD3-H101G-FEAL×B7H4-C1-N52S-FEAR (B) с клетками HEK-293F, транзientно трансфицированными B7H4 человека или B7H4 яванского макака, определяли посредством проточной цитометрии. Нетрансфицированные клетки HEK-293F (C) использовали в качестве отрицательного контроля, для них показано связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEAL×B7H4-C1-N52S-FEAR.

Фиг. 5. Связывание антитела против B7H4 и биспецифического антитела CD3×B7H4 с B7H4 кролика, крысы, мыши, собаки и свиньи. Связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (A) и bsIgG1-huCD3-H101G-FEAL×B7H4-C1-N52S-FEAR (B) с клетками HEK-293F, транзientно трансфицированными B7H4 кролика, крысы, мыши, собаки или свиньи, определяли посредством проточной цитометрии. Нетрансфицированные клетки HEK-293F (C) использовали в качестве отрицательного контроля, для них показано связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEAL×B7H4-C1-N52S-FEAR.

Фиг. 6. Связывание антител против B7H4 с клетками HEK-293F, транзientно трансфицированными B7H4 из разных видов. Связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (A), IgG1-B7H4-C3-FEAR (B), IgG1-B7H4-C2-FEAR (C), IgG1-B7H4-C4-FEAR (D) и IgG1-B7H4-C5-FEAR (E) с клетками HEK-293F, транзientно трансфицированными B7H4 человека, яванского макака, мыши, крысы или свиньи, или с нетрансфицированными клеткам HEK-293F, определяли посредством проточной цитометрии. IgG1-b12 использовали в качестве несвязывающего контрольного антитела (не показано).

Фиг. 7. Связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (A) и bsIgG1-huCD3-H101G-FEAL×B7H4-C1-N52S-FEAR (B) с клетками MCF-7 и MDA-MB-468. Связывание определяли посредством проточной цитометрии. IgG1-b12 (C) и bsIgG1-huCD3-H101G-FEAL×b12-FEAR (D) использовали в качестве несвязывающих контрольных антител.

Фиг. 8. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (A) с клетками NIH-OVCAR-3, HCC1954 и HeLa. Связывание определяли посредством проточной цитометрии. BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR (B) использовали в качестве несвязывающего контрольного антитела.

Фиг. 9. Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (A) и bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (B) с клетками SK-BR3 и MDA-MB-486. Связывание определяли посредством проточной цитометрии. bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR (C) и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR (D) использовали в качестве несвязывающих контрольных антител.

Фиг. 10. Связывание различных антител против B7H4 в формате гомодимера и bsAb с клетками MDA-MB-486 и HCC1954. Связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (A гомодимер), IgG1-B7H4-C2-FEAR (B гомодимер), IgG1-B7H4-C3-FEAR (C гомодимер), IgG1-B7H4-C4-FEAR (D гомодимер), IgG1-B7H4-C5-FEAR (E гомодимер), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (A bsAb), bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR [MDA-MB-468] или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C2-FEAR [HCC1954] (B bsAb), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C3-FEAR (C bsAb), bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR (D bsAb) и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR (E bsAb) определяли посредством проточной цитометрии. bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR (F bsAb) или IgG1-b12-K409R (F гомодимер) использовали в качестве несвязывающего контрольного антитела.

Фиг. 11. Индукция опосредованной Т-клетками цитотоксичности клеток SK-BR3 *in vitro* биспецифическими антителами CD3×B7H4 с применением очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток при варьирующихся соотношениях эффектора и мишени (Е:Т). bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR использовали в качестве несвязывающего контрольного антитела. A = bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, B = bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, C = bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR.

Фиг. 12. Индукция опосредованной Т-клетками цитотоксичности в различных линиях опухолевых клеток *in vitro* в присутствии биспецифических антител CD3×B7H4 с различными плечами CD3. bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR использовали в качестве несвязывающего контрольного антитела. A = bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, B = bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, C = bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, D = bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR.

Фиг. 13. Уровни экспрессии B7H4 и IC50 опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток. (A) Количественный проточный цитометрический

анализ уровней экспрессии B7H4 на линиях опухолевых клеток. Показаны отдельные измерения (точки), средние геометрические (столбики) и стандартное отклонение (столбики погрешностей). sABC = специфическая связывающая способность антител. (B) IC50 опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (I) или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (II) для различных линий опухолевых клеток. Каждая точка представляет эксперимент, проведенный с индивидуальным донором Т-клеток (4-6 доноров на клеточную линию), горизонтальные линии указывают медиану. Линии клеток ранжированы по уровню экспрессии B7H4.

Фиг. 14. Т-клеточная активация биспецифическими антителами против B7H4 в совместных культурах Т-клеток и опухолевых клеток. (А) Т-клеточная активация (% CD69 на клетках CD8+) в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (I) или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (II) для различных B7H4-положительных линий опухолевых клеток, определенная посредством проточной цитометрии. (В) EC50 Т-клеточной активации с использованием Т-клеток, полученных от 3-5 доноров, для каждой из линий клеток-мишеней. Каждая точка представляет эксперимент, проведенный с отдельным донором Т-клеток, горизонтальные линии показывают среднее геометрическое.

Фиг. 15. IFN γ в супернатанте совместных культур Т-клеток и опухолевых клеток при EC50, EC90 и EC99 для bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (А) и bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (В) с использованием Т-клеток от 3-4 доноров, определяемый мультиплексным анализом U-plex. Показаны отдельные измерения (точки), средние геометрические (горизонтальные линии) и стандартное отклонение (столбики погрешностей).

Фиг. 16. Уровни IL-6 и MCP-1 в плазме яванских макаков, получавших однократную внутривенную инфузию bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (А) или bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (В).

Фиг. 17. Профили зависимости средней концентрации в плазме от времени после однократной внутривенной инфузии bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (А) или bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (В).

Фиг. 18. Уровни экспрессии мРНК B7H4 в ряде первичных солидных опухолей. Уровни мРНК B7H4 извлекали из базы данных Omicsoft TCGA и визуализировали с использованием программного обеспечения Oncoland. Показания ранжировали по медиане экспрессии мРНК B7H4. THYM = тимома, UVM = увеальная меланома, PCPG = феохромоцитомы и параганглиомы, ACC = адренокортикальная карцинома, MESO =

мезотелиома, SKCM = кожная меланома, READ = аденокарцинома прямой кишки, COAD = аденокарцинома толстой кишки, GMB = мультиформная глиобластома, SARC = саркома, LIHC = гепатоцеллюлярная карцинома печени, LGG = глиома головного мозга более низкой степени злокачественности, KIRC = почечная светлоклеточная карцинома, TGCT = опухоли половых клеток яичка, KICH = хромофобная почка, STAD = аденокарцинома желудка, THCA = карцинома щитовидной железы, HNSC = плоскоклеточный рак головы и шеи, PRAD = аденокарцинома предстательной железы, LUAD = аденокарцинома легкого, ESCA = карцинома пищевода, CESC = плоскоклеточный рак шейки матки и эндоцервикальная аденокарцинома, KIRP = папиллярно-клеточный рак почки, UCS = карциносаркома матки, BLCA = уротелиальная карцинома мочевого пузыря, PAAD = аденокарцинома поджелудочной железы, LUSC = плоскоклеточная карцинома легкого, BRCA = инвазивная карцинома молочной железы, UCEC = карцинома тела матки и эндометрия, OV = серозная цистаденокарцинома яичника и CHOL = холангиокарцинома.

Таблица 1. Аминокислотная последовательность и последовательность нуклеиновой кислоты

SEQ ID NO:	Эталон	Домен	Последовательность
1	B7H4 человека	ORF	<u>MASLGQILFWSIISIILAGAI</u> ALIIGFGISG RHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIK LSDIVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSE QDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLRLKNV QLTDAGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTG AFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPQ PTVVASQVDQGANFSEVSNTSFELNSE NVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIA KATGDIKVTESI KRRSHLQLLNSKASLC VSSFFAISWALLPLSPYLMLK

2	Macaca fascicularis B7H4 транскрипт 1	ORF	<u>MASLGQILFWSIISIIFILAGAI</u> ALIIGFGISG RHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIK LSDIVIQLKEGVIGLVHEFKEGKDELSE QDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNV QLTDAGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTG AFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPQ PTVVASQVDQGANFSEVSNTSFELNSE NVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIA KATGDIKVTSEIKRRSHLQLLNSKASLC VSSFLAISWALLPLAPYMLK
3	Canis familiaris B7H4	ORF	<u>MASPGQNIWFWSIISVIII</u> LAGAIALIIGFGIS GRHSITVTTLTSAGNIGEDGILSCTFEPDIK LSDIVIQLKEGVMGLVHEFKEGKDDLSD DQDEMFRGRTAVFADQVIGGNASLRLKN VQLTDAGTYKCYIITSKGKGNANLEYKT GAFSIPEVNVDYNASSENLRCEAPRWFPQ PTVVASQADQGANFSEVFNTSFELNSE NVTMKVVSVLNVNTINNTYSCMIENDIA KATGDIKVTDSEIKRRSHLQLLNSKASLG VSSFFAISWVLLPLSSYMLK
4	Oryctolagus cuniculus B7H4	ORF	<u>MASLGQIIFWSIISI</u> IIILAGAIALIIGFGISGR HSITVTTLTSAGNIGEDGILSCTFEPDIRLS DIVIQLKEGVVGLVHEFKEGKDDLSDQ DEMFRGRTAVFTDQVIVGNASLRLKNVQ LTDAGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGA FSMPEVNLDYNASSESLRCEAPRWFPQPT VVASQVDQGANFSEVSNTSFELNSEN V TMKVVSVLNVTVNNTYSCMIENDIAKA TGDIKVTDSEIKRRSSLQLLNSRAAPSVSP RSAVGWLLLPLSSYVMLK

5	Rattus norvegicus B7H4	ORF	<u>MASLGQIIFWSIINVIII</u> LAGAIVLIIGFGISG KHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCTFEPDIK LNGIVIQLWKEGIKGLVHEFKEGKDDL SQ QHEMFRGRTAVFADQVVVGNASLRLKN VQLTDAGTYTCYIHTSKGKG N ANLEYKT GAFSMPEINVDYNASSESLRCEAPRWFPQ PTVAWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSE NVTMKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIA KATGDIK VTDSEVKRRSQLELLNSGSPC VSSVSAAGWALLSLSCCLMLR
6	Mus musculus B7H4	ORF	<u>MASLGQIIFWSIINIIII</u> LAGAIALIIGFGISG KHFITVTTFTSAGNIGEDGTLSCTFEPDIK LNGIVIQLWKEGIKGLVHEFKEGKDDL SQ QHEMFRGRTAVFADQVVVGNASLRLKN VQLTDAGTYTCYIRTSKGKG N ANLEYKT GAFSMPEINVDYNASSESLRCEAPRWFPQ PTVAWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSE NVTMKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIA KATGDIK VTDSEVKRRSQLQLLNSGSPC VFSSAFVAGWALLSLSCCLMLR
7	Sus scrofa B7H4	ORF	<u>MASLGQVVFWSIISIIII</u> LAGAIAFIIGFGIS GRHSITVTTLTSAGNIGEDGILSCTFEPDIK LSDIVIQLWKEGVTGLVHEFKKGKDDL S DQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKN VQLTDAGTYKCYIITSKGKGNAKLEYKT GAFSIPEVNVDSDNASSESLRCEAPRWFPQ PTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNPE NVTMKVVSVLYNVTINTTYSCMIENDIA KATGDIR VTDSEIKRQSHLQLLNSKASLC LSSFVAISWVLLPLCPYLMLK
8	Kozak		GCCGCCACC

9	B7H3	ORF	<u>MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTG</u> <u>A</u> LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSEPEP GFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQD QGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRV RVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAP YSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQG YPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMAN EQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNP VLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPED PVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNL IWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRT ALFPDLLAQGNASLRLQRVRVVADEGSFT CFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLE PNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFW QDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVH SVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAH GSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIA LLVALAFVCWRKIKQSCEENAGAEDQD GEGEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA
10	B7H4-IgV/B7H3-IgC	ORF	<u>MASLGQILFWSIISIIILAGAIALIIGFGISG</u> RHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIK LSDIVIQLWKEGVLGLVHEFKEGKDELSE QDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNV QLTDAGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTG APYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSY RGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQM ANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVR NPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWV TVGLSVCLIALLLVALAFVCWRKIKQSCEE ENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSDSK EDDGQEIA

11	B7H3-IgV/B7H4-IgC	ORF	<u>MLRRRGSPGMGVHVG</u> AALGALWFCLTG <u>A</u> LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSEPG GFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQD QGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRV RVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAF SMPEVNV DYNASSETLRCEAPRWFPQPT VWWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSEN TMKVVS VLYNVTINNTYSCMIENDIAKA TGDIKVT ESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSS FFAISWALLPLSPYMLK
12	B7H4ECD-FcHisC	Зрелый белок	LIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILS CTFEPDIKLSDIVIQWLKEGVLGLVHEFK EGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGN ASRLKKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGN ANLEYKTGAFSMPEVNV DYNASSETLRC EAPRWFPQPTVWWASQVDQGANFSEVS NTSFELNSENVTMKVVS VLYNVTINNTY SCMIENDIAKATGDIKVT ESEIKRRSHLQL LNSKASIEGRMDPKSCDKTHTCPPCPAPE AEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTAPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHHHHHEP EA

13	Зрелый CD3ε (эпсилон) человека	Зрелый белок	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCP QYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSD EDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPED ANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVI VDICITGGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVT RGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDIYEPI RKGQRDL YSGLNQRR
14	b12_VH	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGY <u>RFSNFVIHWVRQAPGQRFEGWGWINPY</u> <u>NGNKEFS</u> AKFQDRVTFTADTSANTAYME LRSLRSADTAVYYC <u>ARVGPYSWDDSPQD</u> <u>NYMDVWGKGTTVIVSS</u>
15	b12_VL	VL	EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSH <u>SIRS</u> <u>RR</u> VAWYQHKPGQAPRLVIHGVSNRASGI SDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYC <u>QVYGASSYTFGQGTKLERK</u>
16	VH_huCD3- H1L1	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN</u> <u>NYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ</u> MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS <u>WFAYWGQGTLVTVSS</u>
17	VH_huCD3- H1L1-H101G	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN</u> <u>NYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ</u> MNNLKTEDTAMYYCVRGGNFGNSYVS <u>WFAYWGQGTLVTVSS</u>
18	VH_huCD3- H1L1_CDR1	VH_CD R1	GFTFNTYA
19	VH_huCD3- H1L1_CDR2	VH_CD R2	IRSKYNNYAT
20	VH_huCD3- H1L1_CDR3	VH_CD R3	VRHGNFGNSYVSWFAY

21	VH_huCD3-H1L1-H101G_CDR3	VH_CD R3	VRGGNFGNSYVSWFAY
22	VL_huCD3-H1L1	VL	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAV TTSNYANWVQQTPGQAFRGLIGGTNKRA PGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESI YFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
23	VL_huCD3-H1L1_CDR1	VL_CDR 1	TGAVTTSNY
	VL_huCD3-H1L1_CDR2	VL_CDR 2	GTN
24	VL_huCD3-H1L1_CDR3	VL_CDR 3	ALWYSNLWV
25	VH_B7H4-C1	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY <u>GGS</u> <u>FSGYY</u> WSWIRQPPGKGLEWIGE <u>INHSGST</u> NYNPSLKSRTVISIDTSKNQFSLKLTSTVTA ADTAVFYC <u>ARGLENWNFNDS</u> WGQGTLLVT VSS
26	VH_B7H4-C1_CDR1	VH_CD R1	GGSFSGYY
27	VH_B7H4-C1_CDR2	VH_CD R2	INHSGST
28	VH_B7H4-C1_CDR3	VH_CD R3	ARGLENWNFNDS
29	VH_B7H4-C1-N52S	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY <u>GGS</u> <u>FSGYY</u> WSWIRQPPGKGLEWIGE <u>ISHSGST</u> NYNPSLKSRTVISIDTSKNQFSLKLTSTVTA ADTAVFYC <u>ARGLENWNFNDS</u> WGQGTLLVT VSS
30	VH_B7H4-C1-N52S_CDR2	VH_CD R2	ISHSGST

31	VH_B7H4-C1-N52Q	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY <u>GGS</u> <u>ESGYY</u> WSWIRQPPGKGLEWIGE <u>IQHSGST</u> NYNPSLKSRVTISIDTSKNQFSLKLTSTVTA ADTAVFYC <u>ARGLFNWNFDS</u> WGQGTTLVT VSS
32	VH_B7H4-C1-N52Q_CDR2	VH_CD R2	IQHSGST
33	VL_B7H4-C1	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <u>QGIR</u> <u>NDL</u> GWYQQKPGKAPKRLIY <u>GASSLQSGV</u> PSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC <u>LQHNSYPRT</u> FGQGTTVEIK
34	VL_B7H4-C1_CDR1	VL_CDR 1	QGIRND
	VL_B7H4-C1_CDR2	VL_CDR 2	GAS
35	VL_B7H4-C1_CDR3	VL_CDR 3	LQHNSYPRT
36	VH_B7H4-C3	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GYT</u> <u>FTNFW</u> IHWVRQAPGQGLEWIGE <u>IDPSDS</u> <u>YTNYNQKFKGRVTITRDTSTSTAYLELSS</u> LRSEDTAVYYC <u>AREITTVDY</u> WGQGTTLVT VSS
37	VH_B7H4-C3_CDR1	VH_CD R1	GYTFTNFW
38	VH_B7H4-C3_CDR2	VH_CD R2	IDPSDSYT
39	VH_B7H4-C3_CDR3	VH_CD R3	AREITTVDY
40	VL_B7H4-C3	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAT <u>SSIS</u> <u>YMH</u> WYQQKPGKAPKGWIY <u>DTSKLAHG</u> VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY <u>CHQRRSYPFT</u> FGQGTKVEIK
41	VL_B7H4-C3_CDR1	VL_CDR 1	SSISY

	VL_B7H4-C3_CDR2	VL_CDR 2	DTS
42	VL_B7H4-C3_CDR3	VL_CDR 3	HQRRSYPFT
43	VH_B7H4-C2	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GYT</u> <u>FTSYW</u> IGWVRQAPGQGLEWIGDI <u>YPGGG</u> <u>Y</u> TNYNEKF K GRVTITRDTSTSTAYLELSS LRSEDTAVYYC <u>ARLDGSSYRGAMDS</u> WG QGTLVTVSS
44	VH_B7H4-C2_CDR1	VH_CD R1	GYTFTSYW
45	VH_B7H4-C2_CDR2	VH_CD R2	IYPGGGYT
46	VH_B7H4-C2_CDR3	VH_CD R3	ARLDGSSYRGAMDS
47	VL_B7H4-C2	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS <u>QGF</u> <u>NKY</u> VAWYQQKPGKAPKLLIYYT <u>ST</u> LQPG VPSRFGSGSGRDTLTITSLQPEDFATYY <u>CLQYGNLLY</u> AFGQGTKVEIK
48	VL_B7H4-C2_CDR1	VL_CDR 1	QGFNKY
	VL_B7H4-C2_CDR2	VL_CDR 2	YTS
49	VL_B7H4-C2_CDR3	VL_CDR 3	LQYGNLLYA
50	VH_B7H4-C4	VH	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAAS <u>GFTV</u> <u>SSNY</u> MNWVRQAPGKGLEWVSVI <u>YGSGR</u> <u>T</u> YYADSVKGRVTISRDN S KNTLYLQMNS LRAEDTAVYYC <u>ARDTYAMDV</u> WGQGT VTVSS
51	VH_B7H4-C4_CDR1	VH_CD R1	GFTVSSNY
52	VH_B7H4-C4_CDR2	VH_CD R2	IYGSGRT

53	VH_B7H4-C4_CDR3	VH_CD R3	ARDTYAMDV
54	VL_B7H4-C4	VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS <u>QSVS</u> <u>SSYL</u> AWYQQKPGQAPRLLIY <u>GASS</u> RATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGSSPMYTF</u> GQGTKLEIK
55	VL_B7H4-C4_CDR1	VL_CDR 1	QSVSSSY
	VL_B7H4-C4_CDR2	VL_CDR 2	GAS
56	VL_B7H4-C4_CDR3	VL_CDR 3	QQYGSSPMYT
57	IgG1-Fc	Констан тный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

58	IgG1-Fc_F405L	Констан тный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
59	IgG1-Fc_FEA	Констан тный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

60	IgG1-Fc_FEAL	Констан тный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
61	IgG1-Fc_FEAR	Констан тный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

62	IgG1-Fc_K409R	Констан тный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
63	Каппа	Констан тный	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSITYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
64	Лямбда	Констан тный	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
65	VH_B7H4-C5	VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSI <u>KSGSY</u> YWGWIQQPPGKGLEWIGNIYYSG <u>STYYN</u> PSLRSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCAREGSYPNQFDPWGQGT LVTVSS
66	VH_B7H4- C5_CDR1	VH_CD R1	GGSIKSGSYY
67	VH_B7H4- C5_CDR2	VH_CD R2	IYYSGST
68	VH_B7H4- C5_CDR3	VH_CD R3	AREGSYPNQFDP

69	VL_B7H4-C5	VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSV <u>SSN</u> LAWYQQKPGQAPRLLIY <u>G</u> ASTRATGI PARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC <u>QQYHSFPFT</u> FGGGTKVEIK
70	VL_B7H4- C5_CDR1	VL_CDR 1	QSVSSN
	VL_B7H4- C5_CDR2	VL_CDR 2	GAS
71	VL_B7H4- C5_CDR3	VL_CDR 3	QQYHSFPFT

Области CDR в приведенной выше таблице (CDR1, CDR2 и CDR3 и подчеркнутые последовательности в последовательностях VH и VL) были аннотированы в соответствии с IMGT (см. Lefranc MP. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999] и Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)). Ссылки на K405L и K409R, использованные в приведенной выше таблице, соответствуют нумерации по индексу Eu (описанной в Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689 (1991)).

Подробное описание настоящего изобретения

Определения

В контексте настоящего изобретения термин «антитело» предназначен для обозначения молекулы иммуноглобулина, фрагмента молекулы иммуноглобулина или производного любого из них, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном при типичных физиологических и/или опухоль-специфических состояниях с периодом полужизни значительных периодов времени, как например, по меньшей мере приблизительно 30 минут, по меньшей мере приблизительно 45 минут, по меньшей мере приблизительно один час, по меньшей мере приблизительно два часа, по меньшей мере приблизительно четыре часа, по меньшей мере приблизительно 8 часов, по меньшей мере приблизительно 12 часов, по меньшей мере приблизительно 24 часа или более, по меньшей мере приблизительно 48 часов или более, по меньшей мере приблизительно 3, 4, 5, 6, 7 или более дней и т.д., или любого другого релевантного функционально-определенного периода (как например, время, достаточное для индукции, стимуляции, усиления и/или модулирования физиологического ответа, связанного со связыванием антител с антигеном,

и/или время, достаточное для интернализации антитела). Антитело содержит связывающую область (или связывающий домен, который может быть использован в настоящем документе, оба имеют одинаковое значение), которая может взаимодействовать с антигеном, причем связывающая область содержит переменные области как тяжелой, так и легкой цепей молекулы иммуноглобулина, или тому подобное. Антитела могут содержать константные области антител (Ab), которые могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, как например, C1q, первый компонент классического пути активации комплемента.

В контексте настоящего изобретения термин «антитело» включает моноклональное антитело (mAb), антитело-подобный полипептид, химерное антитело, гуманизированное антитело, а также «фрагмент антитела» или «его фрагмент», сохраняющий способность специфически связываться с антигеном (антигенсвязывающий фрагмент), обеспечиваемый любым известным способом, таким как, например, ферментативное расщепление, пептидный синтез и технология рекомбинантной ДНК. Термин «антитело» включает биспецифические антитела и/или антитела, имеющие дополнительные модификации, например, их конъюгаты антитело-лекарственное средство.

Антитело, как определено согласно настоящему изобретению, может иметь любой изотип, если раскрытие в настоящем документе не ограничено иным образом.

Показано, что антигенсвязывающую функцию антитела могут выполнять фрагменты полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антитело», включают (i) фрагмент Fab' или Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из переменного домена легкой цепи (VL), переменного домена тяжелой цепи (VH), константной области легкой цепи (CL) и домена 1 константной области тяжелой цепи (CH1), или одновалентное антитело, как описано в WO 2007/059782, (ii) фрагменты F(ab')₂, двухвалентные фрагменты, содержащие два фрагмента Fab, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области, (iii) фрагмент Fd, состоящий по существу из доменов VH и CH1, (iv) фрагмент Fv, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989), который состоит по существу из домена VH и также называется доменным антителом Holt et al., Trends Biotechnol. 2003 Nov, 21(11):484-90, (vi) верблюдовые или нанотела Revets et al., Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan, 5(1):111-24 и (vii) выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с помощью рекомбинантных способов синтетическим линкером, что позволяет сделать их единой белковой цепью, в которой

участки VL и VH объединяются в пары с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), см., например, Revets et al., Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan, 5(1):111-24 и Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охватываются термином антитело, если не указано иное или явно не указано контекстом. Хотя такие фрагменты обычно включаются в определение антитела, они вместе и каждый независимо являются уникальными признаками настоящего изобретения, проявляющими различные биологические свойства и пользу. Эти и другие полезные фрагменты антител в контексте настоящего изобретения описаны далее в настоящем документе.

Антитело может быть получено и собрано из различных систем экспрессии или продукции *in vitro* или *ex vivo*, например, из рекомбинантно модифицированных клеток-хозяев, из гибридом или систем, в которых используются клеточные экстракты, поддерживающие транскрипцию *in vitro* и/или трансляцию последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих антитело. Следует понимать, что множество различных антител, причем антител, как они определены в контексте настоящего изобретения, могут быть получены путем получения каждого антитела отдельно в системе продукции, как указано выше, и последующего смешивания антител, или путем получения нескольких антител в одной и той же системе продукции.

В контексте настоящего изобретения термин «иммуноглобулиновая тяжелая цепь» или «тяжелая цепь иммуноглобулина» предназначен для обозначения одной из тяжелых цепей иммуноглобулина. Тяжелая цепь обычно состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно в настоящем документе VH) и константной области тяжелой цепи (сокращенно в настоящем документе CH), которая определяет изотип иммуноглобулина. Константный участок тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. В контексте настоящего изобретения термин «иммуноглобулин» предназначен для обозначения класса структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, все четыре потенциально связаны между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована (см., например, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))). В структуре иммуноглобулина две тяжелые цепи соединены между собой дисульфидными связями в так называемую «шарнирную область». Как и тяжелые цепи, каждая легкая цепь обычно состоит из нескольких областей, вариабельной области легкой цепи (сокращенно в настоящем документе VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена, CL. Кроме того, области VH и VL могут быть

дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определенных петель), также называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующимися с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

В контексте настоящего изобретения термины «полумолекулы», «Fab-плечо» и «плечо» относятся к одной паре тяжелая цепь-легкая цепь. Когда описывается, что биспецифическое антитело содержит антитело в форме полумолекулы, «производное от» первого антитела, и антитело в форме полумолекулы, «производное от» второго антитела, термин «производное от» указывает на то, что биспецифическое антитело было получено путем рекомбинации любым известным способом указанных полумолекул из каждого из указанных первого и второго антител в полученное биспецифическое антитело. В этом контексте «рекомбинация» не предназначена для ограничения каким-либо конкретным способом рекомбинации и, таким образом, включает все способы получения биспецифических антител, описанные в настоящем документе ниже, включая, например, рекомбинацию путем обмена полумолекулами, а также рекомбинацию на уровне нуклеиновых кислот и/или путем совместной экспрессии двух полумолекул в одних и тех же клетках.

В контексте настоящего изобретения термин «антигенсвязывающая область» или «область связывания» относится к области антитела, которая связывается с антигеном. Антигеном может быть любая молекула, например, полипептид. Антигены могут быть, например, представлены на клетке, бактерии или вирусе. Термины «антиген» и «мишень» могут, если из контекста не следует иное, использоваться взаимозаменяемо в контексте настоящего изобретения. Термины «антигенсвязывающая область» и «антигенсвязывающий сайт» могут, если из контекста не следует иное, использоваться взаимозаменяемо в контексте настоящего изобретения.

Термин «блокирует связывание», или «блокирует связывание антитела», или «перекрестно-блокирующее связывание», или «перекрестно-блокирует связывание» относится к случаю, когда одно антитело, связанное со специфическим антигеном, препятствует связыванию второго антитела с тем же антигеном и наоборот. В отсутствие другого антитела каждое антитело обладает способностью связываться с антигеном, что определяется значительным ответом связывания, тогда как у одного из антител отсутствует ответ связывания, когда присутствует другое антитело. Способность одного антитела

блокировать связывание другого антитела можно определить с помощью биослойной интерферометрии в формате классического сэндвич-анализа связывания эпитопов, например, как описано в Примере 5 в настоящей заявке и в Abdiche et al. (Abdiche YN, Malashock DS, Pinkerton A, Pons J. Exploring blocking assays using Octet, ProteOn, and Biacore biosensors. Anal Biochem. 2009, 386(2): 172-180). Кратко, в сэндвич-анализе связывания эпитопов антитело в растворе тестируют на связывание с его специфическим антигеном, который сначала захватывается иммобилизованным антителом. В контексте настоящего изобретения одно антитело не блокирует связывание второго антитела, если оно способно связываться с антигеном в присутствии второго антитела и наоборот. Термины «блокирует связывание», или «блокирует связывание антитела», или «перекрестно-блокирующее связывание», или «перекрестно-блокирует связывание» могут, если из контекста не следует иное, использоваться взаимозаменяемо в контексте настоящего изобретения. Антитело, о котором говорят, что оно блокирует связывание другого антитела, может также быть указано как конкурирующее с другим антителом за связывание с мишенью.

В контексте настоящего изобретения термин « K_D » (М) относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген и ее получают путем деления k_d на k_a . K_D также может быть обозначена как «аффинность связывания».

В контексте настоящего изобретения термин « k_d » (s^{-1}) относится к константе скорости диссоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанное значение также упоминается как значение k_{off} или скорость диссоциации.

В контексте настоящего изобретения термин « k_a » ($M^{-1} \times s^{-1}$) относится к константе скорости ассоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанное значение также упоминается как значение k_{on} или скорость ассоциации.

В контексте настоящего изобретения термин «связывание» относится к связыванию антитела с заранее определенным антигеном или мишенью, как правило, с аффинностью связывания, соответствующей K_D $1E^{-6}$ М или менее, например, $5E^{-7}$ М или менее, $1E^{-7}$ М или менее, как например, $5E^{-8}$ М или менее, как например, $1E^{-8}$ М или менее, как например, $5E^{-9}$ М или менее, или как например, $1E^{-9}$ М или менее, при определении посредством биослойной интерферометрии с использованием антитела в качестве лиганда и антигена в качестве аналита, и связыванием с заданным антигеном с аффинностью, соответствующей KD , которая в по меньшей мере десять раз ниже, как например, по меньшей мере 100 раз ниже, например, по меньшей мере 1000 раз ниже, как например, по меньшей мере 10000 раз ниже, например, по меньшей мере 100000 раз ниже, чем его аффинность для связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от заданного антигена или близкородственного антигена.

В контексте настоящего изобретения термин «B7H4» относится к белку, названному B7H4, который также упоминается как: B7-H4, ингибитор Т-клеточной активации 1, содержащий домен V-set, или VTCN1. B7H4 является членом семейства белков B7, которое содержит лиганды белков клеточной поверхности, которые связываются с рецепторами на лимфоцитах. B7H4 представляет собой трансмембранный белок типа I, который включает короткий внутриклеточный домен, гидрофобный трансмембранный домен и внеклеточный домен с IgV- и IgC-подобными доменами с четырьмя консервативными цистеиновыми остатками и семью сайтами для N-связанного гликозилирования. (Sica et al., 2003, Immunity 18: 849-861). Белки B7H4 известны у различных видов, например, B7H4 человека (*Homo sapiens*) (номер доступа Uniprot Q7Z7D3), B7H4 транскрипт 1 яванского макака (*Macaca fascicularis*) (номер доступа Uniprot A0A2K5U6P5), B7H4 собаки (*Canis familiaris*) (номер доступа Uniprot F1P8R9), B7H4 кролика (*Oryctolagus cuniculus*) (номер доступа Uniprot G1TQE8), B7H4 крысы (*Rattus norvegicus*) (номер доступа Uniprot Q501W4), B7H4 мыши (*Mus musculus*) (номер доступа Uniprot Q7TSP5) и B7H4 свиньи (*Sus scrofa*) (номер доступа Uniprot F1SAY4). Могут существовать природные варианты перечисленных последовательностей B7H4.

В контексте настоящего изобретения термин «CD3» относится к белку кластера дифференцировки 3 человека, который является частью белкового комплекса корецептора Т-клеток и состоит из четырех различных цепей. CD3 обнаруживается у различных видов, и, таким образом, термин «CD3» может не ограничиваться CD3 человека, если из контекста не следует иное. У млекопитающих комплекс содержит цепь CD3 γ (гамма) (цепь CD3 γ человека UniProtKB/Swiss-Prot No P09693 или CD3 γ яванского макака UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI7), цепь CD3 δ (дельта) (CD3 δ человека UniProtKB/Swiss-Prot No P04234 или CD3 δ яванского макака UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI8), две цепи CD3 ϵ (эпсилон) (CD3 ϵ человека: UniProtKB/Swiss-Prot No P07766, последовательность которых в настоящем документе включена как SEQ ID NO: 13, в которой аминокислотные остатки 1-22 представляют собой сигнальный пептид, а аминокислотные остатки 23-207 представляют собой зрелый полипептид CD3 ϵ , CD3 ϵ яванского макака UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI5 или CD3 ϵ макаки-резуса UniProtKB/Swiss-Prot No G7NCB9), и цепь CD3 ζ (дзета) (CD3 ζ человека UniProtKB/Swiss-Prot No P20963, CD3 ζ яванского макака UniProtKB/Swiss-Prot No Q09TK0). Эти цепи связываются с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (TCR), и генерируют сигнал активации в Т-лимфоцитах. Молекулы TCR и CD3 вместе составляют комплекс TCR.

Термин «область связывания антитела» относится к области антигена, которая содержит эпитоп, с которым связывается антитело. Область связывания антитела может

быть определена путем связывания эпитопов с использованием биослойной интерферометрии, аланинового сканирования или анализов перетасовки доменов (с использованием антигенных конструкций, в которых области антигена заменяются областями другого вида, и определения того, связывается ли антитело с антигеном или нет). Аминокислоты в области связывания антитела, которые участвуют во взаимодействии с антителом, могут быть определены с помощью водород/дейтерий-обменной масс-спектрометрии и/или кристаллографии антитела, связанного с его антигеном.

Термин «эпитоп» означает антигенную детерминанту, которая специфически связывается с антителом. Эпитопы обычно состоят из поверхностных групп молекул, таких как, например, аминокислоты, боковые цепи сахаров или их комбинации, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первыми, но не со вторыми, теряется в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, которые непосредственно участвуют в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в связывании, например, аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются или покрываются антителом, когда оно связывается с антигеном (другими словами, аминокислотный остаток находится внутри или в непосредственной близости от области узнавания специфического антитела).

В контексте настоящего изобретения термины «моноклональное антитело», «моноклональное Ab», «композиция моноклонального антитела», «mAb» и т.п. относятся к препарату молекул антител одного молекулярного состава и обычно проявляют единую специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Моноклональное антитело обычно может быть получено идентичными клетками, которые все являются клонами уникальной родительской клетки, как, например, гибридомы, стабильные клеточные линии и т.п. Соответственно, термин «человеческое моноклональное антитело» относится к антителам, проявляющим единую специфичность связывания, которые имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Моноклональные антитела человека могут продуцироваться гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного или трансхромосомного животного, отличного от человека, например, трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитый с иммортализованной клеткой. Моноклональные антитела человека могут быть получены из человеческих В-клеток или плазматических клеток. Моноклональные антитела также могут быть получены из рекомбинантно

модифицированных клеток-хозяев или систем, в которых используются клеточные экстракты, поддерживающие транскрипцию *in vitro* и/или трансляцию последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих антитело.

В контексте настоящего изобретения термин «изотип» относится к классу иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM) или любым их аллотипам, например, IgG1m(za) и IgG1m(f)), которые кодируются генами константной области тяжелой цепи. Кроме того, каждый изотип тяжелой цепи может быть объединен с легкой цепью либо каппа (κ), либо лямбда (λ).

В контексте настоящего изобретения термин «полноразмерное антитело» относится к антителу (например, родительское или вариантное антитело), содержащему одну пару тяжелой и легкой цепей или две разные пары тяжелой и легкой цепей, причем каждая пара содержит константные и переменные домены тяжелой и легкой цепи, такие как, например, обычно обнаруживаемые в паре тяжелая цепь-легкая цепь антитела дикого типа этого изотипа. В полноразмерном варианте антитела константный и переменный домены тяжелой и легкой цепи могут, в частности, содержать аминокислотные замены, которые модифицируют и/или улучшают функциональные свойства антитела по сравнению с полноразмерным родительским антителом или антителом дикого типа. Полноразмерное антитело согласно настоящему изобретению может быть получено способом, предусматривающим стадии (i) клонирования последовательностей CDR в один или более подходящих векторов, содержащих полные последовательности тяжелой и легкой цепей, и (ii) экспрессии полученных подходящих векторов с последовательностями тяжелой и легкой цепи в подходящих системах экспрессии. Специалисту в данной области техники известно, как получить полноразмерное антитело, начиная либо с последовательностей CDR, либо с полных последовательностей переменной области. Таким образом, специалисту в данной области техники известно, как получить полноразмерное антитело в соответствии с настоящим изобретением.

В контексте настоящего изобретения термин «гуманизированное антитело» относится к генно-инженерному нечеловеческому антителу, которое содержит человеческие константные домены и нечеловеческие переменные домены, модифицированные для высокого уровня гомологии последовательности с человеческим переменным доменом. Это может быть достигнуто путем вставки нечеловеческих определяющих комплементарность областей (CDR), которые вместе образуют сайт связывания антигена, в гомологичную человеческую акцепторную каркасную область (FR) (см. среди прочего, WO92/22653 и EP0629240). Для того, чтобы полностью восстановить

аффинность связывания и специфичность родительского антитела может потребоваться замена каркасных остатков из родительского антитела (т.е. нечеловеческого) на каркасные области человека (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые важны для свойств связывания антитела. Таким образом, гуманизированное антитело может содержать нечеловеческие последовательности CDR, первичные человеческие каркасные области, необязательно содержащие одну или более аминокислотных обратных мутаций в нечеловеческую аминокислотную последовательность, и полностью человеческие константные области. Необязательно, дополнительные аминокислотные модификации, которые не обязательно являются обратными мутациями, могут быть применены для получения гуманизированного антитела с предпочтительными характеристиками, такими как, например, особенно полезная аффинность и биохимические свойства, например, для включения модификаций для того, чтобы избежать дезамидирования, предоставить «инертную область Fc» и/или улучшить производство.

В контексте настоящего изобретения термин «человеческое антитело» включает антитела, имеющие переменные и каркасные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека, и константный домен, полученный из константного домена иммуноглобулина человека. Человеческие антитела согласно настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, вставки или делеции, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). «Человеческое антитело» может включать последовательности VH и VL, которые были созданы из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека у человека у трансгенного животного, как например, описано в примерах в настоящем документе, мыши HIS или т.п. Такие последовательности VH и VL считаются последовательностями VH и VL человека, которые были, например, слиты с константными доменами, полученными из константного домена иммуноглобулина человека.

Следовательно, «человеческие антитела» могут быть сконструированными антителами. «Человеческое антитело» может быть подвергнуто дальнейшей разработке, например, включать модификации для того, чтобы избежать дезамидирования, обеспечить «инертную Fc-область», обеспечить генерацию биспецифического антитела и/или улучшить производство. Человеческое антитело может также продуцироваться в нечеловеческих клетках, например, в клетках CHO и т.п. Однако термин «человеческое антитело» в контексте настоящего изобретения не включает антитела, в которых

последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида, отличного от человека, например, мыши, были вставлены в каркасные последовательности человека.

В контексте настоящего изобретения термин «область Fc» относится к области, включающей в направлении от N-конца к С-концу две тяжелые цепи антитела, по меньшей мере шарнирную область, область CH2 и область CH3. Область Fc антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента.

В контексте настоящего изобретения термин «шарнирная область» относится к шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, шарнирная область человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 216-230 в соответствии с нумерацией Eu согласно Кэботу Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689 (1991). Однако шарнирная область может также быть любым из других подтипов, как описано в настоящем документе.

В контексте настоящего изобретения термин «область CH1» или «домен CH1» относится к области CH1 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область CH1 человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 118-215 в соответствии с нумерацией Eu согласно Кэботу (*там же*). Однако область CH1 также может относиться к любому другому подтипу, как описано в настоящем документе.

В контексте настоящего изобретения термин «область CH2» или «домен CH2» относится к области CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область CH2 человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 231-340 в соответствии с нумерацией Eu согласно Кэботу (*там же*). Однако область CH2 также может относиться к любому другому подтипу, как описано в настоящем документе.

В контексте настоящего изобретения термин «область CH3» или «домен CH3» относится к области CH3 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область CH3 человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 341-447 в соответствии с нумерацией Eu согласно Кэботу (*там же*). Однако область CH3 также может относиться к любому другому подтипу, как описано в настоящем документе.

В контексте настоящего изобретения термин «Fc-опосредованная эффекторная функция» предназначен для обозначения функций, которые являются следствием связывания полипептида или антитела с их мишенью или антигеном на клеточной мембране, где Fc-опосредованная эффекторная функция относится к области Fc полипептида или антитела. Примеры Fc-опосредованной эффекторной функции включают

(i) связывание C1q, (ii) активацию комплемента, (iii) комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), (iv) антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), (v) связывание Fc-гамма-рецептора (FcγR), (vi) антителозависимое FcγR-опосредованное перекрестное связывание антигена, (vii) антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), (viii) комплемент-зависимую клеточную цитотоксичность (CDCC), (ix) комплемент-усиленную цитотоксичность, (x) связывание с рецептором комплемента опсонизированного антитела, опосредованное антителом, (xi) опсонизацию и (xii) комбинацию любого из (i)-(xi).

В контексте настоящего изобретения термин «инертность», «инертный» или «неактивирующий» относится к области Fc, которая по меньшей мере не способна связывать какие-либо FcγR, индуцировать Fc-опосредованное перекрестное связывание FcγR или индуцировать FcγR-опосредованное перекрестное связывание антигенов-мишеней через две области Fc отдельных антител, или не способна связывать C1q. Примером этого являются замены FEA внутри константного домена, как описано в настоящем документе. Инертность области Fc антитела можно протестировать с использованием антитела в моноспецифическом или биспецифическом формате.

В контексте настоящего изобретения термин «полноразмерное» указывает на то, что антитело не является фрагментом, а содержит все домены, соответствующие конкретному изотипу, такие как, например, обычно встречающиеся для этого изотипа в природе, например, домены VH, CH1, CH2, CH3, шарнирный, VL и CL для антитела IgG1.

В контексте настоящего изобретения термин «одновалентное антитело» относится к молекуле антитела, которая может взаимодействовать с антигеном только с одним антигенсвязывающим доменом (например, с одним плечом Fab). В контексте биспецифического антитела «связывание одновалентного антитела» относится к связыванию биспецифического антитела с одним антигеном только с одним антигенсвязывающим доменом (например, с одним плечом Fab).

В контексте настоящего изобретения термин «моноспецифическое антитело» относится к антителу, которое обладает специфичностью связывания только с одним антигеном, только с одним эпитопом. Антитело может быть моноспецифическим одновалентным антителом (т.е. несущим только одну антигенсвязывающую область) или моноспецифическим двухвалентным антителом (например, антитело с двумя идентичными антигенсвязывающими областями).

Термин «биспецифическое антитело» относится к антителу, имеющему два антигенсвязывающих домена, которые связывают разные эпитопы, например, две неидентичные пары областей VH и VL, два неидентичных плеча Fab или два плеча Fab с

неидентичными областями CDR. В контексте настоящего изобретения биспецифические антитела обладают специфичностью по меньшей мере к двум различным эпитопам. Такие эпитопы могут быть на одном и том же или на разных антигенах или мишенях. Если эпитопы находятся на разных антигенах, такие антигены могут быть на одной и той же клетке или на разных клетках, типах клеток или структурах, например, внеклеточном матриксе или везикулах и растворимом белке. Таким образом, биспецифическое антитело может быть способно перекрестно связывать несколько антигенов, например, двух разных клеток.

Термин «двухвалентное антитело» относится к антителу, которое имеет две антигенсвязывающие области, которые связываются с двумя одинаковыми эпитопами на двух одинаковых антигенах или связываются с двумя разными эпитопами на одном антигене или разных антигенах. Следовательно, двухвалентное антитело может быть моноспецифическим антителом или биспецифическим антителом.

Термины «аминокислота» и «аминокислотный остаток» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо, и их не следует понимать как ограничивающие. Аминокислоты представляют собой органические соединения, содержащие функциональные группы амина ($-\text{NH}_2$) и карбоксила ($-\text{COOH}$), а также боковую цепь (группу R), специфичную для каждой аминокислоты. В контексте настоящего изобретения аминокислоты можно классифицировать на основе структуры и химических характеристик. Таким образом, классы аминокислот могут быть отражены в одной или обеих следующих таблицах:

Основная классификация на основе структуры и общей химической характеристики группы R.

Таблица 2

Класс	Аминокислота
Кислотные остатки	D и E
Основные остатки	K, R и H
Гидрофильные незаряженные остатки	S, T, N и Q
Алифатические незаряженные остатки	G, A, V, L и I
Неполярные незаряженные остатки	C, M и P
Ароматические остатки	F, Y и W

Таблица 3. Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Класс	Аминокислота
Остатки, содержащие гидроксильную группу	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Ассоциированные с циклоалкенилом остатки	F, H, W и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Небольшие остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V
Очень маленькие остатки	A, G и S
Остатки, участвующие в образовании спирали	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, P, D, E и R

Замена одной аминокислоты на другую может быть классифицирована как консервативная или неконсервативная замена. В контексте настоящего изобретения «консервативная замена» представляет собой замену одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей сходные структурные и/или химические характеристики, это замена одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток того же класса, как определено в любой из двух приведенных выше таблиц, например, лейцин может быть заменен изолейцином, поскольку они оба являются алифатическими разветвленными гидрофобами. Точно так же, аспарагиновая кислота может быть заменена глутаминовой кислотой, поскольку они обе представляют собой небольшие отрицательно заряженные остатки.

В контексте настоящего изобретения замена в антителе обозначается как:
исходная аминокислота – положение – замещенная аминокислота.

Ссылаясь на хорошо известную номенклатуру аминокислот, для обозначения любого аминокислотного остатка используется трехбуквенный код или однобуквенный код, включая коды «Хаа» или «Х». Таким образом, Хаа или Х обычно могут представлять любую из 20 встречающихся в природе аминокислот. В контексте настоящего изобретения термин «встречающийся в природе» относится к любому из следующих аминокислотных остатков: глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, лизин, аргинин, гистидин, аспарагиновая кислота, аспарагин, глутаминовая кислота, глутамин, пролин,

триптофан, фенилаланин, тирозин, метионин и цистеин.

Соответственно, обозначение «K409R» или «Lys409Arg» означает, что антитело содержит замену лизина на аргинин в положении аминокислоты 409. Замену аминокислоты в данном положении на любую другую аминокислоту обозначают как: исходная аминокислота – положение или, например, «K409». Для модификации, в которой исходная (исходные) аминокислота (аминокислоты) и/или замещенная (замещенные) аминокислота (аминокислоты) могут содержать более одной, но не все аминокислоты, более чем одна аминокислота может быть разделена символами «,» или «/». Например, замена лизина на аргинин, аланин или фенилаланин в положении 409 представляет собой: «Lys409Arg,Ala,Phe» или «Lys409Arg/Ala/Phe», или «K409R,A,F», или «K409R/A/F», или «K409 на R, A или F». Такие обозначения могут использоваться взаимозаменяемо в контексте настоящего изобретения, но имеют одно и то же значение и назначение.

Кроме того, термин «замена» охватывает замену на любую одну или другие девятнадцать природных аминокислот или другие аминокислоты, например, неприродные аминокислоты. Например, замена аминокислоты K в положении 409 включает каждую из следующих замен: 409A, 409C, 409D, 409E, 409F, 409G, 409H, 409I, 409L, 409M, 409N, 409Q, 409R, 409S, 409T, 409V, 409W, 409P и 409Y. Это эквивалентно обозначению 409X, где X обозначает любую аминокислоту, отличную от исходной аминокислоты. Эти замены также могут обозначаться как K409A, K409C и т.д., или K409A,C и т.д., или K409A/C и т.д. То же самое относится по аналогии к каждому положению, упомянутому в настоящем документе, для специфического включения в настоящий документ любой из таких замен.

Антитело согласно настоящему изобретению может также включать делецию аминокислотного остатка. Такая делеция может быть обозначена как «делеция» и включает, например, обозначение как K409del. Таким образом, в случае таких вариантов осуществления лизин в положении 409 удален из аминокислотной последовательности.

В контексте настоящего изобретения термин «клетка-хозяин» предназначен для обозначения клетки, в которую была введена нуклеиновая кислота, например, вектор экспрессии. Должно быть понятно, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной рассматриваемой клетки, но также могут включать потомство такой клетки. Поскольку определенные модификации могут возникать в последующих поколениях из-за мутации или влияния окружающей среды, такое потомство может фактически не быть идентичным родительской клетке, но все же подпадать под действие термина «клетка-хозяин», используемого в настоящем документе. Рекомбинантные клетки-хозяева включают, например, трансфектомы, например, клетки CHO, клетки HEK-293, клетки Expi293F, клетки PER.C6, клетки NS0 и лимфоцитарные клетки, а также

прокариотические клетки, например, *E. coli*, и другие эукариотические клетки-хозяева, например, растительные клетки и грибы.

В контексте настоящего изобретения термин «трансфектома» включает рекомбинантные эукариотические клетки-хозяева, экспрессирующие антитело или антиген-мишень, например, клетки CHO, клетки PER.C6, клетки NS0, клетки HEK-293, клетки Expi293F, растительные клетки или грибы, включая дрожжевые клетки.

Для целей настоящего изобретения идентичность последовательности между двумя аминокислотными последовательностями определяют по длине указанной последовательности с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), как реализовано в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), предпочтительно версия 5.0.0 или более поздняя. Применяли следующие параметры: штраф за открытие гэпа 10, штраф за продление гэпа 0,5 и матрица замен EBLOSUM62 (EMBOSS версия BLOSUM62). Выходные данные Needle, помеченные как «самая длинная идентичность» (полученные с использованием параметра -nobrief), используют в качестве процентной идентичности и вычисляют следующим образом:

$$(\text{идентичные остатки} \times 100) / (\text{длина выравнивания} - \text{общее количество гэпов в выравнивании}).$$

Сохранение подобных остатков можно также или в качестве альтернативы измерять посредством оценки подобию, определяемой с помощью программы BLAST (например, BLAST 2.2.8, доступной посредством NCBI, с использованием стандартных параметров BLOSUM62, открытие гэпа=11 и продление гэпа=1). Подходящие варианты обычно имеют по меньшей мере приблизительно 45%, как например, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или более (например, приблизительно 99%) подобию с родительской или эталонной последовательностью.

В контексте настоящего изобретения термин «интернализированный» или «интернализация» относится к биологическому процессу, при котором молекулы, например, антитело согласно настоящему изобретению, поглощаются клеточной мембраной и втягиваются внутрь клетки. Интернализация также может называться «эндоцитозом».

Биспецифические антитела, нацеленные на CD3×B7H4

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к антителу,

содержащему антигенсвязывающую область, способную связываться с В7Н4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где указанные антигенсвязывающие области содержат вариабельные области тяжелой и легкой цепи, где указанные антигенсвязывающие области представляют собой человеческие вариабельные области и/или гуманизированные вариабельные области. Например, одна антигенсвязывающая область может содержать человеческие вариабельные области тяжелой и легкой цепи, а другая антигенсвязывающая область может содержать гуманизированные вариабельные области тяжелой и легкой цепи. В качестве альтернативы, обе антигенсвязывающие области могут содержать человеческие вариабельные области тяжелой и легкой цепи, или обе антигенсвязывающие области могут содержать гуманизированные вариабельные области тяжелой и легкой цепи. Следовательно, соответственно, настоящее изобретение относится к антителу, содержащему антигенсвязывающую область, способную связываться с В7Н4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где указанные антигенсвязывающие области содержат вариабельные области тяжелой и легкой цепи, где указанные вариабельные области тяжелой и легкой цепи содержат человеческие каркасные области. Антитело согласно настоящему изобретению, как описано в настоящем документе, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с В7Н4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, может также упоминаться в настоящем документе, например, как антитело против В7Н4хCD3.

Такие антитела предпочтительно представляют собой биспецифические антитела. Такие антитела, как описано выше, являются согласно другому варианту осуществления, способными связывать раковые клетки и Т-клетки, например, как описано в примерах. Раковые клетки, которые могут быть выбраны, представляют собой раковые клетки, которые экспрессируют В7Н4 человека, и/или представляют собой раковые клетки, которые относятся к солидным опухолям. Такое антитело предпочтительно способно индуцировать опосредованное Т-клетками уничтожение раковых клеток.

Способность связывания охватывает, как показано в примерах, что в анализе связывания антитело связывается со своей мишенью, как показано, например, с помощью типичных кривых связывания, например, показанных на фиг. 3 и 4 в настоящем документе, или путем определения аффинности связывания, используя, например, биослойную интерферометрию, как показано в примерах 3 и 4. Антигенсвязывающая область, не способная связываться с определенной мишенью, имеет, например, не поддающуюся обнаружению аффинность связывания со своей мишенью, например, имеющую ответ $< 0,05$ нМ при самой высокой концентрации, используемой в типичном анализе биослойной

интерферометрии, как например, показано в примере 3. В любом случае, специалисту в данной области техники хорошо известно, как определить, способна ли антигенсвязывающая область связываться со своей мишенью.

Биспецифические форматы

Настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам против CD3×B7H4, которые эффективно способствуют опосредованному Т-клетками уничтожению опухолевых клеток, экспрессирующих B7H4. В зависимости от желаемых функциональных свойств для конкретного применения, конкретные антигенсвязывающие области могут быть выбраны из набора антител или антигенсвязывающих областей согласно настоящему изобретению. В данной области техники известно множество различных форматов и применений биспецифических антител, и они приведены в Kontermann, Drug Discov Today, 2015 Jul,20(7):838-47 и MAbs, 2012 Mar-Apr,4(2):182-97. Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению может не ограничиваться каким-либо конкретным биспецифическим форматом или способом его получения.

Примеры биспецифических молекул антител, которые могут быть использованы согласно настоящему изобретению, содержат (i) отдельное антитело, которое имеет два плеча, содержащих разные антигенсвязывающие области, (ii) одноцепочечное антитело, которое имеет специфичность к двум разным эпитопам, например, через два scFv, соединенных в тандеме дополнительным пептидным линкером, (iii) антитело с двумя переменными доменами (DVD-Ig), где каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два переменных домена в тандеме посредством короткой пептидной связи (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)), (iv) химически связанный биспецифический фрагмент (Fab')₂, (v) Tandab, который представляет собой слияние двух одноцепочечных диател, в результате чего образуется четырехвалентное биспецифическое антитело, которое имеет два сайта связывания для каждого из антигенов-мишеней, (vi) гибкое тело, представляющее собой комбинацию scFv с диателом, в результате чего образуется поливалентная молекула, (vii) так называемую молекулу «стыковка и замок», основанную на «доме димеризации и стыковки» в протеинкиназе А, которая при применении к фрагментам Fab может приводить к трехвалентному биспецифическому связывающему белку, состоящему из двух идентичных фрагментов Fab, связанных с другим фрагментом Fab, (viii) так называемую молекулу Scorpion, содержащую, например, два scFv, слитых с обоими концами Fab-плеча человека, и (ix) диатело.

Согласно одному варианту осуществления биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению представляет собой диатело, перекрестное антитело или биспецифическое антитело, полученное посредством контролируемого обмена Fab-плеч (как, например, описано в WO2011131746 (Genmab)).

Примеры различных классов биспецифических антител включают без ограничения (i) IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами CH3 для стимуляции гетеродимеризации, (ii) рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием, где каждая из двух сторон молекулы содержит фрагмент Fab или часть фрагмента Fab по меньшей мере двух разных антител, (iii) слитые молекулы IgG, где полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным фрагментом Fab или частями фрагмента Fab, (iv) слитые молекулы Fc, где одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями, (v) слитые молекулы Fab, где различные фрагменты Fab слиты вместе, слиты с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями, и (vi) антитела на основе ScFv и диатела, и тяжелой цепи (например, доменные антитела, нанотела), где различные одноцепочечные молекулы Fv или различные диатела, или различные антитела с тяжелой цепью (например, доменные антитела, нанотела) слиты друг с другом или с другим белком, или молекулой-носителем, слитыми с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями.

Примеры IgG-подобных молекул с комплементарными молекулами домена CH3 включают без ограничения молекулы Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech, Roche, WO2011069104), так называемые молекулы Knobs-into-Holes (Genentech, WO9850431), CrossMAbs (Roche, WO2011117329) и электростатически согласованные молекулы (Amgen, EP1870459 и WO2009089004, Chugai, US201000155133, Oncomed, WO2010129304), молекулы LUZ-Y (Genentech, Wranik et al. J. Biol. Chem. 2012, 287(52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1), молекулы DIG-тела и PIG-тела (Pharmabcine, WO2010134666, WO2014081202), молекулы на основе домена, сконструированного путем обмена между цепями (SEEDbody) (EMD Serono, WO2007110205), молекулы Biclonics (Merus, WO2013157953), молекулы FcΔAdp (Regeneron, WO201015792), биспецифические молекулы IgG1 и IgG2 (Pfizer/Rinat, WO11143545), молекулы с асимметрическим каркасом (Zymeworks/Merck, WO2012058768), молекулы mAb-Fv (Xencor, WO2011028952), двухвалентные биспецифические антитела (WO2009080254) и молекулы DuoBody® (Genmab A/S, WO2011131746).

Примеры рекомбинантных IgG-подобных молекул с двойным нацеливанием включают без исключения молекулы с двойным нацеливанием (DT)-Ig (WO2009058383),

антитело «два в одном» (Genentech, Bostrom, et al 2009. Science 323, 1610–1614.), перекрестно-связанные Mabs (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star, WO2008003116), молекулы Zybody (Zyngenia, LaFleur et al. MAbs. 2013 Mar-Apr,5(2):208-18), подходы с общей легкой цепью (Crucell/Merus, US7,262,028), κλBodies (NovImmune, WO2012023053) и CovX-тело (CovX/Pfizer, Doppalapudi, V.R., et al 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17,501–506.).

Примеры слитых молекул IgG включают без ограничения молекулы Ig с двойным переменным доменом (DVD) (Abbott, US7,612,181), антитела с двойной головкой с двумя доменами (Unilever, Sanofi Aventis, WO20100226923), IgG-подобные биспецифические молекулы (ImClone/Eli Lilly, Lewis et al. Nat Biotechnol. 2014 Feb,32(2):191-8), Ts2Ab (MedImmune/AZ, Dimasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30,393(3):672-92) и молекулы BsAb (Zymogenetics, WO2010111625), молекулы HERCULES (Biogen Idec, US007951918), scFv-слитые молекулы (Novartis), scFv-слитые молекулы (Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246) и молекулы TvAb (Roche, WO2012025525, WO2012025530).

Примеры Fc-слитых молекул включают без ограничения слияния ScFv/Fc (Pearce et al., Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep,42(6):1179-88), молекулы SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, et al. AACR 100 th Annual meeting 2009 (Реферат № 5465), Zymogenetics/BMS, WO2010111625), молекулы технологии перенацеливания двойной аффинности (Fc-DART) (MacroGenics, WO2008157379, WO2010080538) и молекулы Dual(ScFv)2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine – China).

Примеры Fab-слитых биспецифических антител включают без ограничения молекулы F(ab)2 (Medarex/AMGEN, Deo et al J Immunol. 1998 Feb 15,160(4):1677-86.), молекулы двойного действия или бис-Fab (Genentech, Bostrom, et al 2009. Science 323, 1610–1614.), молекулы «стыковка и замок» (DNL) (ImmunoMedics, WO2003074569, WO2005004809), двухвалентные биспецифические молекулы (Biotechnol, Schoonjans, J Immunol. 2000 Dec 15,165(12):7050-7.) и молекулы Fab-Fv (UCB-Celltech, WO 2009040562 A1).

Примеры основанных на ScFv, диател и доменных антител включают без ограничения молекулы привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE) (Micromet, WO2005061547), молекулы диател Tandem (TandAb) (Affimed) Le Gall et al., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr,17(4):357-66.), молекулы технологии перенацеливания двойной аффинности (DART) (MacroGenics, WO2008157379, WO2010080538), молекулы одноцепочечных диатител (Lawrence, FEBS Lett. 1998 Apr 3,425(3):479-84), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), Молекулы слияния человеческого сывороточного альбумина ScFv (Merrimack, WO2010059315) и COMBODY (Epigen Biotech, Zhu et al.

Immunol Cell Biol. 2010 Aug;88(6):667-75.), нанотела двойного нацеливания (Ablynx, Hmila et al., FASEB J. 2010) и доменные антитела только тяжелой цепи двойного нацеливания.

Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению может относиться к любому изотипу. Примеры изотипов включают без ограничения любой из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. Предпочтительно, биспецифические антитела могут быть выбраны из изотипа IgG1 человека, как показано в примерах. Можно использовать любую из константных областей легкой цепи человека каппа или лямбда. Согласно одному варианту осуществления обе тяжелые цепи антитела согласно настоящему изобретению относятся к изотипу IgG1, например, IgG1к. Согласно одному варианту осуществления две тяжелые цепи биспецифического антитела относятся к изотипам IgG1 и IgG4, соответственно. Предпочтительно, биспецифические антитела могут быть выбраны из изотипа IgG1 человека, как показано в примерах. Необязательно и предпочтительно, тяжелая цепь и ее последовательности Fc выбранного изотипа могут быть модифицированы в шарнирной области и/или области СНЗ, как описано в настоящем документе, для обеспечения возможности образования биспецифических антител и придания инертности.

Согласно одному аспекту биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению содержит область Fc, содержащую первую тяжелую цепь с первой последовательностью Fc, содержащей первую область СНЗ, и вторую тяжелую цепь со второй последовательностью Fc, содержащей вторую область СНЗ, где последовательности первой и второй областей СНЗ различны и являются такими, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первой и второй областями СНЗ сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первой и второй областей СНЗ. Более подробные сведения об этих взаимодействиях и о том, как они могут быть достигнуты, представлены в WO 2011131746 и WO 2013060867 (Genmab), которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Как описано далее в настоящем документе, стабильное биспецифическое антитело CD3×B7H4 может быть получено с высоким выходом на основе одного антитела B7H4 и одного антитела CD3, каждое из которых состоит из двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей, причем каждое антитело содержит только несколько довольно консервативных (асимметричных) мутаций в областях СНЗ. Асимметричные мутации означают, что последовательности указанных первой и второй областей СНЗ содержат одну или более аминокислотных замен в неидентичных положениях.

Антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3

Как указано, настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему

изобретению, содержащему антигенсвязывающую область, способную связываться с В7Н4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему изобретению, содержащему антигенсвязывающую область, способную связываться с В7Н4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, способна связываться с CD3ε (эпсилон) человека, таким как CD3ε (эпсилон) человека согласно SEQ ID NO: 13. Такая антигенсвязывающая область способна связываться с CD3ε (эпсилон) человека, как представлено на Т-клетке, такой как первичная человеческая Т-клетка.

Указанное антитело согласно настоящему изобретению может представлять собой антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с В7Н4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3 человека, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO: 16 или согласно SEQ ID NO. 17, и необязательно

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO: 22.

Области CDR1, CDR2 и CDR3 могут быть идентифицированы из вариабельных областей тяжелой и легкой цепи с использованием способов, известных в данной области техники. Области CDR из указанных вариабельных областей тяжелой и легкой цепи могут быть аннотированы в соответствии с IMGT (см. Lefranc MP. et al., *Nucleic Acids Research*, 27, 209-212, 1999] и Brochet X. *Nucl. Acids Res.* 36, W503-508 (2008)). Следовательно, также раскрыты антитела, содержащие антигенсвязывающую область, способную связываться с В7Н4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO.: 18, 19 и 20 или 18, 19 и 21, соответственно, и необязательно

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 23, GTN и 24, соответственно.

Кроме того, раскрыты антитела, содержащие антигенсвязывающую область, способную связываться с В7Н4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 16, или последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16, и необязательно

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 22, или последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 22.

Такие антигенсвязывающие области, способные связываться с CD3 человека, были описаны, среди прочего, в WO2015001085 и WO2017009442. Другие антигенсвязывающие области, которые способны связываться с CD3 человека, раскрыты и описаны в WO2015001085 и WO2017009442, которые включены в настоящее описание посредством ссылки, и могут быть дополнительно рассмотрены и служить основой для получения антител согласно настоящему изобретению.

Указанное антитело согласно настоящему изобретению может связываться с равновесной константой диссоциации K_D между антигенсвязывающей областью, которая связывается с CD3 человека, и CD3 человека в диапазоне 1 – 1000 нМ.

Указанное антитело согласно настоящему изобретению может связываться с равновесной константой диссоциации K_D между антигенсвязывающей областью, которая связывается с CD3 человека, и CD3 человека в диапазоне 1 – 100 нМ, как например, в диапазоне 5 – 100 нМ, в диапазоне 10 – 100 нМ, в диапазоне 1 – 80 нМ, в диапазоне 1 – 60 нМ, в диапазоне 1 – 40 нМ, в диапазоне 1 – 20 нМ, в диапазоне 5 – 80 нМ, в диапазоне 5 – 60 нМ, в диапазоне 5 – 40 нМ, в диапазоне 5 – 20 нМ, в диапазоне 10 – 80 нМ, в диапазоне 10 – 60 нМ, в диапазоне 10 – 40 нМ или, как например, в диапазоне 10 – 20 нМ. Иллюстративная и подходящая антигенсвязывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO: 16 и вариабельную область легкой цепи (VL) согласно SEQ ID NO: 22. Такие вариабельные области были описаны, среди прочего, в WO2015001085.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения указанное антитело имеет более низкую аффинность связывания для CD3ε человека, чем антитело, имеющее антигенсвязывающую область, содержащую последовательность VH согласно SEQ ID NO: 16 и последовательность VL согласно SEQ ID NO: 22, предпочтительно, где указанная аффинность в по меньшей мере 5 раз ниже, как например, в по меньшей мере 10 раз ниже, например, в по меньшей мере 20 раз ниже, по меньшей мере 30 раз ниже, по меньшей мере

40 раз ниже, по меньшей мере 45 раз ниже или, как например, в по меньшей мере 50 раз ниже.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения указанное антитело может связываться с равновесной константой диссоциации K_D между антигенсвязывающей областью, которая связывается с CD3 человека, и связывающимся антигеном CD3 человека в диапазоне 300 – 1000 нМ, в диапазоне 400 – 1000 нМ, в диапазоне 500 – 1000 нМ, в диапазоне 300 – 900 нМ в диапазоне 400 – 900 нМ, в диапазоне 400 – 700 нМ, в диапазоне 500 – 900 нМ, в диапазоне 500 – 800 нМ, в диапазоне 500 – 700 нМ, в диапазоне 600 – 1000 нМ, в диапазоне 600 – 900 нМ, в диапазоне 600 – 800 нМ или, как например, в диапазоне 600 – 700 нМ. Иллюстративная и подходящая антигенсвязывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO. 17 и вариабельную область легкой цепи (VL) последовательности согласно SEQ ID NO: 22. Такие вариабельные области были описаны, среди прочего, в WO2017009442.

Указанную аффинность связывания можно определить посредством биослойной интерферометрии, необязательно согласно Примеру 4, раскрытому в настоящем документе. Следовательно, антитело согласно настоящему изобретению, имеющее аффинность связывания с CD3 человека, как определено в настоящем документе, может иметь аффинность связывания, определенную с помощью биослойной интерферометрии, предусматривающей стадии:

I) иммобилизации антитела в количестве 1 мкг/мл в течение 600 секунд на биосенсоре Capture против Fc IgG человека,

II) определения ассоциации в течение периода времени 1000 секунд и диссоциации в течение периода времени 2000 секунд рекомбинантного растворимого CD3ε человека (CD3E27-GSKa) (зрелый белок SEQ ID NO: 13) с использованием серии 3-кратных разведений в диапазоне от 1,40 нМ до 1000 нМ,

III) ссылки на данные буферного контроля (0 нМ).

Кроме того, указанную аффинность связывания можно определить с использованием антитела, такого как моноспецифическое двухвалентное антитело, такое как антитело, представляющее собой полноразмерный IgG1.

Следовательно, согласно другому варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, в котором

антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), как определено в настоящем документе, содержащую последовательность CDR1, последовательность CDR2 и последовательность CDR3,

которая по сравнению с вариабельной областью тяжелой цепи (VH), содержащей последовательность согласно SEQ ID NO: 16, имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из: T31, N57, H101, G105, S110 и Y114, причем положения пронумерованы согласно последовательности SEQ ID NO: 16, и

вариабельная область легкой цепи (VL) дикого типа содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 23, GTN и SEQ ID NO: 24, соответственно.

В частности, антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, в котором антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит в вариабельной области тяжелой цепи (VH), как определено в настоящем документе, замену, выбранную из группы, состоящей из: T31M, T31P, N57E, H101G, H101N, G105P, S110A, S110G, Y114M, Y114R, Y114V.

Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, в котором антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи, как определено в настоящем документе, имеющую в аминокислотном положении 31 M или P, или в аминокислотном положении 57 E, или в аминокислотном положении 101 G или N, или в аминокислотном положении 105 P, или в аминокислотном положении 110 A или G, или в аминокислотном положении 114 M, R или V, причем указанные положения соответствуют нумерации положений аминокислот в вариабельной области тяжелой цепи (VH), имеющей последовательность согласно SEQ ID NO: 16.

Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, в котором CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3, как определено в настоящем документе, содержат в общем самое большее 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен по сравнению с CDR1, CDR2 и CDR3 последовательностей согласно SEQ ID NO: 16, причем указанные аминокислотные замены содержат предпочтительно аминокислотные замены, как определено выше.

Антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4

В частности, настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему изобретению, содержащему антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где указанный B7H4 человека представляет собой B7H4 человека согласно SEQ ID NO. 1. Предпочтительно, указанное антитело согласно настоящему изобретению содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3ε (эпсилон) человека согласно

SEQ ID NO: 13, и антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4 человека согласно SEQ ID NO. 1.

В частности, антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, способна связываться с внеклеточным доменом B7H4 человека. Предпочтительно, указанный B7H4 экспрессируется на клетке, более предпочтительно человеческой клетке.

Согласно другому варианту осуществления, антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, способна связываться с IgC-подобной константной областью B7H4 человека. Согласно другому варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, способна связываться с B7H3-IgV/B7H4-IgC. B7H3-IgV/B7H4-IgC представляет собой слияние между B7H3 и B7H4 человека, где IgV-подобный домен B7H3 слит с IgC-подобным доменом B7H4, в соответствии с SEQ ID NO. 11. Указанный B7H3-IgV/B7H4-IgC экспрессируется клеткой, как например описано в примере 7 в настоящем документе. Согласно другому варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, в котором указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, не способна связываться с B7H4-IgV/B7H3-IgC. B7H4-IgV/B7H3-IgC представляет собой слияние между B7H3 и B7H4 человека, где IgV-подобный домен B7H4 слит с IgC-подобным доменом B7H3, в соответствии с SEQ ID NO. 10. Указанный B7H4-IgV/B7H3-IgC экспрессируется клеткой, как например описано в примере 7 в настоящем документе.

Подходящие антигенсвязывающие области, способные связываться с B7H4 человека, которые рассматриваются в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, содержат:

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 25, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

б) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 29, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

с) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 36, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 40,

d) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 43, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 47,

e) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 50, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO.54, или

f) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 31, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33

g) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 65, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 69.

Области CDR1, CDR2 и CDR3 могут быть идентифицированы из переменных областей тяжелой и легкой цепи с использованием способов, известных в данной области техники. Области CDR из указанных переменных областей тяжелой и легкой цепи могут быть аннотированы в соответствии с IMGT (см. Lefranc MP. et al., *Nucleic Acids Research*, 27, 209-212, 1999] и Brochet X. *Nucl. Acids Res.* 36, W503-508 (2008)). Следовательно, подходящие антигенсвязывающие области, способные связываться с B7H4 человека, которые рассматриваются в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, содержат:

a) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 27 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35,

b) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 30 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3,

соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35,

с) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 37, 38 и 39, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 41, DTS и SEQ ID NO. 42,

d) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 44, 45 и 46, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 48, YTS и SEQ ID NO. 49,

е) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 51, 52 и 53, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 55, GAS и SEQ ID NO. 56, или

f) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 32 и 28, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35

g) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 66, 67 и 68, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 70, GAS и SEQ ID NO. 71.

Кроме того, подходящие антигенсвязывающие области, способные связываться с B7H4 человека, которые рассматриваются в соответствии с настоящим изобретением, как описано в настоящем документе, содержат:

a) варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 25, и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

b) варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 29, и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

с) варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 36, и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 40,

d) варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 43, и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 47,

е) варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 50, и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 54, или

f) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 31, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33

g) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 65, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 69.

Указанные антигенсвязывающие области, которые связываются с B7H4, необязательно содержат переменные области тяжелой и легкой цепи (VH), имеющие аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% идентичную:

a) переменной области тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 25, и переменной области легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

b) переменной области тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 29, и переменной области легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

c) переменной области тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 36, и переменной области легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 40,

d) переменной области тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 43, и переменной области легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 47,

e) переменной области тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 50, и переменной области легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 54, или

f) переменной области тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 31, и переменной области легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33

g) переменной области тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 65, и переменной области легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 69.

Антитело согласно настоящему изобретению может иметь антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4, имеющую аффинность связывания с B7H4 человека, которая соответствует значению K_D $5E-7$ М или менее, как например, $1E-7$ М или менее, как например, с аффинностью связывания, соответствующей значению K_D , которая находится в диапазоне от $5E-7$ до $2E-10$ М, как например, в диапазоне от $2E-7$ до $1E-10$ М или от $1E-7$ до $5E-9$ М.

Указанную аффинность связывания можно определить посредством биослойной интерферометрии, необязательно согласно Примеру 3, раскрытому в настоящем документе. Следовательно, антитело согласно настоящему изобретению, имеющее аффинность связывания с B7H4 человека, как определено в настоящем документе, может иметь аффинность связывания, определенную с помощью биослойной интерферометрии, предусматривающей стадии:

I) иммобилизации антитела в количестве 1 мкг/мл в течение 600 секунд на биосенсоре Capture против Fc IgG человека,

II) определения ассоциации в течение периода времени 300 секунд и диссоциации в течение периода времени 1000 секунд рекомбинантного белка B7H4 с меткой His (Sino Biological № по кат. 10738-H08H, белка, экспрессируемого из конструкции последовательности ДНК, кодирующей VTCN1 человека (Uniprot № доступа Q7Z7D3) (Phe29-Ala258) с С-концевой полигистидиновой меткой) с использованием 2-кратной серии разведений в интервале от 1,56 нМ до 100 нМ.

III) ссылки на данные буферного контроля (0 нМ).

Кроме того, указанную аффинность связывания можно определить с применением антитела, как например, моноспецифического, двухвалентного антитела, как например, антитела, которое представляет собой полноразмерный IgG1.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему изобретению, содержащему антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4 человека, где указанная антигенсвязывающая область способна к перекрестному блокированию:

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 29 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33, и

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 36 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 40, и

и где указанная антигенсвязывающая область не способна к перекрестному блокированию

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 43 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 47,

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 50 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO.54, и

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 65 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 69.

Согласно другому варианту осуществления указанное антитело согласно настоящему изобретению содержит антигенсвязывающую область, способную связываться

с В7Н4 человека, причем указанная антигенсвязывающая область способна к перекрестному блокированию

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 43 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 47,

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO. 50, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO.54, и

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 65 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 69,

и где указанная антигенсвязывающая область не способна к перекрестному блокированию

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 29 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33, и

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 36 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 40.

В частности, «перекрестное блокирование» или способность антитела согласно настоящему изобретению блокировать связывание другого антитела с В7Н4, определяется как способность первого антитела, связанного с В7Н4, блокировать связывание второго антитела с В7Н4, связанным с первым антителом. Перекрестное блокирование может быть определено с помощью анализа, как например, в Примере 5. Такое перекрестное блокирование также может быть определено, например, посредством методики, включающей стадии:

i) предоставления набора образцов, причем каждый образец содержит антитело, которое связывается с В7Н4,

ii) иммобилизации первого антитела из набора образцов при количестве 20 мкг/мл в течение 600 с на биосенсоре Amine Reactive 2nd Generation (AR2G),

iii) загрузки биосенсора ARG2 с иммобилизованным антителом с В7Н4 человека (100 нМ рекомбинантного белка В7Н4 человека с меткой His (Sino Biological № по каталогу 10738-H08H, белка, экспрессируемого из конструкции последовательности ДНК, кодирующей VTCN1 человека (Uniprot номер доступа Q7Z7D3) (Phe29-Ala258) с С-концевой полигистидиновой меткой)

iv) определения ассоциации второго антитела из набора образцов при количестве 10 мкг/мл в течение 300 с.

Когда второе антитело не способно к ассоциации, полагают, что первое антитело перекрестно блокирует второе антитело. Специалисту в данной области техники известны подходящие технологии определения способности антитела перекрестно блокировать связывание другого антитела с его мишенью, в настоящей заявке раскрыты методики, подходящие для определения блокирования связывания и вытеснения. Согласно другому варианту осуществления перекрестное блокирование, как описано в настоящем документе, определяют, как описано в Примере 5.

Согласно другому варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению имеет антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4 человека в соответствии с признаком перекрестного блокирования, как описано выше, где указанная антигенсвязывающая область, способна связываться с B7H4 человека, связываться с B7H3-IgV/B7H4-IgC (SEQ ID NO: 11) и необязательно не способна связываться с B7H4-IgV/B7H3-IgC (SEQ ID NO: 10).

Комбинации антигенсвязывающих областей, связывающихся с CD3 и B7H4

Кроме того, настоящее изобретение также относится к антителу согласно настоящему изобретению, содержащему антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, содержит:

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO.: 16, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO: 22, и

где антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, содержит:

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 25, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

б) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 29, и вариабельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

с) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 36, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 40,

d) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 43, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 47,

е) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 50, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 54, или

f) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 31, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33

g) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 65, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 69.

Кроме того, настоящее изобретение относится к антителу согласно настоящему изобретению, которое может представлять собой антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, содержит:

варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO.: 17, и варибельную область легкой цепи (VL), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO: 22, и

где антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, содержит:

а) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 25, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

b) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 29, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

c) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 36, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 40,

d) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 43, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 47,

e) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 50, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 54, или

f) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 31, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33

g) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 65, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 69.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к антителу, содержащему антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, содержит:

переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO.: 18, 19 и 20, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 23, GTN и 24, соответственно, и

где антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, содержит:

a) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и

CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 27 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35,

b) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 30 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35,

c) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 37, 38 и 39, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 41, DTS и SEQ ID NO. 42,

d) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 44, 45 и 46, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 48, YTS и SEQ ID NO. 49,

e) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 51, 52 и 53, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 55, GAS и SEQ ID NO. 56, или

f) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 32 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35

g) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 66, 67 и 68, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 70, GAS и SEQ ID NO. 71.

Кроме того, настоящее изобретение относится к антителу, содержащему антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где

антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, содержит:

переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO.: 18, 19 и 21, соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 23, GTN и 24, соответственно, и

где антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, содержит:

а) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 27 и 28, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35,

б) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 30 и 28, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35,

с) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 37, 38 и 39, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 41, DTS и SEQ ID NO. 42,

д) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 44, 45 и 46, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 48, YTS и SEQ ID NO. 49,

е) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 51, 52 и 53, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 55, GAS и SEQ ID NO. 56, или

ф) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 32 и 28, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35

г) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 66, 67 и 68, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 70, GAS и SEQ ID NO. 71.

Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам, содержащим антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит:

варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность

согласно SEQ ID NO: 16, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 22, и

где антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, содержит антигенсвязывающую область, которая связывается с B7H4, содержит антигенсвязывающие переменные области тяжелой и легкой цепи (VH), имеющие:

a) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 25, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

b) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 29, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

c) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 36, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 40,

d) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 43, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 47,

e) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 50, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 54, или

f) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 31, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33

g) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 65, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 69.

Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам, содержащим антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит:

переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 22, и

где антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, содержит антигенсвязывающие переменные области тяжелой и легкой цепи (VH), имеющие:

a) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 25, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

b) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 29, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

c) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 36, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 40,

d) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 43, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 47,

e) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 50, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 54, или

f) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 31, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33

g) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 65, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 69.

Согласно другому варианту осуществления, в таком биспецифическом антителе, указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи каппа, и где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи лямбда. Более предпочтительно, в таком биспецифическом антителе одна константная область тяжелой цепи IgG1 является такой, как определено в SEQ ID NO. 60, а другая является такой, как определено в SEQ ID NO. 61, и где указанная константная область легкой цепи каппа является такой, как определено в SEQ ID NO. 63, и указанная константная область легкой цепи лямбда является такой, как определено в SEQ ID NO. 64. Понятно, что в указанных константных областях тяжелой цепи IgG1, как определено в SEQ ID NO. 60 и 61, необязательно могут быть удалены концевые лизины.

Как хорошо известно специалистам в данной области техники, каждая антигенсвязывающая область антитела в общем содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), и каждая из переменных областей содержит три последовательности CDR, CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и может содержать четыре каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно. Каждая антигенсвязывающая область антитела в общем может содержать переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), и каждая из переменных областей содержит три последовательности CDR CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и может содержать четыре человеческие каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно. Эта структура предпочтительно также

обнаруживается в антителах согласно настоящему изобретению. Кроме того, антитела согласно настоящему изобретению могут содержать две константные области тяжелой цепи (CH) и константные области легкой цепи (CL). Примеры константных областей представлены, в частности, в SEQ ID NO. 57-64.

Согласно конкретным вариантам осуществления антитело согласно настоящему изобретению содержит первую и вторую тяжелую цепь, как например, первую и вторую тяжелую цепь, причем каждая содержит по меньшей мере шарнирную область, область CH2 и CH3. Стабильные гетеродимерные антитела могут быть получены с высоким выходом, например, путем так называемого обмена Fab-плечами, как описано в WO 2008/119353 и WO 2011/131746, на основе двух гомодимерных исходных белков, содержащих лишь несколько асимметричных мутаций в областях CH3. Следовательно, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело содержит первую тяжелую цепь, где по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, была заменена, и вторую тяжелую цепь, где по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, была заменена, где указанные замены указанной первой и указанной второй тяжелых цепей не находятся в одинаковых положениях, и где положения аминокислот пронумерованы согласно нумерации Eu. Например, константные домены, имеющие такую замену, представлены, в частности, в SEQ ID NO. 58 и 62, которые можно сравнить с SEQ ID NO. 57, в которой такой замены нет.

В контексте настоящего изобретения термин «аминокислота, соответствующая положениям» относится к номеру положения аминокислоты в тяжелой цепи IgG1 человека. Соответствующие положения аминокислот в других иммуноглобулинах могут быть обнаружены путем выравнивания с IgG1 человека. Если не указано иное или иное не следует из контекста, аминокислоты последовательностей константной области в настоящем документе пронумерованы в соответствии с индексом нумерации ЕС (описанным в Kabat, E.A. et al., 1991, Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662, 680, 689). Таким образом, аминокислота или сегмент в одной последовательности, который «соответствует» аминокислоте или сегменту в другой последовательности, представляет собой аминокислоту, которая выравнивается с другой аминокислотой или сегментом с помощью стандартной программы выравнивания последовательностей, такой как, например, ALIGN, ClustalW или аналогичной, обычно при параметрах по умолчанию, и

имеет идентичность по меньшей мере 50 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 90 % или по меньшей мере 95 % с тяжелой цепью IgG1 человека. В данной области техники хорошо известно как выровнять последовательность или сегмент в последовательности и тем самым определить соответствующее положение в последовательности для положения аминокислоты согласно настоящему изобретению.

Согласно конкретным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителу, где аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, и аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи, или наоборот.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело согласно настоящему изобретению содержит в дополнение к антигенсвязывающим областям область Fc с последовательностями Fc двух тяжелых цепей. Первая и вторая последовательность Fc каждая может относиться к любому изотипу, включая любой изотип человека, как например, изотип IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM или IgA или смешанный изотип. Предпочтительно область Fc относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека или смешанному изотипу, как например, изотипу IgG1 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой полноразмерное антитело, наиболее предпочтительно относится к изотипу IgG1.

Антитела согласно настоящему изобретению могут содержать модификации в области Fc для того, чтобы сделать антитело инертным или неактивирующим антителом. Следовательно, в антителах, раскрытых в настоящем документе, одна или обе тяжелые цепи могут быть модифицированы таким образом, что антитело индуцирует Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с идентичным антителом, за исключением того, что оно содержит немодифицированные первую и вторую тяжелые цепи. Fc-опосредованную эффекторную функцию можно измерить путем определения Fc-опосредованной экспрессии CD69 на Т-клетках (т.е. экспрессии CD69 в результате перекрестного связывания CD3, опосредованного антителами против CD3 и зависимого от рецептора Fc γ), путем связывания с рецепторами Fc γ , путем связывания с C1q или путем индукции Fc-опосредованного сшивания Fc γ R. В частности, константные последовательности тяжелой цепи могут быть модифицированы таким образом, чтобы Fc-опосредованная экспрессия CD69 была снижена по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 99% или 100% по сравнению с антителом дикого типа

(немодифицированным), где указанную Fc-опосредованную экспрессию CD69 определяют в функциональном анализе на основе PBMC, например, как описано в Примере 3 в WO2015001085. Модификации константных последовательностей тяжелой и легкой цепей могут также приводить к уменьшению связывания C1q с указанным антителом. По сравнению с немодифицированным антителом снижение может быть на по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 97 % или 100 %, а связывание C1q можно определять посредством ELISA. Кроме того, область Fc, которая может быть модифицирована таким образом, чтобы указанное антитело опосредовало сниженную Fc-опосредованную пролиферацию Т-клеток по сравнению с немодифицированным антителом на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 99% или 100%, где указанную пролиферацию Т-клеток измеряют в функциональном анализе на основе PBMC.

Был разработан широкий спектр различных форматов неактивирующих антител, в которых аминокислотные замены и их комбинации были введены в константную область тяжелой цепи антитела изотипа IgG1 для устранения Fc-опосредованной эффекторной функции (например, Chiu et al., *Antibodies* 2019 Dec, 8(4): 55, Liu et al., *Antibodies*, 2020 Nov 17,9(4):64, 29(10):457-66, Shields et al., *J Biol Chem*,. 2001 Mar 2,276(9):6591-604).

Примеры аминокислотных положений, которые могут быть модифицированы, например, в антителе изотипа IgG1, включают положения L234 и L235. Следовательно, антитело согласно настоящему изобретению может содержать первую и вторую тяжелую цепь, и где в обеих первой и второй тяжелых цепях аминокислотные остатки в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации Eu, представляют собой F и E, соответственно. Понятно, что в дополнение к модификациям аминокислотных положений L234 и L235 могут быть модифицированы дополнительные положения.

Кроме того, аминокислотная замена D265A может снижать связывание со всеми рецепторами Fcγ и предотвращать ADCC (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* (276):6591-604). Таким образом, антитело согласно настоящему изобретению может содержать первую и вторую тяжелую цепь, где в обеих первой и второй тяжелых цепях аминокислотный остаток в положении, соответствующем положению D265 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации Eu, представляет собой A. Согласно дополнительным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителам, где в по меньшей мере одной, как например, в обеих указанных первой и второй тяжелых цепях аминокислоты в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека,

представляют собой F, E и A, соответственно. В настоящей заявке антитела, которые имеют комбинацию трех аминокислотных замен L234F, L235E и D265A и, кроме того, мутацию K409R или F405L, раскрытую в настоящем документе выше, могут быть обозначены приставкой «FEAR» или «FEAL», соответственно.

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 дикого типа идентифицируется в настоящем документе как SEQ ID NO: 57. Согласно вариантам осуществления, раскрытыми выше, антитело согласно настоящему изобретению может содержать константную область тяжелой цепи IgG1, несущую замену F405L, и может иметь аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 58, и/или константную область тяжелой цепи IgG1, несущую замену K409R, и может иметь аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 62.

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1, несущая замены L234F, L235E и D265A, идентифицируется в настоящем документе как SEQ ID NO: 59. Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1, несущая замены L234F, L235E, D265A и F405L, идентифицируется в настоящем документе как SEQ ID NO: 60. Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1, несущая замены L234F, L235E, D265A и K409R, идентифицируется в настоящем документе как SEQ ID NO: 61.

Последовательности константной области, перечисленные в SEQ ID NO. 57-62 перечисляют концевой лизин (K), такие последовательности использовали в разделе примеров в настоящем документе. Происхождением этого лизина является встречающаяся в природе последовательность, обнаруживаемая у человека, из которой происходят эти области Fc. Во время продукции рекомбинантных антител клеточной культурой этот концевой лизин может быть отщеплен путем протеолиза эндогенной (эндогенными) карбоксипептидазой (карбоксипептидазами), в результате чего образуется константная область, имеющая ту же последовательность, но без C-концевого лизина. Для целей производства антител ДНК, кодирующая этот концевой лизин, может быть исключена из последовательности, так что антитела будут продуцироваться без лизина. Антитела, полученные из последовательностей нуклеиновых кислот, которые либо кодируют, либо не кодируют концевой лизин, по существу идентичны по последовательности и функциям, поскольку степень процессинга концевого лизина обычно является высокой, например, при использовании антител, полученных в системах продукции на основе CHO (Dick, L.W. et al. *Biotechnol. Bioeng.* 2008,100: 1132–1143). Следовательно, должно быть понятно, что антитела согласно настоящему изобретению могут быть получены без кодирования или присутствия концевого лизина, как например, перечисленного в настоящем документе.

Таким образом, для производственных целей можно получить антитела без концевых лизина.

Кроме того, настоящее изобретение относится к антителу, в котором

а) антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, является человеческой, и

б) антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, является гуманизированной.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к антителу, в котором

а) антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4, является человеческой, и/или

б) антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, является гуманизированной.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело содержит легкую цепь каппа (κ). Последовательность легкой цепи каппа согласно конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения, относящимся к биспецифическим антителам, содержит последовательности CDR1, -2 и -3 легкой цепи антитела В7Н4, как описано выше.

Согласно другим вариантам осуществления настоящее изобретение относится к антителу по любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело содержит легкую цепь лямбда (λ). Согласно конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения, касающимся биспецифических антител, легкая цепь лямбда содержит последовательности CDR1, -2 и -3 легкой цепи антитела против CD3, как раскрыто выше, в частности последовательности CDR1, -2 и -3 антитела против CD3, имеющего пониженную аффинность для CD3, как раскрыто выше. Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа включена в настоящий документ как SEQ ID NO: 63, а аминокислотная последовательность константной области легкой цепи лямбда включена в настоящий документ как SEQ ID NO: 64.

Согласно конкретным вариантам осуществления, антитело содержит легкую цепь лямбда (λ) и легкую цепь каппа (κ), как например, антитело с тяжелой цепью и легкой цепью лямбда, которые содержат связывающую область, способную связываться с CD3, и тяжелой цепью и легкой цепью каппа, которые содержат связывающую область, способную связываться с В7Н4.

Следовательно, согласно другому варианту осуществления, в биспецифическом антителе, как определено в настоящем документе, указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4 человека, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем

указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и причем указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи каппа, и указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и причем указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи лямбда. Более предпочтительно, в указанном биспецифическом антителе, одна константная область тяжелой цепи IgG1 является такой, как определено в SEQ ID NO. 60, а другая является такой, как определено в SEQ ID NO. 61, и указанная константная область легкой цепи каппа является такой, как определено в SEQ ID NO. 63, а указанная константная область легкой цепи лямбда является такой, как определено в SEQ ID NO. 64. Понятно, что в указанных константных областях тяжелой цепи IgG1, как определено в SEQ ID NO. 60 и 61, их концевые лизины могут быть удалены.

Связывание, цитотоксичность и Т-клеточная активация

Антитела, как, например, биспецифические антитела, как описано в настоящем документе, которые могут связываться с CD3 человека и B7H4 человека, могут предпочтительно нацеливать Т-клетки на экспрессирующие B7H4 человека раковые клетки, тем самым индуцируя опосредованное Т-клетками уничтожение указанных раковых клеток. Получая сниженную или инертную Fc-функциональность в таких антителах, как показано в разделе примеров, безопасное, эффективное и достаточное антитело можно вводить пациентам-людям, которое является эффективным против широкого спектра видов рака, различающихся уровнями экспрессии B7H4.

Как указано, предпочтительно, антитело согласно настоящему изобретению не имеет или имеет пониженную Fc-опосредованную эффекторную функцию, и кроме того, антитело:

- а) способно связываться с B7H4-экспрессирующими человеческими опухолевыми клетками, как описано в Примере 9 и 10 в настоящем документе,
- б) способно опосредовать зависимую от концентрации цитотоксичность B7H4-экспрессирующих человеческих опухолевых клеток, при применении, например, очищенных РВМС или Т-клеток в качестве эффекторных клеток, при анализе, как описано в Примере 11 и 12 в настоящем документе,
- с) способно опосредовать зависимую от концентрации цитотоксичность одной или более линий B7H4 человека-экспрессирующих опухолевых клеток, выбранных из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-

H1650, при применении, например, очищенных PBMC или Т-клеток в качестве эффекторных клеток при анализе, как описано в Примере 11 и 12 в настоящем документе,

d) способно активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии В7Н4-экспрессирующих человеческих опухолевых клеток, например, при анализе, как описано в Примере 13 в настоящем документе,

e) способно активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии одной или более линий В7Н4 человека-экспрессирующих опухолевых клеток, выбранных из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650, например, при анализе, как описано в Примере 13 в настоящем документе,

f) способно индуцировать цитотоксичность В7Н4-экспрессирующих человеческих опухолевых клеток, например, при анализе, как описано в Примере 11 и 12 в настоящем документе, и/или

g) способно индуцировать опосредованную Т-клетками цитотоксичность в одной или более линиях В7Н4 человека-экспрессирующих опухолевых клеток, выбранных из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650, например, при анализе, как описано в Примере 11 и 12 в настоящем документе.

Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению может не иметь или имеет уменьшенную Fc-опосредованную эффекторную функцию и, кроме того, способно индуцировать опосредованную Т-клетками цитотоксичности, где цитотоксичность оценивают в анализе IC₅₀ *in vitro*, предусматривающем:

i) предоставление выделенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) или очищенных Т-клеток из лейкоцитарной пленки здорового человека-донора,

ii) предоставление В7Н4-экспрессирующих опухолевых клеток, как например, линии В7Н4 человека-экспрессирующих опухолевых клеток, выбранной из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650,

iii) объединение указанных PBMC или указанных очищенных Т-клеток с множеством образцов указанных В7Н4-экспрессирующих опухолевых клеток, где соотношение числа Т-клеток из указанных PBMC или указанных очищенных Т-клеток и выбранной опухолевой клетки составляет 8:1,

iv) предоставление указанного антитела в серии разведений в указанные образцы, в интервале, например, от 0,0128 нг/мл до 10000 нг/мл для выбранной В7Н4 человека-экспрессирующей опухолевой клетки и

v) инкубацию образцов, полученных на стадии iv), например, в течение 72 часов при 37°C, а затем

vi) оценку жизнеспособности В7Н4-экспрессирующих опухолевых клеток,

- vii) определение процента жизнеспособных клеток для каждого образца разведения и
- viii) определение IC50.

Вместо выделенных моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) на стадии i) также могут быть предоставлены очищенные Т-клетки.

Соответственно, антитело может иметь IC50 в диапазоне 0,001-2 микрограмм/мл, где IC50 определяют посредством *in vitro* анализа цитотоксичности, предусматривающего стадии:

- i) предоставления выделенных моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) из лейкоцитарной пленки здорового человека-донора,
- ii) предоставления В7Н4-экспрессирующих опухолевых клеток, как например, линии В7Н4 человека-экспрессирующих опухолевых клеток, выбранной из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3 и HCC1954,
- iii) объединения указанных PBMC с множеством образцов указанных В7Н4-экспрессирующих опухолевых клеток, где соотношение числа Т-клеток из указанных PBMC и выбранной опухолевой клетки составляет 8:1,
- iv) предоставления указанного антитела в серии разведений в указанные образцы, в интервале, например, от 0,0128 нг/мл до 10000 нг/мл для выбранной В7Н4 человека-экспрессирующей опухолевой клетки и
- v) инкубации образцов, полученных на стадии iv), например, в течение 72 часов при 37°C, а затем
- vi) оценки жизнеспособности В7Н4-экспрессирующих опухолевых клеток,
- vii) определения процента жизнеспособных клеток для каждого образца разведения и
- viii) определения IC50.

Соответственно, антитело может иметь IC50 в диапазоне 0,001-5 микрограмм/мл, где IC50 определяют посредством *in vitro* анализа цитотоксичности, предусматривающего стадии:

- i) предоставления выделенных моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) или очищенных Т-клеток из лейкоцитарной пленки здорового человека-донора,
- ii) предоставления В7Н4-экспрессирующих опухолевых клеток, как например, линии В7Н4 человека-экспрессирующих опухолевых клеток, выбранной из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650,
- iii) объединения указанных PBMC или указанных очищенных Т-клеток с множеством образцов указанных В7Н4-экспрессирующих опухолевых клеток, где соотношение числа Т-клеток из указанных PBMC или указанных очищенных Т-клеток и

выбранной опухолевой клетки составляет 8:1,

iv) предоставления указанного антитела в серии разведений в указанные образцы, в интервале, например, от 0,0128 нг/мл до 10000 нг/мл для выбранной В7Н4 человека-экспрессирующей опухолевой клетки и

v) инкубации образцов, полученных на стадии iv), например, в течение 72 часов при 37°C, а затем

vi) оценки жизнеспособности В7Н4-экспрессирующих опухолевых клеток,

vii) определения процента жизнеспособных клеток для каждого образца разведения и

viii) определения IC50.

Согласно одному варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению может иметь IC50 в диапазоне 0,001-5 микрограмм/мл. Согласно одному варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению может иметь IC50 в диапазоне 0,001-2 микрограмм/мл. Согласно другому варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению может иметь IC50 находится в диапазоне 0,001-0,03 микрограмм/мл. Согласно другому варианту осуществления IC50 может быть в диапазоне 0,05 – 2 микрограмм/мл. Согласно другому варианту осуществления IC50 может быть в диапазоне 0,05 – 5 микрограмм/мл. Указанную IC50 можно определить с применением способа, как например, описано в Примере 12.

Согласно другому варианту осуществления способность антитела согласно настоящему изобретению опосредовать Т-клеточную активацию определяют в анализе *in vitro*, предусматривающем следующие стадии:

i) предоставления выделенных моноклеарных клеток периферической крови (РВМС) из лейкоцитарной пленки здорового человека-донора,

ii) предоставления В7Н4-экспрессирующих опухолевых клеток,

iii) объединения РВМС и В7Н4-экспрессирующих опухолевых клеток во множестве образцов, где соотношение числа РВМС и опухолевых клеток составляет 8:1,

iv) предоставления указанного антитела в серии разведений в указанные образцы, в интервале, например, от 0,0128 нг/мл до 10000 нг/мл, и

v) инкубации образцов, например, в течение 72 часов при 37°C, и

vi) последующего обнаружения цитокинов.

Иллюстративные цитокины, которые, например, могут быть обнаружены, представляют собой, например, IFN-γ, как например, описано в Примере 13. Предпочтительно В7Н4-экспрессирующие опухолевые клетки представляют собой В7Н4 экспрессирующие опухолевые клетки, как например, первичные опухоли или линии

опухолевых клеток, выбранные из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCA9-3 и HCC1954.

Антитела против B7H4

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителу, содержащему антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4 человека, где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, содержит:

а) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 25, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

б) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 29, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

с) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 31, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

д) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 27 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35,

е) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 30 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35,

ф) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 32 и 28, и переменную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35,

г) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 25, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33, или

h) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 29, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

i) переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 31, и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

j) имеет переменные области тяжелой (VH) и легкой (VH) цепи, имеющие аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% идентичную соответствующей переменной области тяжелой цепи (VH) согласно SEQ ID NO. 25 и переменной области легкой цепи согласно SEQ ID NO. 33.

Такие антитела необязательно содержат антигенсвязывающую область, которая связывается с CD3. Такие антитела могут быть полезны, например, в наборах и анализах для обнаружения B7H4. Такие антитела также могут быть полезны при лечении рака. Следовательно, такое антитело может представлять собой моноспецифическое антитело, связывающееся с B7H4. Таким антителом может быть двухвалентное антитело.

Предпочтительно, такое антитело представляет собой антитело, содержащее константную область тяжелой цепи, которая представляет собой константную область IgG1 человека. Например, константная область тяжелой цепи, как например, перечислено в SEQ ID NO. 57-62. Предпочтительной константной областью легкой цепи является легкая цепь каппа, как например, перечислено в SEQ ID NO. 63.

Согласно одному варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению может связываться с областью связывания эпитопа или антитела на B7H4 человека, содержащей один или более аминокислотных остатков S151, V157, D158, Y159, E164, L166, W173, P175, P177, V179, W181, F199, M208, V210, T222, Y223, V240, E242 и I245, причем нумерация каждого аминокислотного остатка относится к его положению в SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению может связываться с областью связывания эпитопа или антитела на B7H4 человека, содержащей один или более аминокислотных остатков V157, D158, Y159, E164, L166, причем нумерация каждого аминокислотного остатка относится к его положению в SEQ ID NO: 1.

Согласно другому варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению может связываться с областью связывания эпитопа или антитела на B7H4 человека, содержащей аминокислотные остатки S151, V157, D158, Y159, E164, L166, W173, P175, P177, V179, W181, F199, M208, V210, T222, Y223, V240, E242 и I245, причем нумерация каждого аминокислотного остатка относится к его положению в SEQ ID NO: 1. Согласно другому варианту осуществления антитело согласно настоящему изобретению

может связываться с областью связывания эпитопа или антитела на B7H4 человека, содержащей аминокислотные остатки V157, D158, Y159, E164, L166, причем нумерация каждого аминокислотного остатка относится к его положению в SEQ ID NO: 1.

На основании результатов, представленных в примере 7 в настоящем документе, предполагается, без какого-либо ограничения теорией, что любой один или более из этих аминокислотных остатков (т.е. S151, V157, D158, Y159, E164, L166, W173, P175, P177, V179, W181, F199, M208, V210, T222, Y223, V240, E242 и I245) непосредственно участвуют в связывании антитела, как например, посредством нековалентных взаимодействий, например, с аминокислотными остатками в последовательностях CDR антитела.

Аминокислотные остатки, составляющие указанную область связывания эпитопа или антитела и необязательно один или более дополнительных аминокислотных остатков, которые косвенно участвуют в связывании, могут быть идентифицированы посредством анализа аланинового сканирования B7H4 человека, имеющего аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или последовательность внеклеточного домена согласно SEQ ID NO: 1. Анализ аланинового сканирования можно, в частности, проводить, как изложено в или по существу в соответствии с примером 7 в настоящем документе.

Кроме того, анализ аланинового сканирования можно проводить с помощью методики, предусматривающей стадии:

i) экспрессии мутантных полипептидов B7H4 человека, в которых аминокислотные остатки во внеклеточном домене B7H4 человека, за исключением цистеинов и аланинов, индивидуально заменены аланином, и соответствующих полипептидов B7H4 дикого типа индивидуально в эмбриональных клетках почки человека, например, клетках НЕК 293, таким образом, что для каждого мутанта или дикого типа B7H4 предоставляют образец, содержащий 40-60000 клеток, как например, 50000 клеток,

ii) инкубации клеток в каждом образце с 20 мкл указанного антитела, где указанное антитело состоит из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи, причем антитело помечено, например, подходящей меткой для анализа методом проточной цитометрии, например, меткой mNeogreen, и инкубацию проводят в течение часа при комнатной температуре, а затем промывают FACS-буфером (например, фосфатно-солевым буфером [PBS, Lonza, № по каталогу 10735086001] + 0,02% [мас./об.] азида натрия [NaN₃, EMELCA Bioscience, номер по каталогу 41920044-3]), и ресуспендирования клеток в каждом образце в 30 мкл буфера FACS,

iii) определения для каждого образца среднего количества антител, связанных на клетку, как среднее геометрическое интенсивности флуоресценции (gMFI) для жизнеспособной популяции отдельных клеток в указанном образце и нормализации данных

для каждого тестируемого антитела относительно интенсивности связывания В7Н4-специфического эталонного антитела без перекрестного блокирования с использованием уравнения:

$$\text{Нормализованная } gMFI_{aa \text{ положение}} = \text{Log}_{10} \left(\frac{gMFI_{\text{тестируемое Ab}}}{gMFI_{\text{эталонное Ab}}} \right)$$

где «aa-положение» относится к положению, которое было мутировано в аланин,

где кратное изменение или Z-показатель рассчитывают для выражения потери или усиления связывания антитела в соответствии с вычислением:

$$\text{Кратное изменение} = \text{Log}_{10} \left(\frac{\text{Нормализованная } gMFI_{ala \text{ мутант}}}{\text{Нормализованная } gMFI_{wt}} \right)$$

где положения аминокислот, для которых при замене аминокислоты на аланин не происходит потери или усиления связывания конкретным антителом, будут давать результат «0», усиление связывания дает «>0», а потеря связывания дает «<0», и где только аминокислотные остатки В7Н4, когда кратное изменение связывания было ниже, чем среднее кратное изменение - $1,5 \times SD$, где SD - стандартное отклонение вычисленных кратностей изменений для четырех независимых экспериментов для конкретного тестируемого антитела, рассматривали «мутантами с потерей связывания», и, где, в случае, если $gMFI$ эталонного антитела для конкретного мутанта В7Н4 была ниже среднего значения $gMFI$ - $2,5 \times SD$ среднего значения $gMFI_{\text{эталонное Ab}}$, данные исключали из анализа.

Кроме того, такое антитело также может представлять собой биспецифическое антитело, содержащее в дополнение к антигенсвязывающей области, способной связываться с В7Н4, другую антигенсвязывающую область. Такая другая антигенсвязывающая область может представлять собой антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека. Такая антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, может представлять собой антигенсвязывающие области, способные связываться с CD3, как описано и раскрыто в настоящем документе.

Согласно другому варианту осуществления, в таком биспецифическом антителе указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4 человека, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и причем указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи каппа, и где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и указанная легкая цепь

содержит указанную область VL и константную область легкой цепи лямбда. Более предпочтительно, в таком биспецифическом антителе одна константная область тяжелой цепи IgG1 является такой, как определено в SEQ ID NO. 60, а другая является такой, как определено в SEQ ID NO. 61, и где указанная константная область легкой цепи каппа является такой, как определено в SEQ ID NO. 63, а указанная константная область легкой цепи лямбда является такой, как определено в SEQ ID NO. 64. Понятно, что необязательно в указанных константных областях тяжелой цепи IgG1, как определено в SEQ ID NO. 60 и 61, концевые лизины могут быть удалены.

Наиболее предпочтительное биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению описано и используется в разделе примеров и обозначается как BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR.

Следовательно, согласно предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, способному связываться с CD3 человека и B7H4 человека, содержащему:

- первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, которые содержат связывающую область, способную связываться с CD3 человека, где указанная первая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, как определено SEQ ID NO: 17, и константную область тяжелой цепи IgG1 человека, как определено в настоящем документе, и где указанная первая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, как определено SEQ ID NO: 22, и константную область легкой цепи лямбда человека, и
- вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, которые содержат связывающую область, способную связываться с B7H4 человека, где указанная вторая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, как определено SEQ ID NO: 29, и константную область тяжелой цепи IgG1 человека, как определено в настоящем документе, и где указанная вторая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, как определено SEQ ID NO: 33, и константную область легкой цепи каппа человека.

Понятно, что константная область тяжелой цепи IgG1 человека, определенная в настоящем документе, может включать замены, как определено в настоящем документе (например, FEAR/FEAL) и т.п. Также понятно, что концевой лизин (K) может быть удален из константной области тяжелой цепи IgG1 человека.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, способному связываться с CD3 человека и B7H4 человека, содержащему:

- первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, которые содержат связывающую

область, способную связываться с CD3 человека, где указанная первая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, как определено SEQ ID NO: 17, и константную область тяжелой цепи, как определено SEQ ID NO: 60, и где указанная первая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, как определено SEQ ID NO: 22, и константную область легкой цепи, как определено SEQ ID NO: 64, и

- вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, которые содержат связывающую область, способную связываться с B7H4 человека, где указанная вторая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, как определено SEQ ID NO: 29, и константную область тяжелой цепи, как определено SEQ ID NO: 61, и где указанная вторая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, как определено SEQ ID NO: 33, и константную область легкой цепи, как определено SEQ ID NO: 63.

Подобным образом, понятно, что концевой лизин (K) может быть удален из константной области тяжелой цепи IgG1 человека.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, способному связываться с CD3 человека и B7H4 человека, содержащему:

- первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, которые содержат связывающую область, способную связываться с CD3 человека, где указанная первая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи, как определено SEQ ID NO: 17, и константной области тяжелой цепи, как определено SEQ ID NO: 60, и где указанная первая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи, как определено SEQ ID NO: 22, и константной области легкой цепи, как определено SEQ ID NO: 64, и

- вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, которые содержат связывающую область, способную связываться с B7H4 человека, где указанная вторая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи, как определен SEQ ID NO: 29, и константной области тяжелой цепи, как определено SEQ ID NO: 61, и где указанная вторая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи, как определено SEQ ID NO: 33, и константной области легкой цепи, как определено SEQ ID NO: 63.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, способному связываться с CD3 человека и B7H4 человека, содержащему:

- первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, которые содержат связывающую область, способную связываться с CD3 человека, где указанная первая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи, как определено SEQ ID NO: 17, и

константной области тяжелой цепи, как определено SEQ ID NO: 60, с удаленным концевым лизином (K), и где указанная первая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи, как определено SEQ ID NO: 22, и константной области легкой цепи, как определено SEQ ID NO: 64, и

- вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, которые содержат связывающую область, способную связываться с B7H4 человека, где указанная вторая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи, как определен SEQ ID NO: 29, и константной области тяжелой цепи, как определено SEQ ID NO: 61, с удаленным концевым лизином (K), и где указанная вторая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи, как определено SEQ ID NO: 33, и константной области легкой цепи, как определено SEQ ID NO: 63.

Способы получения биспецифических антител

Традиционные способы, такие как, например, способы гибридной гибридомы и химической конъюгации (Marvin and Zhu (2005) Acta Pharmacol Sin 26:649) можно использовать для получения биспецифических антител согласно настоящему изобретению. Совместная экспрессия в клетке-хозяине двух антител, состоящих из разных тяжелых и легких цепей, приводит к смеси возможных продуктов антител в дополнение к желаемому биспецифическому антителу, которое затем можно выделить, например, с помощью аффинной хроматографии или аналогичных способов.

Также могут быть использованы стратегии, способствующие образованию функционального биспецифического продукта при совместной экспрессии различных конструкций антител, например, способ, описанный Lindhofer et al. (1995 J Immunol 155:219). Слияние крысиных и мышиных гидридом, продуцирующих разные антитела, приводит к ограниченному количеству гетеродимерных белков из-за преимущественно ограниченного по видам спаривания тяжелых/легких цепей. Другой стратегией стимулирования образования гетеродимеров по сравнению с гомодимерами является стратегия «выступ-во-впадину», при которой выступ вводят в первый полипептид тяжелой цепи, и соответствующую полость во второй полипептид тяжелой цепи, так что выступ может быть расположен в полости на границе этих двух тяжелых цепей, чтобы способствовать образованию гетеродимера и препятствовать образованию гомодимера. «Выступы» создают путем замены небольших боковых цепей аминокислот на границе первого полипептида более крупными боковыми цепями. Компенсаторные «полости» идентичного или подобного размера с выступами создают на границе второго полипептида путем замены больших боковых цепей аминокислот на более маленькие (патент США

5731168). В EP1870459 (Chugai) и WO2009089004 (Amgen) описаны другие стратегии, способствующие образованию гетеродимера при совместной экспрессии различных доменов антител в клетке-хозяине. В этих способах один или более остатков, составляющих границу раздела СН3-СН3 в обоих доменах СН3, заменяют заряженной аминокислотой, так что образование гомодимера электростатически невыгодно, а гетеродимеризация электростатически благоприятна. В WO 2007110205 (Merck) описана еще одна стратегия, в которой различия между СН3-доменами IgA и IgG используют для стимулирования гетеродимеризации.

Другой способ получения биспецифических антител *in vitro* описан в WO2008119353 (Genmab), где биспецифическое антитело образуется путем обмена «Fab-плеча» или «полумолекулы» (замена тяжелой цепи и присоединенная легкая цепь) между двумя моноспецифическими IgG4- или IgG4-подобными антителами при инкубации в восстанавливающих условиях. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два плеча Fab, которые могут содержать разные последовательности.

Предпочтительный способ получения биспецифических антител против CD3×B7H4 согласно настоящему изобретению включает способы, описанные в WO2011131746 и WO13060867 (Genmab), предусматривающие следующие стадии:

а) предоставления первого антитела, содержащего область Fc, причем указанная область Fc содержит первую область СН3,

б) предоставления второго антитела, содержащего вторую область Fc, причем указанная область Fc содержит вторую область СН3, где первое антитело представляет собой антитело против CD3, а второе антитело представляет собой антитело против B7H4, или наоборот,

где последовательности указанных первой и второй областей СН3 различны и являются такими, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первой и второй областями СН3 сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первой и второй областей СН3,

с) инкубации указанного первого антитела вместе с указанным вторым антителом в восстанавливающих условиях и

д) получения указанного биспецифического антитела против CD3×B7H4.

Согласно одному варианту осуществления указанное первое антитело вместе с указанным вторым антителом инкубируют в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы позволить цистеинам в шарнирной области подвергнуться изомеризации дисульфидной связи, где гетеродимерное взаимодействие между указанными первым и вторым антителами в полученном гетеродимерном антителе является таким, что обмен Fab-

плечами не происходит при 0,5 mM GSH через 24 часа при 37°C.

Без ограничения теорией, на стадии с) дисульфидные связи тяжелой цепи в шарнирных областях родительских антител восстанавливаются, и полученные цистеины затем способны образовывать дисульфидную связь тяжелой цепи с остатками цистеина другой молекулы родительского антитела (изначально с другой специфичностью). Согласно другому варианту осуществления этого способа восстанавливающие условия на стадии с) включают добавление восстанавливающего агента, например, восстанавливающего агента, выбранного из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина (2-MEA), дитиотреитола (DTT), дитиозеритрита (DTE), глутатиона, трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCPE), L-цистеина и бета-меркаптоэтанола, предпочтительно восстанавливающего агента, выбранного из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Согласно данному варианту осуществления стадия с) предусматривает модификацию условий, чтобы они стали не восстанавливающими или менее восстанавливающими, например, путем удаления восстанавливающего агента, например, путем обессоливания.

Для этого способа можно использовать любые антитела против CD3 и B7H4, описанные в настоящем документе. Согласно конкретному варианту осуществления антитела против CD3 и B7H4, соответственно, могут быть выбраны таким образом, чтобы получить биспецифическое антитело против CD3×B7H4, как описано в настоящем документе.

Согласно одному варианту осуществления этого способа указанные первое и/или второе антитела представляют собой полноразмерные антитела.

Области Fc первого и второго антител могут относиться к любому изотипу, включая без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Согласно одному варианту осуществления этого способа области Fc как указанного первого, так и указанного второго антитела относятся к изотипу IgG1. Согласно другому варианту осуществления одна из областей Fc указанных антител относится к изотипу IgG1, а другая относится к изотипу IgG4. Согласно последнему варианту осуществления полученное биспецифическое антитело содержит область Fc IgG1 и область Fc IgG4 и, таким образом, может иметь представляющие интерес промежуточные свойства в отношении активации эффекторных функций.

Согласно другому варианту осуществления один из исходных белков антитела был сконструирован таким образом, чтобы не связывать белок А, что позволяет отделить гетеродимерный белок от указанного гомодимерного исходного белка путем пропускания продукта через колонку с белком А.

Как описано выше, последовательности первой и второй областей СН3

гомодимерных исходных антител различны и являются такими, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первой и второй областями СНЗ сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первой и второй областей СНЗ. Более подробные сведения об этих взаимодействиях и о том, как они могут быть достигнуты, представлены в WO 2011131746 и WO 2013060867 (Genmab), которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В частности, стабильное биспецифическое антитело против CD3×B7H4 может быть получено с высоким выходом с использованием описанного выше способа согласно настоящему изобретению на основе двух гомодимерных исходных антител, которые связываются с CD3 и B7H4, соответственно, и содержат лишь несколько, достаточно консервативных, асимметричных мутаций в областях СНЗ. Асимметричные мутации означают, что последовательности указанных первой и второй областей СНЗ содержат аминокислотные замены в неидентичных положениях.

Биспецифические антитела согласно настоящему изобретению также могут быть получены путем совместной экспрессии конструкций, кодирующих первый и второй полипептиды, в одной клетке.

Таким образом, согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу получения биспецифического антитела, причем указанный способ предусматривает следующие стадии:

а) предоставления первой конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей первый полипептид, содержащий первую область Fc и первую антигенсвязывающую область тяжелой цепи первого антитела, причем указанная первая область Fc содержит первую область СНЗ,

б) предоставления второй конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей второй полипептид, содержащий вторую область Fc и вторую антигенсвязывающую область тяжелой цепи второго антитела, причем указанная вторая область Fc содержит вторую область СНЗ,

где последовательности указанных первой и второй областей СНЗ различны и являются такими, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первой и второй областями СНЗ сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первой и второй областей СНЗ, и где указанный первый гомодимерный белок имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409, и указанный второй гомодимерный белок имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из: 366, 368, 370, 399, 405 и 407,

где необязательно указанные первая и вторая конструкции нуклеиновой кислоты

кодируют последовательности легкой цепи указанных первого и второго антител,

с) совместной экспрессии указанных первой и второй конструкций нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине и

d) получения указанного гетеродимерного белка из клеточной культуры.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к рекомбинантной эукариотической или прокариотической клетке-хозяину, которая продуцирует биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению.

Подходящие векторы экспрессии, включая промоторы, энхансеры и т.д., и подходящие клетки-хозяева для продукции антител хорошо известны в данной области техники. Примеры клеток-хозяев включают клетки дрожжей, бактерий и млекопитающих, например, клетки CHO или HEK.

Согласно варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу получения антитела, способного связываться как с B7H4, так и с CD3, согласно настоящему изобретению, предусматривающему стадии:

a) предоставления антитела, способного связываться с B7H4, причем указанное антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4, как определено в настоящем документе,

b) предоставления антитела, способного связываться с CD3, причем указанное антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в настоящем документе,

c) инкубации указанного антитела, способного связываться с B7H4, вместе с указанным антителом, способным связываться с CD3, при восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы цистеины в шарнирной области подвергались изомеризации дисульфидной связи, и

d) получения указанного антитела, способного связываться с B7H4 и CD3.

Согласно таким способам стадии предоставления антитела, способного связываться с B7H4 и/или CD3, могут предусматривать стадии

- предоставления клеток, содержащих вектора экспрессии, для продукции указанного антитела или указанных антител и

- обеспечения продукции указанного антитела или указанных антител клетками, а затем

- получения указанного антитела или указанных антител с предоставлением таким образом указанного антитела или указанных антител.

Кроме того, настоящее изобретение относится к

a) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность

тяжелой цепи антигенсвязывающей области, способной связываться с В7Н4, как определено в настоящем документе, и/или

b) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей соответствующую последовательность легкой цепи антигенсвязывающей области, способной связываться с В7Н4.

Кроме того, настоящее изобретение относится к одной или более нуклеиновым кислотам, содержащим:

a) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность тяжелой цепи антигенсвязывающей области, способной связываться с В7Н4, как определено в настоящем документе,

b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей соответствующую последовательность легкой цепи антигенсвязывающей области, способной связываться с В7Н4,

c) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность тяжелой цепи антигенсвязывающей области, способной связываться с CD3, как определено в настоящем документе, и

d) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей соответствующую последовательность легкой цепи антигенсвязывающей области, способной связываться с CD3.

Нуклеиновая кислота или одна или более нуклеиновых кислот, как определено в настоящем документе, могут представлять собой РНК или ДНК. Нуклеиновую кислоту или одну или более нуклеиновых кислот, как определено в настоящем документе, можно применять для экспрессии в клетках млекопитающих. Следовательно, кроме того, настоящее изобретение относится к клетке или клеткам, содержащим нуклеиновую кислоту или содержащим одну или более нуклеиновых кислот, как определено в настоящем документе.

Нуклеиновая кислота в контексте настоящего изобретения может представлять собой вектор экспрессии, который может быть любым подходящим вектором, включая хромосомные, нехромосомные и синтетические векторы нуклеиновой кислоты (последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая подходящий набор элементов контроля экспрессии). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирус, дрожжевые плазмиды, векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, и вирусные векторы нуклеиновых кислот (РНК или ДНК). Согласно одному варианту осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против В7Н4 или CD3, содержится в векторе «голой» ДНК или РНК,

включающем, например, элемент линейной экспрессии (как описано, например, Sykes and Johnston, *Nat Biotech* 17, 355 59 (1997)), компактный вектор нуклеиновой кислоты (как описано, например, в US 6077835 и/или WO 00/70087), плазмидный вектор, как например, pBR322, pUC 19/18 или pUC 118/119, вектор нуклеиновой кислоты минимального размера «midge» (как описано, например, в Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793 800 (2001)), или в виде конструкции осажденного вектора нуклеиновой кислоты, как, например, CaP04-осажденная конструкция (как описано, например, WO200046147, Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551 55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978), и Coraro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603 (1981)). Такие векторы нуклеиновых кислот и их применение хорошо известны в данной области техники (см., например, US 5589466 и US 5973972).

Согласно одному варианту осуществления вектор подходит для экспрессии антитела против B7H4 и/или антитела против CD3 в бактериальной клетке. Примеры таких векторов включают векторы экспрессии, такие как, например, BlueScript (Stratagene), векторы pIN (Van Heeke & Schuster, *J Biol Chem* 264, 5503 5509 (1989), векторы pET (Novagen, Madison WI) и тому подобное).

Вектор экспрессии может также или альтернативно представлять собой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Можно использовать любой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Подходящие векторы включают, например, векторы, содержащие конститутивные или индуцируемые промоторы, такие как, например, альфа-фактор, алкогольоксидаза и PGH (обзор в: F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), и Grant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516 544 (1987)).

Нуклеиновая кислота и/или вектор экспрессии также могут содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность секреции/локализации, которая может нацеливать полипептид, например, растущую полипептидную цепь, в периплазматическое пространство или в среду клеточной культуры. Такие последовательности известны в данной области техники и включают лидерные или сигнальные пептиды секреции. Вектор нуклеиновой кислоты и/или экспрессии может содержать любые подходящие элементы, облегчающие экспрессию, т.е. транскрипцию и/или трансляцию нуклеиновой кислоты, таким образом, что экспрессируются компоненты (биспецифических) антител. Нуклеиновая кислота и/или вектор могут быть связаны с любым подходящим промотором, энхансером и другими элементами, облегчающими экспрессию. Примеры таких элементов включают сильные промоторы экспрессии (например, промотор/энхансер CMV IE человека, а также промоторы RSV, SV40, SL3 3, MMTV и HIV LTR), эффективные последовательности терминации поли(A), точку начала

репликации для плазмидного продукта в *E. coli*, ген устойчивости к антибиотикам в качестве селективируемого маркера и/или удобный сайт клонирования (например, полилинкер). Нуклеиновые кислоты могут также содержать индуцибельный промотор, в отличие от конститутивного промотора, как например, CMV IE.

Согласно одному варианту осуществления вектор экспрессии, кодирующий антитело против B7H4 и/или CD3, может быть расположен в клетке и/или доставлен в клетку. Следовательно, согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту или вектор, как определено в настоящем документе. Клетка может иметь человеческое происхождение, например, эмбриональная клетка почки человека (НЕК), например, клетка НЕК/Ехр1, или может иметь происхождение из грызунов, например, клетка яичника китайского хомячка, например, клетка CHO/N50.

Композиции и (медицинские) применения

Кроме того, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей антитело, как определено в настоящем документе. Предпочтительно, такая композиция представляет собой фармацевтическую композицию, т.е. антитело содержится в фармацевтически приемлемом носителе. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, нацеленное как на B7H4, так и на CD3. Фармацевтическая композиция также может содержать антитело, нацеленное на B7H4. Фармацевтическая композиция может также содержать комбинацию антител, включая антитело, нацеленное на B7H4, и/или биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением.

Фармацевтическая композиция может быть составлена в соответствии с общепринятыми методиками, такими как, например, описанные в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может, например, включать разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионный детергент, например, Tween-20 или Tween-80), стабилизаторы (например, сахара или свободные от белков аминокислоты), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы и/или другие вещества, подходящие для включения в фармацевтическую композицию.

Антитело, композицию или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению используют для применения в качестве лекарственного средства. Антитело, композицию или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению применяют для лечения заболеваний. Биспецифические антитела согласно настоящему

изобретению можно применять для ряда целей. В частности, биспецифические антитела согласно настоящему изобретению можно применять для лечения различных форм рака, включая метастатический рак и трудно поддающийся лечению рак. Предпочтительно рак может относиться к типу солидной опухоли.

В частности, биспецифические антитела согласно настоящему изобретению могут быть полезны в терапевтических условиях, в которых желательно специфическое нацеливание и опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, которые экспрессируют В7Н4.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, который предусматривает введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела против В7Н4хCD3 согласно настоящему изобретению. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения нарушения, в котором участвуют клетки, экспрессирующие В7Н4, у субъекта, где способ предусматривает введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела согласно настоящему изобретению.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, где способ предусматривает введение терапевтически эффективного количества антитела, способного связываться с В7Н4 человека, согласно настоящему изобретению. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения нарушения, в котором участвуют клетки, экспрессирующие В7Н4, у субъекта, где способ предусматривает введение терапевтически эффективного количества моноспецифического антитела согласно настоящему изобретению, которое способно связываться с В7Н4 человека.

Как указано, подходящими заболеваниями, которые могут рассматриваться в способах и применениях согласно настоящему изобретению, является рак. Указанный рак наиболее предпочтительно характеризуется экспрессией В7Н4. Экспрессию В7Н4 при раке можно легко определить с использованием способов, известных в данной области техники, таких как, например, ПЦР, иммуноокрашивание или анализ FACS, т.е. определение экспрессии транскрипта и/или белка В7Н4. Антитела, описанные в настоящем документе, которые способны связываться с В7Н4 человека, могут быть использованы, например, в иммуноокрашивании и/или анализе FACS или т.п.

Рак, при котором может присутствовать экспрессия В7Н4, включает рак молочной железы, рак матки/эндометрия, рак карциносаркомы матки, рак яичников, рак шейки матки, немелкоклеточный рак легкого (плоскоклеточный рак и аденокарциному), плоскоклеточный рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак пищевода,

холангиокарциному, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки и рак предстательной железы.

Рак, при котором может присутствовать экспрессия B7H4, включает рак, как например, рак желудка, холангиокарциному, рак мочевого пузыря, немелкоклеточный рак легкого (в частности, плоскоклеточный NSCLC), рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак молочной железы (включая тройной негативный рак молочной железы), рак яичников и рак матки. Типы рака, которые могут быть предпочтительными, включают рак, выбранный из карциносаркомы матки (UCS), уротелиальной карциномы мочевого пузыря (BLCA), аденокарциномы поджелудочной железы (PAAD), плоскоклеточной карциномы легкого (LUSC), инвазивной карциномы молочной железы (BRCA), карциномы тела матки и эндометрия (UCEC), серозной цистаденокарциномы яичника (OV) и холангиокарциномы (CHOL).

Согласно другому варианту осуществления у пациента, у которого диагностирован рак, может быть проведена оценка экспрессии B7H4 в раковых клетках, и при обнаружении экспрессии B7H4, которая может находиться в диапазоне от низкой до высокой, такой пациент может быть выбран для лечения с применением антитела согласно настоящему изобретению. Пациенты с диагнозом рак желудка, холангиокарцинома, рак мочевого пузыря, немелкоклеточный рак легкого (в частности плоскоклеточный NSCLC), рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак молочной железы (включая тройной негативный рак молочной железы), рак яичников или рак матки, могут быть подвергнуты такой оценке. Согласно другому варианту осуществления пациент, у которого диагностирована карциносаркома матки (UCS), уротелиальная карцинома мочевого пузыря (BLCA), аденокарцинома поджелудочной железы (PAAD), плоскоклеточная карцинома легкого (LUSC), инвазивная карцинома молочной железы (BRCA), карцинома тела матки и эндометрия (UCEC), серозная цистаденокарцинома яичника (OV) и холангиокарцинома (CHOL), может быть подвергнут такой оценке. Однако необязательно включать такую оценку при выборе пациента для лечения.

Наборы

Кроме того, настоящее изобретение относится к набору из частей, содержащему антитело, как описано выше, например, набору для применения в качестве сопутствующей диагностики/для идентификации в популяции пациентов тех пациентов, которые имеют склонность к ответу на лечение антителом, как определено в настоящем документе выше, или иммуноконъюгатом или конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC), как определено в настоящем документе выше, или для прогнозирования эффективности или

противоопухолевой активности указанного антитела, или иммуноконъюгата, или ADC при использовании для лечения пациента, причем набор содержит антитело, как определено выше, и инструкции по применению указанного набора.

Набор из частей, как например, набор для применения в качестве сопутствующей диагностики/для идентификации в популяции пациентов тех пациентов, которые имеют склонность к ответу на лечение антителом, как определено в любом из пп. 1 - 55, содержит антитело, как определено в любом из пп. 1 - 55, и инструкции по применению указанного набора.

Следовательно, согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к диагностической композиции, содержащей биспецифическое антитело против CD3×B7H4, как определено в настоящем документе, или антитело против B7H4, как определено в настоящем документе, и к ее применению.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к набору для обнаружения перекрестного связывания между клетками, экспрессирующими CD3 и B7H4, в образце, полученном у пациента, содержащему

- i) биспецифическое антитело согласно любому из вариантов осуществления, как раскрыто в настоящем документе, и
- ii) инструкции по применению указанного набора.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к набору для диагностики рака, содержащему контейнер, содержащий биспецифическое антитело против CD3×B7H4, и один или более реагентов для обнаружения перекрестного связывания клеток, экспрессирующих B7H4, и клеток, экспрессирующих CD3. Реагенты могут включать, например, флуоресцентные метки, ферментативные метки или другие обнаруживаемые метки. Реагенты также могут включать вторичные или третичные антитела или реагенты для ферментативных реакций, где ферментативные реакции приводят к продукту, который можно визуализировать.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу определения, происходит ли перекрестное связывание между клетками, экспрессирующими CD3 и B7H4, в образце, полученном у пациента, при введении биспецифического антитела в соответствии с любым из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, предусматривающему стадии:

- (i) приведения образца в контакт с биспецифическим антителом в соответствии с любым из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, в условиях, которые обеспечивают образование комплекса между указанным биспецифическим антителом и клетками, экспрессирующими CD3, и клетками, экспрессирующими B7H4, и

(ii) анализа, образовался ли комплекс.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1. Получение антител против B7H4 и материалов для скрининга

Экспрессия конструкций B7H4

Получали конструкции, кодирующие различные полноразмерные варианты B7H4: B7H4 человека (*Homo sapiens*) (Uniprot № доступа Q7Z7D3), B7H4 транскрипт 1 яванского макака (*Macaca fascicularis*) (Uniprot № доступа A0A2K5U6P5), B7H4 собаки (*Canis familiaris*) (Uniprot № доступа F1P8R9), B7H4 кролика (*Oryctolagus cuniculus*) (Uniprot № доступа G1TQE8), B7H4 крысы (*rattus norvegicus*) (Uniprot № доступа Q501W4), B7H4 мыши (*mus musculus*) (Uniprot № доступа Q7TSP5) и B7H4 свиньи (*sus scrofa*) (Uniprot № доступа F1SAY4) (см. Таблицу 1).

Кроме того, получали конструкцию для внеклеточного домена (ECD B7H4 человека (аминокислоты 25-259 из Uniprot, № доступа Q7Z7D3), слитого с доменом Fc IgG1 человека с С-концевой His-меткой и С-меткой (B7H4ECD-FcHisC) (SEQ ID NO: 12). В SEQ ID NO: 1 аминокислотные остатки 1-24 представляют собой сигнальный пептид, следовательно, зрелый белок B7H4ECD-FcHisC соответствует аминокислотным остаткам 25-259 последовательности SEQ ID NO: 1.

Конструкции содержали подходящие сайты рестрикции для клонирования и оптимальную последовательность Козака (GCCGCCACC) (Kozak, M., Gene 1999, 234(2):187-208). Полная длина и ECD конструкций B7H4 клонировали в pSB, вектор экспрессии млекопитающих, содержащий инвертированные терминальные повторы Sleeping Beauty, фланкирующие кассету экспрессии, состоящую из промотора CMV и сигнала полиА HSV-TK.

Получение клеточных линий HEK-293F, транзиентно экспрессирующих полноразмерные варианты B7H4

Клетки Freestyle™ 293-F (субклон HEK-293, адаптированный к росту в суспензии и среде Freestyle определенного химического состава [HEK-293F]) получали у Invitrogen (каталожный номер R790-07) и трансфицировали конструкциями, описанными выше, с использованием 293fectin. (Invitrogen, № по кат. 12347-019) в соответствии с инструкциями производителя.

Очистка B7H4 с меткой His

B7H4ECD-FcHisC экспрессировали с использованием экспрессионной платформы Expi293F (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, № по ка. A14527), по существу, как описано производителем.

His-метка обеспечивала очистку с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом Ni-NTA. Белок с меткой His прочно связывается с материалом колонки, в то время как другие белки, присутствующие в супернатанте культуры, не связываются или связываются слабо по сравнению с белками с меткой His и элюируются в проточном режиме. Колонку промывали для удаления слабосвязанных белков. Прочно связанные белки с меткой His затем элюировали буфером, содержащим имидазол, который препятствует связыванию His с Ni^{2+} . Элюент удаляли путем замены буфера на обессоливающей колонке.

Иммунизация

Животных OmniRat® (трансгенных крыс, экспрессирующих диверсифицированный состав антител с полностью человеческими идиотипами, Ligand Pharmaceuticals Inc., San Diego, USA иммунизировали подкожными инъекциями в скакательные суставы обеих задних конечностей (дважды в неделю в течение 7 недель) с 50 мкг B7H4ECD-FcHisC в PBS, смешанном с равным объемом адьюванта (адьювантная система Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, № по кат. S6322) или CFA, полный адьювант Freund (1^{-ая} инъекция) и IFA, неполный адьювант Freund (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, № по кат. F5881/F5506) (последующие инъекции) с последующей конечной бустерной подкожной инъекцией антигена в PBS без адьюванта.

Получение антитела

Клетки лимфатических узлов от иммунизированных животных сливали с клетками мышинной миеломы SP2.0 в соответствии со стандартными процедурами через 3 дня после последней бустерной инъекции. РНК из гибридом, продуцирующих специфическое антитело против B7H4, экстрагировали и получали 5'-RACE-комплементарную ДНК (кДНК) из 100 нг общей РНК с использованием набора для амплификации кДНК SMART RACE (Clontech) в соответствии с инструкциями производителя. Кодрующие области VH и VL амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали непосредственно в рамке считывания в векторах экспрессии p33G1f, p33Kappa и p33Lambda (векторы на основе pcDNA3.3 с кодон-оптимизированными IgG1m(f) человека, константные домены каппа и лямбда, соответственно), посредством независимого клонирования с лигированием

(Aslanidis, C. and P.J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990,18(20): 6069-74). Вариабельные домены этих векторов экспрессии секвенировали, а CDR аннотировали в соответствии с определениями IMGT (Lefranc MP. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999 и Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)). Клоны с правильной открытой рамкой считывания (ORF) экспрессировали и тестировали на связывание с антигеном. После проведения скрининга специфичности в отношении антигена последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи подвергали синтезу генов и клонированы в вектор экспрессии, включающий тяжелую цепь IgG1 человека, содержащую следующие аминокислотные мутации: L234F, L235E, D265A и K409R (FEAR), где номер положения аминокислот соответствует нумерации Eu (соответствует SEQ ID NO 60), и в векторы экспрессии, включающие легкую цепь каппа или лямбда человека. Для некоторых антител создавали вариант с точечной мутацией в вариабельных доменах для удаления остатка цистеина, который потенциально может вызвать нежелательное образование дисульфидного мостика, или для замены аспарагина на серин или остаток зародышевой линии для удаления потенциального сайта N-связанного гликозилирования. Например, из последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепи C1 получали вариант с заменой N52S, соответствующей замене в CDR2 (см. Таблицу 1, SEQ ID NO. 25 и 29), и еще один вариант может иметь N52Q замену N52Q (SEQ ID NO. 31).

Анализ скрининга специфичности в отношении антигена

Присутствие антител против В7Н4 в сыворотке иммунизированных животных или супернатантах культур гибридом и трансфектом определяли в анализе гомогенного связывания. Образцы анализировали на связывание антител с клетками НЕК-293F, транзистентно трансфицированными конструкциями, созданными для экспрессии полноразмерных вариантов В7Н4, экспрессирующими В7Н4 человека, В7Н4 яванского макака или В7Н4 мыши, или с клетками НЕК-293F дикого типа (отрицательный контроль). Образцы добавляли к клеткам для того, чтобы позволить антителу связываться с В7Н4. Затем связывание антител определяли с использованием соответствующего флуоресцентного конъюгата (AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L) Alexa Fluor® 647, Jackson ImmunoResearch, № по кат. 112-605-143, AffiniPure Goat Anti-Human IgG Fc gamma-Alexa Fluor® 647, Jackson ImmunoResearch, № по кат. 109-605-098). Клетки ($2,5 \times 10^5$ клеток/мл) смешивали с козьим античеловеческим антителом AffiniPure Goat Anti-Human IgG Fc gamma-Alexa Fluor® 647 (0,2 мкг/мл, Jackson ImmunoResearch Laboratories, 109-605-098) или AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L) Alexa Fluor® 647 (0,2 мкг/мл, Jackson ImmunoResearch, 112-605-143) в зависимости от основной цепи антитела. Готовили

серийные разведения тестируемых и контрольных антител (от 0,003 до 3 мкг/мл с шагом 2-кратного разведения), и 2 мкл разведения антител добавляли к 5 мкл смеси клеток/конъюгата в 1536-луночных планшетах (Greiner, № по кат. 789866). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 9 часов, после чего определяли интенсивность флуоресценции с использованием лазерного сканирующего цитометра ImageXpress Velos (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA) и использовали общую флуоресценцию для считывания. Образцы считали положительными, когда отсчеты были выше 50, а отсчеты×флуоресценция было в по меньшей мере три раза выше, чем в отрицательном контроле.

Результаты получения панели антител против В7Н4

Из 176 из 193 полученных гибридом были успешно получены последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи. Из 351 протестированной комбинации тяжелой цепи/легкой цепи 98 показали связывание в анализах скрининга антигена с использованием клеток НЕК-293F, трансфицированных В7Н4 человека, как описано выше. Было отобрано 35 антител: 26 с исходными последовательностями и 9 вариантов с точечными мутациями, введенными в переменные домены. Антитела получали в виде одновалентных связывающих антител (в виде биспецифических CD3) и двухвалентных связывающих антител (в виде молекул IgG1) и тестировали на связывание с опухолевыми клетками, как описано ниже. Среди антител полученной панели только антитело В7Н4-С1 и его вариант В7Н4-С1-Н52S, последовательности, кодирующие соответствующие переменные домены VH и VL антител, которых перечислены в Таблице 1, представляют собой антитела, которые связываются с опухолевыми клетками, как описано ниже.

Другие антитела против В7Н4

В примерах использовали дополнительные антитела, специфические для В7Н4, содержащие переменные домены, ранее описанные в WO2014159835 (упоминаются в ней как SEQ ID NO 38 и 35), соответствующие в настоящем документе В7Н4-С2, релевантные последовательности переменных доменов перечислены в настоящем документе в Таблице 1 и включают SEQ ID NO. 43 и 47, WO2014159835 (упоминаются в ней как SEQ ID NO 56 и 55), соответствующие в настоящем документе В7Н4-С3, релевантные последовательности переменных доменов перечислены в настоящем документе в Таблице 1 и включают SEQ ID NO. 36 и 40, WO2009073533 (упоминаются в ней как SEQ ID No 2 и 7), соответствующие в настоящем документе В7Н4-С4, и релевантные последовательности переменных доменов перечислены в настоящем документе в Таблице 1 и включают SEQ

ID NO. 50 и 54, и US20190085080A1, соответствующие в настоящем документе B7H4-C5, и релевантные последовательности переменных доменов перечислены в настоящем документе в Таблице 1 и включают SEQ ID NO. 65 и 69. Соответствующие последовательности, кодирующие переменные домены VH и VL антитела, синтезировали и клонировали в векторы на основе pcDNA3.3 с кодон-оптимизированным IgG1m(f) человека и константными доменами и каппа или лямбда человека или их варианты, с получением моноспецифических и биспецифических антител. Ссылка на антитело IgG1-B7H4-CX-FEAL означает антитело, имеющее переменные области B7H4-CX, относящееся к изотипу IgG1 и имеющее аминокислотные замены L234F, L235E, D265A и F409R в константной области тяжелой цепи.

Антитело IgG1-b12

Антитело b12, HIV-1 gp120 специфическое антитело (Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5, 230(3):812-23) использовали в некоторых примерах в качестве отрицательного контроля IgG1 или в качестве несвязывающего контрольного Fab-плечо контрольного биспецифического антитела. Кодон-оптимизированные кодирующие последовательности антитела для этого контрольного антитела синтезировали и клонировали в векторы на основе pcDNA3.3 с кодон-оптимизированным IgG1m(f) человека и константными доменами каппа или их варианты. Последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) и последовательность переменной области легкой цепи (VL) включены в настоящий документ как SEQ ID NO.: 14 и 15, соответственно.

Пример 2. Гуманизированные антитела против CD3 для получения биспецифических антител против CD3×B7H4

Получение гуманизированного антитела IgG1-huCD3-H1L1 (последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей которого перечислены в настоящем документе в SEQ ID NO: 16 и 22) описано в Примере 1 в WO2015/001085. IgG1-huCD3-H1L1 обозначается в настоящем документе как «IgG1-huCD3». Антитело IgG1-huCD3-H1L1-FEAL представляет собой его вариант с тремя аминокислотными заменами в домене Fc (L234F, L235E, D265A), в дополнение к аминокислотной замене, которая позволяет получить биспецифические антитела посредством контролируемого обмена Fab-плечами (F405L), как описано в настоящем документе ниже. Было показано, что такие мутации не влияют на целевое связывание антител, в которые они введены (см., например, US 2015/0337049 и Engelberts et al., 2020, EBioMedicine 52: 102625).

Получение гуманизированного антитела IgG1-huCD3-H1L1-H101G (последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей которого перечислены как SEQ ID NO: 17 и 22 в настоящем документе) описано в Примере 2 в WO2017/009442. IgG1-huCD3-H1L1-H101G обозначено как «IgG1-huCD3-H101G». Этот вариант содержит замену H101G в последовательности переменной области тяжелой цепи (сравните SEQ ID NO.16 и 17) и имеет ту же легкую цепь, что и IgG1-huCD3-H1L1. Антитело IgG1-huCD3-H101G-FEAL представляет собой его вариант с аминокислотными заменами L234F, L235E, D265A и F405L.

Пример 3. Определение аффинности связывания B7H4 с применением биослойной интерферометрии

Аффинность связывания антител против B7H4 с мишенью определяли с помощью биослойной интерферометрии без метки (BLI) на устройстве Octet HTX (FortéBio). Эксперименты проводили при встряхивании со скоростью 1000 оборотов в минуту при 30 °C. Первоначально аффинность IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR, IgG1-B7H4-C2-FEAR, IgG1-B7H4-C3-FEAR и IgG1-B7H4-C4-FEAR для B7H4 человека и мыши определяли с использованием BLI. Биосенсоры Capture против Fc IgG человека (АНС) (FortéBio, № по кат. 18-5060) предварительно кондиционировали путем воздействия 10 mM глицина (Sigma-Aldrich, № по кат. 15527) в буфере с pH 1,7 в течение 5 с, с последующей нейтрализацией в Sample Diluent (FortéBio, № по кат. 18-1048) в течение 5 с, обе стадии повторяли 2 раза. Затем сенсоры АНС загружали антителом (1 мкг/мл в разбавителе образца) в течение 600 с. После измерения исходного уровня в разбавителе образца (100 с), ассоциации (300 с) и диссоциации (1000 с) B7H4 человека (Sino Biological, № по кат. 10738-H08H-100) или B7H4 мыши (R&D Systems, № по кат. 2154-B7-050) определяли с использованием диапазона концентраций 1,56 - 100 нМ (0,04 - 2,68 мкг/мл) и 5,9 - 375 нМ (0,16 - 10 мкг/мл) для B7H4 человека и мыши, соответственно, с шагами двукратного разведения в разбавителе образца. Для расчетов использовали теоретическую молекулярную массу B7H4 человека и B7H4 мыши (в виде ECD-His-меченых молекул), основанную на их аминокислотных последовательностях (26,8 кДа и 26,6 кДа, соответственно). Для каждого антитела использовали эталонный сенсор, который инкубировали с разбавителем образца вместо антигена. Сенсоры АНС регенерировали путем обработки 10 mM глициновым буфером с pH 1,7 в течение 5 с, с последующей нейтрализацией в разбавителе образца в течение 5 с, обе стадии повторяли дважды. Затем сенсоры снова загружали антителом для следующего цикла кинетических измерений.

Данные получали с использованием программного обеспечения для сбора данных v9.0.0.49d (FortéBio) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных v9.0.0.12 (FortéBio). Протокол данных корректировали на антитело путем вычитания эталонного сенсора. Ось Y выравнивали с последними 10 с исходного уровня, применяли выравнивание Interstep Correction для диссоциации и фильтрацию Савицкого-Голея. Протоколы данных с ответом $< 0,05$ нМ исключали из анализа. Данные сопоставляли с моделью Global Full fit 1:1 с использованием окна интереса для времени ассоциации и диссоциации, установленного на 300 с и 200 с, соответственно.

Во втором эксперименте аффинность IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR, IgG1-B7H4-C2-FEAR, IgG1-B7H4-C3-FEAR, IgG1-B7H4-C4-FEAR и IgG1-B7H4-C5-FEAR для B7H4 человека и мыши определяли с помощью BLI. Эксперимент проводили, как описано выше, за некоторыми небольшими исключениями. Стадии предварительного кондиционирования повторяли 5 раз. Ассоциацию (200 с) и диссоциацию (1000 с) B7H4 человека или мыши определяли в диапазоне концентраций 0,78 – 800 нМ с шагами двукратного разведения в разбавителе образца. Данные получали с использованием программного обеспечения для сбора данных v12.0.1.8 (FortéBio) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных v12.0.1.2 (FortéBio). Данные сопоставляли с моделью Global Full Fit 1:1 с использованием окна интереса для времени ассоциации 200 с и окна интереса для времени диссоциации 200 с, за исключением IgG1-B7H4-C2-FEAR, для которого использовали время диссоциации 1000 с. Время диссоциации выбирали на основе значения R^2 , визуальной кривой и по меньшей мере 5% затухания сигнала на стадии диссоциации. Протокол данных, полученный при концентрациях антигена выше 100 нМ, исключали из анализа для антител с аффинностью ниже 50 нМ.

Кроме того, аффинность для B7H4 яванского макака определяли с помощью BLI. В первом эксперименте определяли аффинность bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C3-FEAR, и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR для B7H4 яванского макака. Биосенсоры Amine Reactive 2nd Generation (AR2G) (FortéBio, № по кат. 18-5092) активировали реакцией с 20 мМ EDC (гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида) (FortéBio, № по кат. 18-1033) и 10 мМ s-NHS (натриевая соль N-гидроксисульфосукцинимиды) (FortéBio, № по кат. 18-1067) в течение 300 с. Активированные сенсоры загружали 10 мкг /мл рекомбинантного hIgG1 Fc-меченого B7H4 яванского макака (Creative BioMart, № по кат. VTCN1-1517R) в 10 мМ ацетата натрия с pH 4,0 (FortéBio, № по кат. 18-1068) в течение 600 с и гасили 1 М этаноламином с pH 8,5 (FortéBio, № по кат. 18-1071) в течение 300 с. После измерения исходного уровня в

разбавителе образца (300 с, FortéBio, № по кат. 18-1048) определяли ассоциацию (100 с) и диссоциацию (1000 с) функционально одновалентного В7Н4, связывающегося с биспецифическими антителами против CD3×В7Н4 (как указано в таблице 8) с применением диапазона концентраций 0,23 – 15 мкг/мл (1,56 – 100 нМ) с шагами двукратного разведения в разбавителе образца. Для расчетов использовали молекулярную массу антител 150 кДа. Для каждого антитела использовали эталонный сенсор, который инкубировали с разбавителем образца вместо антитела.

Данные получали с использованием программного обеспечения для сбора данных v9.0.0.49d (FortéBio) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных v9.0.0.12 (FortéBio). Протоколы данных корректировали на антитело путем вычитания эталонного сенсора. Ось Y выравнивали с последними 10 с исходного уровня, применяя выравнивание Interstep Correction по диссоциации и фильтрацию Савицкого-Голея. Протоколы данных с ответом < 0,05 нМ исключались из анализа. Данные сопоставляли с применением модели 1:1 Global Full fit с использованием окна интереса для времени ассоциации и диссоциации, установленных на 100 с и 200 с, соответственно.

Во втором эксперименте по определению аффинности антител против В7Н4 для В7Н4 яванского макака определяли аффинность bsIgG1-huCD3-H101G-FEAL×В7Н4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEAL×В7Н4-C5-FEAR. Эксперимент проводили, как описано выше, за некоторыми небольшими исключениями. После измерения исходного уровня в разбавителе образца в течение 600 с определяли ассоциацию (200 с) и диссоциацию (1000 с) функционально одновалентного В7Н4, связывающегося с биспецифическими антителами против CD3×В7Н4 (как указано в таблице 9), с использованием диапазона концентраций приблизительно 0,1 – 116 мкг /мл (0,78 - 800 нМ) с двукратным разведением в разбавителе образца. Для расчетов использовали удельную молекулярную массу каждого антитела (приблизительно 145 кДа). Данные получали с использованием программного обеспечения для сбора данных v12 (FortéBio) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных v12 (FortéBio). Протоколы данных с ответом < 0,03 нМ исключали из анализа. Данные сопоставляли с применением модели Global Full fit 1:1 с использованием окна интереса для времени ассоциации и времени диссоциации, равных 200 с. Время диссоциации выбирали на основе значения R^2 , визуальной оценки кривой и по меньшей мере 5% затухания сигнала на стадии диссоциации. Протоколы данных, полученные при концентрациях антител выше 200 нМ, исключали из анализа для антител с аффинностью ниже 50 нМ. Все результаты определяли с R^2 по меньшей мере 0,98.

“ K_D ” (М) относится к равновесной константе диссоциации взаимодействия

антитело-антиген и ее получают путем деления k_d на k_a . « k_d » (с^{-1}) относится к константе скорости диссоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген. Ее иногда также упоминают как значение k_{off} или скорость диссоциации. « k_a » ($\text{М}^{-1} \times \text{с}^{-1}$) относится к константе скорости ассоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген. Ее иногда также упоминают как значение k_{on} или скорость ассоциации.

В таблицах 4 и 5 представлены результаты первого и второго эксперимента, в которых константу скорости ассоциации k_a ($1/\text{Mc}$), константу скорости диссоциации k_d ($1/\text{с}$) и равновесную константу диссоциации K_D (M) указанных антител для В7Н4 человека определяли посредством биослойной интерферометрии.

Таблица 4. Аффинность связывания антител с внеклеточным доменом В7Н4 человека, как определено посредством биослойной интерферометрии без метки. ND = не определено.

Антитело	Скорость ассоциации k_a ($1/\text{Mc}$)	Скорость диссоциации k_d ($1/\text{с}$)	K_D (M)
IgG1-B7H4-C1-FEAR	ND	ND	ND
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	9,4E+04	5,4E-03	5,7E-08
IgG1-B7H4-C2-FEAR	5,2E+04	8,8E-04	1,7E-08
IgG1-B7H4-C3-FEAR	9,9E+04	4,1E-03	4,2E-08
IgG1-B7H4-C4-FEAR	1,5E+05	1,6E-03	1,1E-08

Таблица 5. Аффинность связывания антител с внеклеточным доменом В7Н4 человека, как определено посредством биослойной интерферометрии без метки.

Антитело	Скорость ассоциации k_a ($1/\text{Mc}$)	Скорость диссоциации k_d ($1/\text{с}$)	K_D (M)
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR ¹	8,4E+04	4,7E-03	5,7E-08
IgG1-B7H4-C2-FEAR	5,9E+04	1,7E-04	3,0E-09
IgG1-B7H4-C3-FEAR	8,1E+04	4,4E-03	5,4E-08
IgG1-B7H4-C4-FEAR	2,2E+05	1,7E-03	7,9E-09
IgG1-B7H4-C5-FEAR	2,5E+05	2,5E-03	9,9E-09

¹ Показаны средние результаты для $n=3$ экспериментов.

В Таблицах 6 и 7 показаны результаты двух экспериментов, в которых k_a ($1/\text{Mc}$), k_d ($1/\text{с}$) и K_D (M) указанных антител для В7Н4 мыши определяли посредством биослойной

интерферометрии.

Таблица 6. Аффинности связывания антител с внеклеточным доменом В7Н4 мыши, как определено посредством биослойной интерферометрии без метки. ND = не определено, - = нет связывания (ответ $<0,05$ нМ при самой высокой применяемой концентрации).

Антитело	Скорость ассоциации k_a (1/Мс)	Скорость диссоциации k_d (1/с)	K_D (М)
IgG1-B7H4-C1-FEAR	ND	ND	ND
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	-	-	-
IgG1-B7H4-C2-FEAR	3,3E+04	7,7E-04	2,4E-08
IgG1-B7H4-C3-FEAR	5,1E+04	2,0E-02	3,9E-07
IgG1-B7H4-C4-FEAR	8,4E+04	1,4E-03	1,6E-08

Таблица 7. Аффинности связывания антител с внеклеточным доменом В7Н4 мыши, как определено посредством биослойной интерферометрии без метки. - = нет связывания (ответ $<0,05$ нМ при самой высокой применяемой концентрации).

Антитело	Скорость ассоциации k_a (1/Мс)	Скорость диссоциации k_d (1/с)	K_D (М)
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	-	-	-
IgG1-B7H4-C2-FEAR	6,3E+04	1,3E-04	2,1E-09
IgG1-B7H4-C3-FEAR	5,9E+04	1,8E-02	3,0E-07
IgG1-B7H4-C4-FEAR	1,4E+05	1,4E-03	9,7E-09
IgG1-B7H4-C5-FEAR	1,7E+05	2,4E-03	1,4E-08

В Таблицах 8 и 9 показаны результаты двух экспериментов, в которых k_a (1/Мс), k_d (1/с) и K_D (М) указанных антител для В7Н4 яванского макака определяли посредством биослойной интерферометрии.

Таблица 8. Аффинности связывания функциональных одновалентных антител с

внеклеточным доменом B7H4 яванского макака, как определено посредством биослойной интерферометрии без метки.

Антитело	Скорость ассоциации k_a (1/Мс)	Скорость диссоциации k_d (1/с)	K_D (М)
bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-FEAR	2,7E+05	1,4E-03	5,1E-09
bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR	1,4E+05	3,0E-03	2,1E-08
bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR	1,3E+05	4,1E-04	3,1E-09
bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C3-FEAR	2,8E+05	4,1E-03	1,5E-08
bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR	3,5E+05	1,5E-03	4,2E-09

Таблица 9. Аффинности связывания функциональных одновалентных антител с внеклеточным доменом B7H4 яванского макака, как определено посредством биослойной интерферометрии без метки.

Антитело	R^2	Скорость ассоциации k_a (1/Мс)	Скорость диссоциации k_d (1/с)	K_D (М)
bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR ^a	0,99	1,2E+05	2,7E-03	2,5E-08
bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR ^b	0,97	4,2E+05	2,5E-03	6,0E-09

^a Показаны средние результаты для n=3 экспериментов.

^b Не соответствует порогу строгого контроля качества R^2 0,98.

Пример 4. Определение аффинности связывания CD3 с использованием биослойной интерферометрии

Аффинности связывания IgG1-huCD3-FEAL и IgG1-huCD3-H101G-FEAL определяли, как описано в Примере 7 в WO2017/009442.

Кратко, аффинности связывания выбранных антител против CD3 в формате IgG1-huCD3-FEAL с рекомбинантным растворимым CD3ε (CD3E27-GSKa) (зрелый белок согласно SEQ ID NO: 13) определяли с помощью биослойной интерферометрии на устройства ForteBio Octet HTX (ForteBio). Биосенсоры Capture против Fc человека

(ForteBio, № по кат. 18-5060) загружали в течение 600 с hlgG (1 мкг/мл). После измерения исходного уровня (200 с) определяли ассоциацию (1000 с) и диссоциацию (2000 с) CD3E27-GSKa, используя диапазон концентраций CD3E27-GSKa 27,11 мкг/мл - 0,04 мкг/мл (1000 нМ - 1,4 нМ) с трехкратным разведением (разбавитель образца, ForteBio, № по кат. 18-5028). Для расчетов использовали теоретическую молекулярную массу CD3E27-GSKa, основанную на аминокислотной последовательности, т.е. 27,11 кДа. Эксперименты проводили при встряхивании при 1000 оборотах в минуту и температуре 30°C. Каждое антитело тестировали по меньшей мере в двух независимых экспериментах. Данные анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных ForteBio v8.1 с использованием модели 1:1 и global full fit со временем ассоциации 1000 с и временем диссоциации 100 с. Протоколы данных корректировали путем вычитания эталонной кривой (антитела на биосенсоре, измерение только с разбавителем образца), ось Y выравнивали с последними 10 с исходного уровня, применяли коррекцию между стадиями, а также фильтрацию Савицкого-Голея. Протоколы данных с ответом <0,05 нМ исключали из анализа.

В Таблице 10 показана константа скорости ассоциации k_a (1/Мс), константа скорости диссоциации k_d (1/с) и равновесная константа диссоциации K_D (М) для рекомбинантного CD3ε, определенные посредством биослойной интерферометрии. IgG1-huCD3-FEAL показал относительно высокую (K_D : 15 нМ) аффинность связывания с рекомбинантным CD3ε по сравнению с IgG1-huCD3-H101G-FEAL (K_D : 683 нМ).

Таблица 10. Аффинности связывания моноспецифических двухвалентных антител против CD3 с рекомбинантным CD3ε, как определено посредством биослойной интерферометрии без метки

Антитело	Скорость ассоциации k_a (1/Мс)	Скорость диссоциации k_d (1/с)	K_D (нМ)
IgG1-huCD3-FEAL	2,7E+05	4,0E-03	15
IgG1-huCD3-H101G-FEAL	3,0E+04	2,0E-02	683

Пример 5. Перекрестное блокирование антител против B7H4, как определено посредством биослойной интерферометрии

Анализ перекрестного блокирования антител (связывания эпитопа) в классическом сэндвич-формате выполняли с помощью BLI на устройстве Octet HTX (FortéBio). Первый эксперимент перекрестного блокирования с IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR, IgG1-B7H4-C2-

FEAR, IgG1-B7H4-C3-FEAR и IgG1-B7H4-C4-FEAR проводили при встряхивании при 1000 оборотах в минуту и при 30°C.

Биосенсоры Amine Reactive 2nd Generation (AR2G) (FortéBio, № по кат. 18-5092) активировали в течение 300 с раствором 20 mM EDC (гидрохлорид *N*-(3-диметиламинопропил)-*N'*-этилкарбодиимида) (Sigma- Aldrich, № по кат. 03449) и 10 mM s-NHS (натриевая соль *N*-гидроксисульфосукцинимид) (Sigma-Aldrich, № по кат. 56485). Активированные сенсоры AR2G загружали 20 мкг/мл первого антитела в 10 mM ацетата натрия, pH 6,0 (FortéBio, № по кат. 18-1070) в течение 600 с и гасили с 1 М этаноламином с pH 8,5 (FortéBio, № по кат. 18-1071) в течение 300 с. После измерения исходного уровня в разбавителе образца (50 с, FortéBio, № по кат. 18-1048) биосенсоры AR2G, содержащие иммобилизованные антитела, загружали в течение 300 с B7H4 человека (100 нМ или 2,68 мкг/мл, разведенного в разбавителе образца, Sino Biological, № по кат. 10738-H08H). Для расчетов использовали теоретическую молекулярную массу B7H4 человека, основанную на аминокислотной последовательности (26,8 кДа). Определяли ассоциацию (300 с) второго антитела (10 мкг/мл в разбавителе образца). Сенсоры регенерировали путем обработки 10 mM глициновым буфером (Riedel-de Haën, № по кат. 15527) с pH 2,5 в течение 5 с, с последующей нейтрализацией в разбавителе образца в течение 5 с, обе стадии повторяли дважды. Затем снова использовали сенсоры, содержащие иммобилизованное первое антитело, начиная со стадии исходного уровня.

Данные получали с использованием программного обеспечения для сбора данных v9.0.0.49d (FortéBio) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных HT v10.0.17 (FortéBio). Протоколы данных корректировали путем вычитания эталонной кривой (разбавитель образца вместо второго антитела), чтобы скорректировать диссоциацию B7H4 от иммобилизованного первого антитела. Ось Y выравнивали с началом стадии ассоциации и применяли фильтрацию Савицкого-Голея. Скорректированные ответы ассоциации вторых антител наносили на график в формате матрицы. В общем, ответы > 0,05 нМ рассматривали как антитела без перекрестного блокирования, а ответы < 0,05 нМ рассматривали как блокирующие пары антител.

Эксперимент по перекрестному блокированию повторяли для того, чтобы также включить IgG1-B7H4-C5-FEAR, и проводили, как описано выше, с небольшими адаптациями. Эксперимент проводили при встряхивании со скоростью 1000 оборотах в минуту и температуре 22°C. Данные получали с использованием программного обеспечения для сбора данных v12.0.1.8 (ForteBio) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных HT v12.0.1.55 (ForteBio). В общем, ответы > 0,1 нМ рассматривали как антитела без перекрестного блокирования, а ответы < 0,1 нМ

рассматривали как блокирующие пары антител.

Первоначальные эксперименты по перекрестному блокированию проводили для антител IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR, IgG1-B7H4-C3-FEAR, IgG1-B7H4-C4-FEAR и IgG1-B7H4-C2-FEAR. Результаты суммированы в таблице 11. Проводили вторую серию экспериментов по перекрестному блокированию, включающую также IgG1-B7H4-C5-FEAR. Эти результаты суммированы в таблице 12. В первом столбце показаны иммобилизованные антитела, в первой строке показаны антитела в растворе (обозначаемые выше как «вторые антитела»). Показаны скорректированные ответы ассоциации антител в растворе. Перекрестное блокирование антител обозначено темно-серым цветом, а неблокирующие комбинации антител не отмечены (прозрачный фон), показывая, что IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR, IgG1-B7H4-C3-FEAR и IgG1-B7H4-C5-FEAR перекрестно блокируют друг друга, но не IgG1-B7H4-C4-FEAR и IgG1-B7H4-C2-FEAR, и наоборот.

Таблица 11. Первый эксперимент по перекрестному блокированию антител с использованием биослойной интерферометрии.

В первом столбце показаны иммобилизованные антитела, а в первой строке показаны антитела в растворе. Показаны скорректированные ответы ассоциации антител в растворе. Перекрестное блокирование антител обозначен темно-серым цветом, неблокирующие комбинации антител не отмечены (прозрачный фон).

Перекрестное антител	блокирование IgG1-B7H4-C1-N52S- FEAR	IgG1-B7H4-C3-FEAR	IgG1-B7H4-C4-FEAR	IgG1-B7H4-C2-FEAR
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR	-0,01	0,00	0,80	0,56
IgG1-B7H4-C3-FEAR	-0,02	-0,01	0,97	0,53
IgG1-B7H4-C4-FEAR	0,82	0,56	-0,02	-0,01
IgG1-B7H4-C2-FEAR	0,74	0,54	0,00	0,00

Таблица 12. Второй эксперимент по перекрестному блокированию антител с

использованием биослойной интерферометрии.

В первом столбце показаны иммобилизованные антитела, а в первой строке показаны антитела в растворе. Показаны скорректированные ответы ассоциации антител в растворе. Перекрестное блокирование антител обозначен темно-серым цветом, неблокирующие комбинации антител не отмечены (прозрачный фон).

Перекрестное антител	блокирование	IgG1-B7H4-C1-N52S- FEAR	IgG1-B7H4-C3-FEAR	IgG1-B7H4-C2-FEAR	IgG1-B7H4-C4-FEAR	IgG1-B7H4-C5-FEAR
IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR		0	0,01	0,38	0,42	0,43
IgG1-B7H4-C3-FEAR		0,01	0	0,44	0,57	0,61
IgG1-B7H4-C2-FEAR		0,28	0,25	0,01	0,01	0,02
IgG1-B7H4-C4-FEAR		0,5	0,39	0	-0,01	0
IgG1-B7H4-C5-FEAR		0,67	0,57	-0,03	-0,03	-0,01

Пример 6. Получение биспецифических антител с помощью 2-МЕА-индуцированного обмена Fab-плеч

Биспецифические антитела получали *in vitro* с использованием технологии платформы DuoBody®, т.е. 2-МЕА-индуцированного обмена Fab-плеч, как описано в WO2011147986, WO2011131746 и WO2013060867 (Genmab) и Labrijn et al. (Labrijn et al., PNAS 2013, 110: 5145-50, Gramer et al., MAbs 2013, 5: 962-973). Для того, чтобы обеспечить продукцию биспецифических антител этим способом создавали молекулы IgG1, несущие специфические точечные мутации в домене CH3: в одном родительском антителе IgG1 мутацию F405L (т.е. антитела против CD3 в данной заявке), в другом родительском антителе IgG1 мутацию K409R (т.е. антитела против B7H4 или контрольные, HIV-1 gp120-специфические антитела в настоящей заявке). В дополнение к этим мутациям родительские антитела IgG1 включали замены L234F, L235E, D265A (FEA).

Для получения биспецифических антител два родительских антитела смешивали в равных массовых количествах в буфере PBS (фосфатно-солевой буфер, 8,7 мМ HPO_4^{2-} , 1,8 мМ H_2PO_4^- , 163,9 мМ Na^+ , 140,3 мМ Cl^- , pH 7,4). Добавляли 2-меркаптоэтиламин-HCl (2-МЭА) до конечной концентрации 75 мМ и реакционную смесь инкубировали при 31°C в течение 5 часов. 2- МЕА удаляли диализом в буфер PBS с использованием картриджей

Slide-A-Lyzer с отсечкой молекулярной массы 10 кДа (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя, чтобы обеспечить повторное окисление межцепочечных дисульфидных связей и образование интактных биспецифических антител.

В примерах применяли следующие антитела:

Антитела против B7H4

IgG1-B7H4-C1-FEAR (имеющие последовательности VH и VL согласно SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 33).

IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR (имеющие последовательности VH и VL согласно SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 33).

IgG1-B7H4-C2-FEAR имеющие последовательности VH и VL согласно SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 47).

IgG1-B7H4-C3-FEAR имеющие последовательности VH и VL согласно SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 40).

IgG1-B7H4-C4-FEAR имеющие последовательности VH и VL согласно SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 54).

IgG1-B7H4-C5-FEAR имеющие последовательности VH и VL согласно SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 69).

Аннотация IgG1 указывает на то, что были получены полноразмерные антитела изотипа IgG1, а аннотация FEAR указывает на то, что константные области тяжелой цепи содержат аминокислотные замены L234F, L235E, D265A и K409R, а константные области легкой цепи относятся к каппа-типу (SEQ ID № 61 и 63, соответственно).

Антитела против CD3

IgG1-huCD3-FEAL (имеющие последовательности VH и VL согласно SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 22).

IgG1-huCD3-H101G-FEAL (имеющие последовательности VH и VL согласно SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 22).

Аннотация IgG1 указывает на то, что были получены полноразмерные антитела изотипа IgG1, а аннотация FEAL указывает на то, что константные области тяжелой цепи содержат аминокислотные замены L234F, L235E, D265A и F405L, а константные области легкой цепи относятся к лямбда-типу (SEQ ID № 60 и 64, соответственно).

Контрольные антитела

IgG1-b12-K409R (имеющие последовательности VH и VL согласно SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15).

Аннотация IgG1 указывает на то, что были получены полноразмерные антитела изотипа IgG1, а аннотация K409R указывает, что константные области тяжелой цепи содержат аминокислотную замену K409R, а константные области легкой цепи относятся к каппа-типу (SEQ ID NO. 62 и 63, соответственно).

Биспецифические антитела

Антитела против CD3 и B7H4, описанные выше, объединяли с получением биспецифического антитела, имеющего одну антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, и другую антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4, обеспечивая биспецифическое антитело изотипа IgG1, которое аннотировано как bsIgG1.

bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-FEAR

bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR

bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR

bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C3-FEAR

bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C4-FEAR

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C2-FEAR

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C3-FEAR

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR

bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR (для плеча b12, имеющего последовательности VH и VL согласно SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15)

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR

Пример 7. Определение домена B7H4 и функционального эпитопа, участвующих в связывании, с использованием химерных молекул B7H4-B7H3 и библиотеки аланинового сканирования B7H4

Картирование доменов с использованием химерных молекул B7H4-B7H3 с использованием анализа конечной точки

Специфичность антител против B7H4 к домену B7H4 определяли с использованием панели клеток, трансфицированных для экспрессии B7H4 человека, B7H3 человека (структурно сопоставимый белок с достаточным отличием аминокислотной последовательности во внеклеточном домене) или двух разных химерных молекул B7H4 -

В7Н3 человека. Получали конструкции экспрессии, кодирующие В7Н4 человека, В7Н3 человека (Uniprot № доступа Q5ZPR3-1, SEQ ID NO: 9) или химерную молекулу, содержащую домен IgV В7Н3 и домен IgC В7Н4 (В7Н3-IgV/В7Н4-IgC, SEQ ID NO: 11), или химерную молекулу, содержащую домен IgV В7Н4 и домен IgC В7Н3 (В7Н4-IgV/В7Н3-IgC, SEQ ID NO: 10). Клетки НЕК транзигентно трансфицировали для экспрессии этих конструкций.

Клетки (3×10^4 клеток/лунка) инкубировали в полистироловых 96-луночных круглодонных планшетах (Greiner bio-one, № по кат. 650101) с серийными разведениями антител (диапазон от 0,0046 до 10 мкг/мл с 3-кратными разведениями) в 50 мкл PBS/0,1% BSA/0,02% азида (буфер FACS) при 4°C в течение 30 мин. После двукратной промывки в FACS-буфере клетки инкубировали со вторичным антителом при 4°C в течение 30 мин. В качестве вторичного антитела применяли R-фикоэритрин (РЕ)-конъюгированный козий античеловеческий IgG F(ab')₂ (1:500 в буфере окрашивания, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, № по кат. 109 -116-098). Далее клетки дважды промывали в FACS-буфере, ресуспендировали в 20 мкл FACS-буфера и анализировали на скринере iQue (Intellicyt Corporation, USA). Связывание bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C1-N52S-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C4-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C3-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C2-FEAR при 10 мкг/мл определяли как % средней интенсивности флуоресценции (MFI) связывания 10 мкг/мл:

- IgG1-B7Н3-BRCA84D (В7Н3-специфического антитела IgG1, полученного как описано выше с последовательностями CDR, как описано для антитела BRCA84D в WO2011109400) с клетками, экспрессирующими В7Н3,
- bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C4-FEAR с клетками, экспрессирующими В7Н3-IgV/В7Н4-IgC,
- bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C2-FEAR с клетками, экспрессирующими В7Н4-IgV/В7Н3-IgC,
- и bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C3-FEAR с клетками, экспрессирующими В7Н4.

На фиг. 1 показано, что домен IgC В7Н4 участвует в связывании bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C4-FEAR, домены IgC и IgV В7Н4 участвуют в связывании bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C3-FEAR, и по меньшей мере IgV-домен В7Н4 участвует в связывании bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C2-FEAR. Для антитела C2, вариабельные домены которого использовали для создания bsIgG1-huCD3-FEALxB7Н4-C2-FEAR, описано, что оно связывается с доменом IgV, данные на фиг. 1 показывают, что домен IgC также участвует в связывании (WO2014159835 и Leong et al

2015, Mol. Pharmaceutics 12, 1717–1729).

Картирование доменов с использованием химерных молекул B7H4-B7H3 с использованием анализа полных кривых зависимости ответа от дозы

Дальнейшие эксперименты проводили для более подробного изучения специфичности к домену B7H4 антител против B7H4 путем анализа полных кривых зависимости ответа от дозы. В этих экспериментах также определяли доменную специфичность bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR. Связывание серийных разведений (от 0,014 до 30 мкг/мл с 3-кратными разведениями) bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C2-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C3-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR с клетками НЕК, транзигентно трансфицированными для экспрессии B7H4 человека или B7H4-B7H3 химерных молекул B7H3-IgV/B7H4-IgC или B7H4-IgV/B7H3-IgC, определяли, как описано выше. На фиг. 2 показаны кривые зависимости ответа от дозы, показывающие, что домен IgC B7H4 участвует в связывании bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, что соответствует результатам экспериментов с библиотекой аланинового сканирования. Кроме того, домен IgV участвует в связывании bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C2-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR, тогда как оба домена IgC и IgV, по-видимому, участвуют в связывании bsIgG1-huCD3-H101GFEALxB7H4-C3-FEAR.

Определение вклада аминокислотных остатков B7H4 в связывание антител против B7H4 с использованием библиотеки аланинового сканирования B7H4

Создание библиотеки

Синтезировали библиотеку одного аланинового остатка B7H4 человека (Uniprot Q7Z7D3-1) (GeneArt), в которой все аминокислотные остатки во внеклеточном домене B7H4 человека были индивидуально мутированы в аланины, за исключением положений, содержащих аланины или цистеины. Цистеины не подвергали мутациям для того, чтобы свести к минимуму вероятность структурного разрушения антигена. Библиотеку клонировали в вектор экспрессии pMAC, содержащий кассету экспрессии CMV/TK-polyA, ген устойчивости к Amp и начало репликации pBR322.

Продукция и скрининг библиотеки

Антитела C1-N52S, C2 и C3 получали в виде рекомбинантных одновалентных антител, как описано в WO 2007059782, с меткой mNeonGreen. B7H4 дикого типа и аланиновые мутанты экспрессировали по отдельности в клетках FreeStyle HEK293 в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Scientific). Через сутки после трансфекции клетки собирали. Приблизительно 50000 клеток инкубировали с 20 мкл представляющего интерес антитела, меченного mNeoGreen. Клетки инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем добавляли 150 мкл буфера FACS и клетки дважды промывали буфером FACS. Клетки ресуспендировали в 30 мкл свежего буфера FACS и анализировали методом проточной цитометрии с использованием iQue Screener (Intellicyt Corporation, USA).

Весь эксперимент проводили 2 раза с двумя повторениями.

Анализ данных

Для каждого образца среднее связывание антитела на клетку определяли как среднее геометрическое интенсивности флуоресценции (gMFI) для клеточной популяции без гейтинга. На gMFI влияет аффинность антитела к мутанту B7H4 и уровень экспрессии мутанта B7H4 на клетку. Поскольку специфические мутации аланина могут влиять на уровень поверхностной экспрессии мутантного B7H4, а также для корректировки различий экспрессии для каждого мутанта B7H4 в целом, данные нормализовывали относительно интенсивности связывания B7H4-специфического эталонного антитела без перекрестного блокирования с использованием следующего уравнения:

$$\text{Нормализованный } gMFI_{aa \text{ положение}} = \frac{gMFI_{\text{Тестируемое Ab}}}{gMFI_{\text{Эталонное Ab}}}$$

в котором C2 использовали в качестве эталонного антитела для C1-N52S и C3, а C1-N52S использовали в качестве эталонного антитела для C2, и в котором «aa положение» относится либо к конкретному ala-мутанту B7H4, либо к B7H4 дикого типа (wt).

Для того, чтобы выразить потерю или усиление связывания антител по линейной шкале кратных изменений использовали следующее вычисление:

$$\text{Кратное изменение} = \text{Log}_{10} \left(\frac{\text{Нормализованная } gMFI_{ala \text{ мутант}}}{\text{Нормализованная } gMFI_{wt}} \right)$$

Усиление связывания в большинстве случаев вызвано потерей связывания эталонного антитела со специфическими мутантами ala.

После этих вычислений положения аминокислот, для которых при замене аминокислоты аланином не происходит потеря или усиление связывания конкретным антителом, дают результат «0», усиление связывания приводит к результату «> 0», а потеря

связывания приводит к результату «<0». Для того, чтобы скорректировать вариацию образца, только аминокислотные остатки В7Н4, для которых кратное изменение связывания было ниже среднего кратного изменения — $1,5 \times SD$, где SD представляет собой стандартное отклонение вычисленных кратных изменений для четырех независимых экспериментов для конкретного тестируемого антитела, считали «мутантами с потерей связывания».

В случае, если gMFI эталонного антитела для конкретного мутанта В7Н4 была ниже средней gMFI - $2,5 \times SD$ среднего gMFI_{Контрольное Ab}, данные исключали из анализа (как и для тех мутантов В7Н4, полагали, что уровни экспрессии являются недостаточными).

На фиг. 3 показано кратное изменение связывания антител против В7Н4 с вариантами В7Н4 с мутациями ala в ECD, с аминокислотными остатками, для которых кратное изменение связывания было ниже среднего кратного изменения — аннотировано $1,5 \times SD$. Кратное изменение показано на фиг. 3 как Z-оценка. Результаты показывают, что:

- связывание антитела C1-N52S по меньшей мере зависит от aa S151, V157, D158, Y159, E164, L166, W173, P175, P177, V179, W181, F199, M208, V210, T222, Y223, V240, E242 и I245, которые находятся в домене IgC В7Н4 человека,
- связывание антитела C2 по меньшей мере зависит от aa R98, G99, R116, K118, N119 и D124, которые находятся в IgV В7Н4 человека, и
- связывание антитела C3 по меньшей мере зависит от aa N156, E164, V217 и R248, которые находятся в домене IgC В7Н4 человека, и
- антитела C1-N52S, C2 и C3 распознают различные функциональные эпитопы на В7Н4.

Пример 8. Связывание В7Н4 моноспецифических и CD3×В7Н4 биспецифических антител с В7Н4 из различных видов

Сначала, с помощью проточной цитометрии анализировали связывание биспецифических антител против CD3×В7Н4 и моноспецифических антител против В7Н4 с клетками НЕК-293F, транзientно трансфицированными В7Н4 человека или В7Н4 яванского макака (*Macaca fascicularis*). Нетрансфицированные клетки НЕК-293F применяли в качестве отрицательного контроля, было (также) подтверждено, что эти клетки не экспрессируют CD3.

Клетки (3×10^4 клеток/лунка) инкубировали в полистироловых 96-луночных круглодонных планшетах (Greiner bio-one, № по кат. 650101) с серийными разведениями антител (диапазон от 0, 000458 до 30 мкг/мл с 4-кратными разведениями) в 100 мкл

PBS/0,1% BSA/0,02% азида (буфер окрашивания) при 4°C в течение 30 мин. Эксперименты проводили с двумя повторами. После двукратной промывки в буфере окрашивания клетки инкубировали в 50 мкл вторичного антитела при 4°C в течение 30 мин. В качестве вторичного антитела применяли R-фикоэритрин (PE)-конъюгированный козий античеловеческий IgG F(ab')₂ (1:500 в буфере FACS, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, № по кат. 109-116-098). Клетки дважды промывали в буфере окрашивания, ресуспендировали в 30 мкл буфера FACS, содержащего Топо-3 (разведение 1:10000), и анализировали на устройстве iQue Screener (Intellicyt Corporation, USA). Кривые связывания анализировали с использованием нелинейной регрессии (сигмоидальная зависимость ответа от дозы с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

На фиг. 4 показано, что оба IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR связываются с клетками, экспрессирующими B7H4 человека или B7H4 яванских макаков.

Затем определяли связывание с клетками HEK-293F, транзигентно трансфицированными B7H4 собаки, кролика, крысы, мыши или свиньи, как описано выше. На фиг. 5 показано, что IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR связываются с B7H4 собаки, кролика, крысы и мыши в разной степени, для каждого из которых кажущаяся аффинность (EC₅₀) bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR ниже, чем у IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR. bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR не способен связываться со B7H4 свиньи, в то время как IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR связывался слабо и только при самых высоких протестированных концентрациях антитела.

EC₅₀ для связывания с B7H4 человека и яванского макака для bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR находились в подобном диапазоне.

Подобные эксперименты проводили для сравнения связывания IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR, IgG1-B7H4-C3-FEAR, IgG1-B7H4-C4-FEAR, IgG1-B7H4-C2-FEAR и IgG1-B7H4-C5-FEAR с B7H4 из разных видов (человека, яванского макака, мыши, крысы, кролика, собаки и свиньи). На фиг. 6 показано, что связывание тестируемых антител с клетками HEK, трансфицированными B7H4 человека и яванского макака, было подобным. Аналогичные результаты были получены с клетками, экспрессирующими B7H4 кролика и собаки. Однако связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR с B7H4 мыши оказалось ниже по сравнению со связыванием IgG1-B7H4-C3-FEAR, IgG1-B7H4-C4-FEAR, IgG1-B7H4-C2-FEAR и IgG1-B7H4-C5-FEAR, что соответствует результатам в примере 3. Также связывание gG1-B7H4-

C1-N52S-FEAR и IgG1-B7H4-C3-FEAR с B7H4 крысы оказалось ниже по сравнению с IgG1-B7H4-C4-FEAR, IgG1-B7H4-C2-FEAR и IgG1-B7H4-C5-FEAR. Кроме того, в то время как IgG1-B7H4-C4-FEAR, IgG1-B7H4-C2-FEAR и IgG1-B7H4-C5-FEAR связывались с B7H4 свиньи, связывание IgG1-B7H4-C1-052S-FEAR было очень слабым и проявлялось только при самой высокой протестированной концентрации антител. Связывание IgG1-B7H4-C3-FEAR с B7H4 свиньи не обнаружили.

Пример 9. Связывание B7H4 моноспецифических антител и CD3×B7H4 биспецифических антител с экспрессирующими B7H4 линиями опухолевых клеток человека

Определяли связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR и/или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и/или bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR с экспрессирующими B7H4 линиями опухолевых клеток человека MCF-7 (аденокарцинома молочной железы, ATCC, № по кат. HTB-22), MDA-MB-468 (аденокарцинома молочной железы, ATCC, № по кат. HTB-132) и SK-BR3 (аденокарцинома молочной железы, ATCC, № по кат. HTB-30), и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR с B7H4-экспрессирующими линиями опухолевых клеток человека NIH-OVCAR-3 (аденокарцинома яичника, ATCC, № по кат. HTB-161) или HCC1954 (карцинома протоков молочной железы, ATCC, № по кат. CRL-2338). Кроме того, определяли связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, IgG1-B7H4-C2-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C2-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C2-FEAR, IgG1-B7H4-C3-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C3-FEAR, IgG1-B7H4-C4-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C4-FEAR, IgG1-B7H4-C5-FEAR, и/или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C5-FEAR с клетками MDA-MB-468 и HCC1954. Клеточные линии солидных опухолей, как правило, не экспрессируют CD3. В качестве отрицательного контроля использовали линию опухолевых клеток HeLa, которая не демонстрировала определяемую экспрессию B7H4 (аденокарцинома шейки матки, ATCC, № по кат. CCL-2). Связывание анализировали с помощью проточной цитометрии, как описано выше.

На фиг. 7 показано, что IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR продемонстрировали сопоставимое зависимое от дозы связывание с клетками MCF-7 и MDA-MB-468 с сопоставимыми максимальными уровнями связывания.

На фиг. 8 показано зависимое от дозы связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR с клетками NIH-OVCAR-3 и HCC1954 и отсутствие обнаруживаемого связывания с клеточной линией HeLa, не экспрессирующей B7H4.

Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR с B7H4-экспрессирующими опухолевыми клетками сравнивали с применением клеток MDA-MB-486 и SK-BR3. На фиг. 9 показано, что bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR продемонстрировали сопоставимое зависимое от дозы связывание с этими клетками с сопоставимыми максимальными уровнями связывания.

На фиг. 10 показано зависимое от дозы связывание антител против B7H4 C1-N52S, C2, C3, C4 и C5 в формате гомодимера или биспецифического антитела с клетками MDA-MB-468 и HCC1954. Антитела на основе C4 и C5 показали наиболее эффективное связывание, антитела на основе C1-N52S и C2 показали промежуточную эффективность связывания, а антитела на основе C3 показали самую низкую эффективность связывания. Максимальное связывание было сопоставимо между антителами на основе C1-N52S, C2, C4 и C5, но более низким для антител на основе C3.

Пример 10. Связывание антитела против B7H4 с первичными опухолевыми клетками

Первичные опухолевые клетки от пациента с раком яичника получали у Discovery Life Sciences (Huntsville, AL, USA, ID пациента 110045042). Связывание IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR с опухолевыми клетками оценивали с помощью проточной цитометрии: клетки высевали при 2×10^4 клеток/лунка в полистироловые 96-луночные круглодонные планшеты (Greiner bio-one, № по кат. 650180), центрифугировали и инкубировали с 50 мкл красителя Fixable Viability Stain FVS-BV510 (BD Biosciences, № по кат. 564406), разбавленного в PBS 1:1000, при 4°C в течение 30 мин. После промывки в буфере окрашивания клетки инкубировали с меченым FITC IgG1-B7H4-C1-N52S-FEAR и панелью антител, специфических в отношении CD3 (меченые EF450, eBioscience, № по кат. 48-0037-42), CD45 (меченые BV786, Biolegend, № по кат. 304048), CD14 (меченые PE-Cy7, BD Biosciences, № по кат. 557742), CD86 (меченые PerCP-Cy5.5, Biolegend, № по кат. 305420), CD163 (меченые APC-Cy7, Biolegend, № по кат. 333622) и EpCAM (меченые AF700, R&D системы, № по кат. FAB9601N), при 4°C в течение 30 мин. После промывки клетки ресуспендировали в буфере окрашивания и анализировали с использованием FACS Fortessa (BD Biosciences). Отдельные клетки отбирали на основе разброса FSC/SSC, а живые клетки идентифицировали путем исключения FVS-BV510-положительных клеток. Опухолевые клетки идентифицировали как EpCAM-положительные клетки.

Проточный цитометрический анализ показал, что IgG1-B7H4-N52S-FEAR связывается с EpCAM-позитивными живыми опухолевыми клетками, но не с моноцитами

или Т-клетками в суспензии диссоциированных опухолевых клеток образца рака яичника.

Пример 11. Индукция опосредованной Т-клетками цитотоксичности *in vitro* биспецифическими антителами против CD3×B7H4 с применением очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток при варьирующихся соотношениях эффектора и мишени

Для определения эффективности опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток в присутствии биспецифических антител bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR проводили анализ цитотоксичности *in vitro* с использованием B7H4-положительных опухолевых клеточных линий в качестве клеток-мишеней и очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток с различными соотношениями эффекторных клеток и клеток-мишеней (Е:Т).

Т-клетки были получены из лейкоцитарной пленки здоровой человека-донора (Sanquin, Амстердам, Нидерланды) и выделяли с использованием коктейля обогащения Т-клетками человека RosetteSep™ (Stemcell Technologies, Франция, № по кат. 15061) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки SK-BR3 (16000 клеток/лунку) высевали в плоскодонные 96-луночные планшеты (Greiner-bio-one, Нидерланды, № по кат. 655180) и оставляли для прикрепления на 4 часа при 37°C. Т-клетки добавляли к опухолевым клеткам при соотношении эффектора к мишени (Е:Т) 2:1, 4:1 или 8:1. Добавляли серийные разведения bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (конечная концентрация в диапазоне от 10000 до 0,0128 нг/мл, 5-кратные разведения) и планшеты инкубировали в течение 72 часов при 37°C. Планшеты промывали 3 раза PBS и клетки инкубировали с 150 мкл/лунка 10% раствора alamarBlue(r) (Invitrogen, № по кат. DAL1100) в течение 4 часов при 37°C. В качестве положительного контроля цитотоксичности клетки инкубировали с 16 мкг/мл фениларсиноксида (PAO, Sigma-Aldrich, № по кат. P3075, растворенный в диметилсульфоксиде [DMSO, Sigma-Adrich, № по кат. D2438]). Флуоресценцию AlamarBlue, как меру метаболической активности культур опухолевых клеток и, таким образом, жизнеспособных опухолевых клеток, измеряли при 615 нМ (OD615) на планшет-ридере EnVision (PerkinElmer). Поглощение образцов опухолевых клеток, обработанных PAO, принимали за 0% жизнеспособности, а поглощение образцов необработанных опухолевых клеток принимали за 100% жизнеспособности. «Процент жизнеспособных клеток» вычисляли следующим образом:

$$\% \text{ жизнеспособных клеток} = \frac{([\text{поглощение образца} - \text{поглощение клеток-мишеней, обработанных PAO}] / [\text{поглощение необработанных клеток-мишеней} - \text{поглощение клеток-мишеней,}$$

обработанных РАО)] $\times 100$.

Кривые зависимости ответа от дозы и значения IC₅₀ получали с использованием нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальная зависимость ответа от дозы с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

На фиг. 11 показано, что опосредованную Т-клетками цитотоксичность наблюдали при всех соотношениях Е:Т, при этом максимальное уничтожение опухолевых клеток (менее 10% жизнеспособных опухолевых клеток) наблюдали при соотношении Е:Т, равном 8:1.

Пример 12. Индукция цитотоксичности *in vitro* в различных линиях опухолевых клеток биспецифическими антителами против CD3 $\times$ B7H4 и корреляция с уровнем экспрессии B7H4.

Опосредованное Т-клетками уничтожение биспецифическими антителами bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ B7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEAL $\times$ B7H4-C1-N52S-FEAR различных линий опухолевых клеток, экспрессирующих B7H4, определяли в анализе цитотоксичности *in vitro* следующим образом: как описано выше, с использованием соотношения Е:Т 8:1. Использовали следующие клеточные линии: MCF-7, MDA-MB-486, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650. После каждой инкубации 150 мкл супернатантов, содержащих Т-клетки, переносили в 96-луночные культуральные планшеты с U-образным дном (CellStar, № по кат. 650180) перед промывкой и инкубацией с alamarBlue (для определения Т-клеточной активации и высвобождения цитокинов, как описано ниже).

Для этих линий опухолевых клеток экспрессию B7H4 количественно определяли с помощью количественной проточной цитометрии (калибратор человеческого IgG, BioCytex) в соответствии с инструкциями производителя, используя bsIgG1-huCD3-H101G-FEAL $\times$ B7H4-C1-N52S-FEAR для обнаружения B7H4.

На фиг. 12 показана зависимость от дозы опосредованная Т-клетками цитотоксичность, индуцированная *in vitro* как bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ B7H4-C1-N52S-FEAR, так и bsIgG1-huCD3-H101G-FEAL $\times$ B7H4-C1-N52S-FEAR в клетках MCF-7, MDA-MB-486, SK-BR3, NIH-OVCAR-3 и HCC1954. В то время как максимальная цитотоксическая активность (<10 % жизнеспособных опухолевых клеток) достигалась для обоих вариантов bsAb, для bsIgG1-huCD3-FEAL $\times$ B7H4-C1-N52S-FEAR она достигалась при более низких концентрациях по сравнению с bsIgG1-huCD3-H101G-FEAL $\times$ B7H4-C1-N52S-FEAR (Таблица 13).

Никакой существенной связи между лизисом опухолевых клеток и уровнем экспрессии B7H4 (фиг. 13A) не наблюдали ни для bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, ни для bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (фиг. 13B). На фиг. 13B показана IC50 опосредованного Т-клетками уничтожения с использованием Т-клеток, полученных от 4-6 доноров, в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, для каждой клеточной линии, причем клеточные линии ранжированы от самого низкого до самого высокого уровня экспрессии B7H4. Это означает, что опосредованное Т-клетками уничтожение может происходить в широком диапазоне уровней экспрессии B7H4.

В таблице 13 суммированы результаты для панели из 5 клеточных линий и 4 доноров.

Таблица 13. Индукция цитотоксичности *in vitro* в различных линиях опухолевых клеток биспецифическими антителами против CD3×B7H4.

Диапазон IC50 (4 донора на каждую клеточную линию) (мкг/мл)				
Клеточная линия	CD3-H101GXVB7H4		CD3×B7H4	
	самая низкая	самая высокая	самая низкая	самая высокая
MCF7	0,55	1,29	0,012	0,025
OVCAR3	0,09	1,629	0,003	0,012
NCI-H16650	1,67	5,07	N.D.	N.D.
MDA-MB-468	0,08	0,16	0,001	0,004
HCC1954	0,06	0,22	0,001	0,008
SK-BR3	0,09	0,22	0,002	0,016

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR также индуцировало зависимую от дозы опосредованную Т-клетками цитотоксичность в отношении тестируемой клеточной линии NCI-H1650 NSCLC.

Пример 13. Индукция Т-клеточной активации и продукция цитокинов *in vitro* биспецифическими антителами против CD3×B7H4 в присутствии B7H4-положительных опухолевых клеток

96-луночные культуральные планшеты с U-образным дном, содержащие супернатанты, собранные в ходе экспериментов по опосредованной Т-клетками

цитотоксичности *in vitro*, описанных в Примере 12, центрифугировали (300×g) в течение 3 мин при 4°C, после чего 75 мкл супернатанта переносили в новый планшет для измерения продукции цитокинов, а Т-клетки сохраняли для оценки Т-клеточной активации (описано ниже). Продукцию цитокинов анализировали с помощью мультиплексного анализа U-plex (MeSo Scale Discovery, USA, № по кат. K15049K) в соответствии с инструкциями производителя.

Т-клетки окрашивали маркерами Т-клеток CD3 (1:200, eBioscience, клон ОКТ3, конъюгированный с eFluor450), CD4 (1:50, eBioscience, клон ОКТ4, конъюгированный с APC-eFluor780), CD8 (1:100, Biolegend, клон RPA-T8, конъюгированный с AF700) и маркерами Т-клеточной активации CD69 (1:50, BD Biosciences, клон AB2439, конъюгированный с APC), CD25 (1:50, eBioscience, клон BC96, конъюгированный с PE-Cy7) и CD279/PD1 (1:50, Biolegend, клон EH12.2H7, конъюгированный с BV605). Отдельные окрашенные образцы с шариками Ultracomp (5 мкл, Invitrogen, № по кат. 01-2222-42) включали и использовали для корректировки компенсации проточного цитометра. Через 30 мин инкубации при 4°C планшеты трижды промывали раствором PBS/0,1% BSA/0,02% азида (буфер окрашивания). Клетки ресуспендировали в 120 мкл буфера окрашивания и анализировали с использованием FACS Fortessa (BD Biosciences). Данные обрабатывали с помощью FlowJo (BD Biosciences).

Значения EC50, EC90 и EC99 кривых зависимости ответа от дозы вычисляли с использованием нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальная зависимость ответа от дозы с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V7.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

На Фиг. 14А показана Т-клеточная активация в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR для B7H4-положительных опухолевых клеточных линий, как определено по экспрессии маркеров активации CD69 на Т-клетках CD8⁺ (определяют с помощью проточной цитометрии). На фиг. 14В показана EC50 Т-клеточной активации с использованием Т-клеток, полученных от 3-4 доноров, для каждой из линий опухолевых клеток.

В целом подмножество (приблизительно 20-50% при самой высокой концентрации антител) Т-клеток CD8⁺ активировалось в присутствии либо bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, либо bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR. Т-клеточная активация, индуцированная bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, в целом происходила при более высоких концентрациях, чем индуцированная bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (фиг. 14А). EC50 Т-клеточной активации для обоих биспецифических антител варьировалась между используемыми линиями клеток-мишеней

и между донорами (фиг. 14В).

Продукцию цитокинов оценивали в супернатантах культур опухолевых клеток и Т-клеток с помощью мультиплексного анализа ELISA Mesoscale Discovery U-plex. Из 10 цитокинов, проанализированных на панели клеточных линий с использованием Т-клеток от 4 доноров, значительное увеличение уровней цитокинов наблюдали в первую очередь для IFN-гамма и IL-8 (>2000 пг/мл). IL-4, IL-6 и IL-13 модулировались при гораздо более низких уровнях (<500 пг/мл), в то время как уровни IL-1бета, IL-2, IL-10, IL-12p70 и TNFальфа в целом были ниже 50 пг/мл. Поскольку изменения IFN-гамма были надежно и последовательно обнаружены, а IFN-гамма является одним из основных цитокинов, повышающихся в сыворотке пациентов с синдромом высвобождения цитокинов, представлены данные для этого цитокина.

На фиг. 15 показаны уровни IFN-гамма в супернатанте совместных культур Т-клеток и опухолевых клеток при концентрациях антител, которые индуцируют цитотоксичность, опосредованную Т-клетками, у 50%, 90% и 99% опухолевых клеток (EC50, EC90, EC99, соответственно) в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, с использованием Т-клеток от менее чем 3 доноров, проанализированных на клеточную линию. Уровни продукции цитокинов варьировались в зависимости от донора и линии опухолевых клеток-мишеней. Тем не менее, при концентрациях антител, которые индуцировали один и тот же уровень (%) уничтожения опухолевых клеток, в целом более низкие уровни продукции цитокинов наблюдали после воздействия на совместные культуры Т-клеток и опухолевых клеток bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR по сравнению с уровнями продукции цитокинов после воздействия bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR. Таким образом, при том же уровне уничтожения опухолевых клеток инкубация с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR приводила к более низкой продукции цитокинов, чем с bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR.

Пример 14. Доклинические исследования безопасности биспецифических антител против CD3×B7H4 у яванских макаков.

Доклинический профиль безопасности bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR оценивали на не относящихся к человеку приматах (яванские макаки, *Macaca fascicularis*, происходящих из Маврикия) из Citoxlab, Франция. Яванские макаки считаются единственными соответствующими видами для доклинических исследований безопасности на основе видовой специфичности плеч CD3 bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-

N52S-FEAR и, кроме того, из-за подобного связывания плеча B7H4 с B7H4 человека и яванского макака и других фармакологических данных. Эти исследования проводили в соответствии с ветеринарно-санитарными нормами (Директива Совета № 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г. и декрет Франции № 2013-118 от 1 февраля 2013 г. о защите животных, используемых в научных целях).

Целью исследований было определение потенциальной токсичности и токсикокинетики биспецифических антител против CD3×B7H4. В настоящем документе описаны только результаты токсикокинетики и определения уровней цитокинов в плазме.

В двух отдельных исследованиях животных обрабатывали однократной дозой 0,1, 1, 3 или 10 мг/кг bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR или bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR (одна самка животного на дозу) путем внутривенной (IV) инфузии. День инфузии обозначали как День 1 в исследовании. Образцы крови собирали дважды перед введением дозы и через 0,5 часа, 2 часа, 4 часа, 12 часов, 24 часа и 48 часов после введения дозы для оценки токсикокинетического профиля и уровней цитокинов в плазме, а также дополнительно через 168, 336 и 504 часа после введения дозы для оценки токсикокинетики.

Уровни цитокинов

Образцы плазмы анализировали на уровни цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IL-12p70, IL-15 и CCL2/MCP1) с использованием методики Luminex xMAP.

Введение BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR яванским макакам вызывало лишь незначительные изменения уровней цитокинов в плазме, которые считали не связанными с тестируемым соединением, тогда как введение bsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR приводило к зависимому от дозы повышению уровней IL-6 и MCP-1, как показано на фиг. 16.

Более низкие уровни цитокинов, полученные после обработки биспецифическим антителом BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, по сравнению с BsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR, могут иметь преимущество в клинических условиях.

Токсикокинетика

Концентрации в плазме биспецифических антител против CD3×B7H4 определяли с использованием общего способа IgG PK ECLIA. Токсикокинетические параметры оценивали с использованием фармакокинетического программного обеспечения Certara Phoenix WinNonlin версии 8.1 с использованием некомпартментального подхода,

соответствующего внутривенному инфузионному способу введения. На фиг. 17 показано, что токсикокинетические профили обоих биспецифических антител против CD3×B7H4 были в высокой степени сопоставимы до 7 дней после введения дозы, причем в обоих случаях экспозиция в плазме зависит от дозы.

Проводили фармакокинетическое моделирование для того, чтобы оценить, будет ли предполагаемый диапазон клинических доз, требуемый для варианта BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR с более низкой аффинностью в отношении CD3, недопустимо высоким. Использовали РК-модель, основанную на наблюдениях за яванскими макаками. Получали диапазон клинических доз, который, как ожидается, приводит к средней экспозиции в плазме в течение одной недели, равной от EC50 до EC90 для опосредованного Т-клетками уничтожения клеток, как наблюдали *in vitro*. Полученный диапазон доз считался допустимым, и этот аспект не давал оснований *a priori* отдавать предпочтение одному типу биспецифического антитела перед другим (BsIgG1-huCD3-H101G-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR по сравнению BsIgG1-huCD3-FEALxB7H4-C1-N52S-FEAR).

Пример 15. Экспрессия B7H4 при различных показаниях рака человека

Уровни мРНК B7H4 извлекали из базы данных Omicsoft TCGA и визуализировали с помощью программного обеспечения Oncoland (Qiagen, USA).

На фиг. 18 показаны уровни экспрессии мРНК B7H4 в ряде первичных солидных опухолей, ранжированные по медиане экспрессии. Экспрессия мРНК была обнаружена в широком диапазоне показаний рака и варьировалась в пределах каждого показания, при этом самая высокая медианная экспрессия обнаружена при карциносаркоме матки (UCS), уротелиальной карциноме мочевого пузыря (BLCA), аденокарциноме поджелудочной железы (PAAD), плоскоклеточной карциноме легкого (LUSC), инвазивной карциноме молочной железы (BRCA), карциноме тела матки и эндометрия (UCEC), серозной цистаденокарциноме яичника (OV) и холангиокарциноме (CHOL).

Экспрессия белка B7H4 при раке толстой кишки, легкого (мелкоклеточный рак легкого, SCLC и немелкоклеточный рак легкого, NSCLC), желудка, поджелудочной железы, мочевого пузыря, шейки матки, головы и шеи, молочной железы (включая тройной негативный рак молочной железы, TNBC), яичника, пищевода, почек, предстательной железы и матки, а также холангиокарциноме анализировали с помощью иммуногистохимии (ИHC) на тканевых микроматрицах (ТМА, все приобретены у BioMax). Перед окрашиванием свежесрезанные срезы ТМА (5 мкм) депарафинизировали и инкубировали с раствором Target Retrieval Solution pH9 (DAKO, S2367, 30 мин при 97°C, 60 мин охлаждение). ИHC

В7Н4 выполняли с использованием коммерческих кроличьих моноклональных антител против В7-Н4 человека (клон D1M8I, #14572, Cell Signaling Technologies) при оптимальном разведении (1:25, конечная концентрация 2,6 мкг/мл) в течение 30 мин (комнатная температура) на платформе автостейнера LabVision. Затем срезы инкубировали с полимером против кроличьего IgG (Envision™ FLEX+ Rabbit (DAKO, S2022), промывали и инкубировали с хромогенной системой DAKO Liquid DAB+ Substrate (DAKO, K3468). Гематоксилин (DAKO, S3301) использовали для обнаружения клеток с образовавшимся ядром. ИНС цитокератина (для определения представляющей интерес области опухоли, ROI) выполняли со смесью мышиных антител против цитокератина (клоны AE1/AE3) на Ventana Benchmark с использованием обнаружения OptiView. Цитокератин визуализировали с помощью DAB, а ядра контрастировали гематоксилином с использованием стандартных реагентов Ventana. Окрашенные срезы ТМА оцифровывали с 20-кратным увеличением на AxioScan (Zeiss). Первоначально проводили неавтоматическую оценку для определения средней интенсивности окрашивания В7Н4 (отрицательное-низкое-среднее-высокое) и процента опухолевых центров с >10% В7Н4-положительных опухолевых клеток.

Затем проводили автоматический подсчет. ROI опухоли определяли с использованием цитокератиновой маски на срезах ТМА, смежных с участками, окрашенными по В7Н4. Интенсивность окрашивания В7Н4 в ROI опухоли определяли количественно (отрицательная, слабая (1), умеренная (2) или сильная (3), и процент В7Н4 - положительных опухолевых клеток (диапазон 0–100%) определяли с использованием программного обеспечения для анализа изображений HALO. Для каждого показания определяли процент опухолевых центров с >10% В7Н4-положительных опухолевых клеток.

В таблице 14 показана экспрессия белка В7Н4, определенная с помощью ИНС-анализа ТМА BioMax. В образцах рака толстой кишки, предстательной железы, почки и мелкоклеточного рака легких наблюдали отсутствие или очень низкую экспрессию В7Н4. В образцах других показаний экспрессия В7Н4 варьировала, при этом повышение экспрессии В7Н4 обнаруживали при раке желудка, раке поджелудочной железы, холангиокарциноме, раке пищевода, раке мочевого пузыря, немелкоклеточном раке легкого (в частности, плоскоклеточном раке легкого), раке шейки матки, раке головы и шеи, раке молочной железы (тройной негативный рак молочной железы [TNBC] и не-TNBC), раке яичников и раке матки.

Таблица 14. Экспрессия белка В7Н4, определенная с помощью ИНС-анализа ТМА

BioMax. ND = не определено.

		Неавтоматическая оценка		Автоматическая оценка
Показание (BioMax TMA)		>10 % В7Н4 положительных (любая интенсивность, по визуальной оценке)	Интенсивность окрашивания	>10 % В7Н4 положительных (1+ и выше, согласно цифровому анализу изображений)
Рак толстой кишки (n=64)		0%	Отрицательная	
Рак легкого	SCLC (n=60)	1%	Отрицательная - Низкая	
NSCLC	AC (n=82)	17%	Низкая	ND
	SQCC (n=95)	48%	Средняя	ND
Рак желудка (n=90)		17%	Низкая	
Рак поджелудочной железы (n=60)		25%	Низкая	ND
Холангиокарцинома (n=98)		31%	Низкая	16%
Рак мочевого пузыря (n=60)		43%	Низкая -Средняя	25%
Рак шейки матки (n=60)		52%	Низкая -Средняя	27%
Рак головы и шеи (n=92)		47%	Низкая -Средняя	23%

Рак молоч- ной железы	все (n=232)	78%	Средняя- Высокая	72%
	TNBC (n= 35)	89%	Средняя- Высокая	ND
Рак яичника (n=74)		82%	Средняя- Высокая	68%
Рак матки (n=73)		82%	Средняя- Высокая	75%
Рак пищевода (n= 53)		36%	Низкая	ND
Рак почки (n = 83)		9%	Отрицательная	ND
Рак предстательной железы (n= 57)		1%	Отрицательная	ND

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с В7Н4 человека, и антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где указанные антигенсвязывающие области содержат переменные области тяжелой и легкой цепи, где указанные переменные области тяжелой и легкой цепи являются гуманизированными и/или человеческими.

2. Антитело по п. 1, которое представляет собой биспецифическое антитело.

3. Антитело по п. 1 или 2, где указанное антитело способно связываться с раковыми клетками или Т-клетками.

4. Антитело по любому из пп. 1-3, где указанные раковые клетки экспрессируют указанный В7Н4 человека.

5. Антитело по п. 3 или 4, где указанные раковые клетки относятся к солидной опухоли.

6. Антитело по любому из пп. 1-5, где указанное антитело способно вызывать опосредованное Т-клетками уничтожение клеток.

7. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, способна связываться с CD3ε (эпсилон) человека, как например, с CD3ε (эпсилон) человека согласно SEQ ID NO: 13.

8. Антитело по любому из пп. 1-7, где антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO. 17,

и

переменную область легкой цепи (VL), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности SEQ ID NO: 22.

9. Антитело по любому из пп. 1-7, где антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO.: 18, 19 и 20 или 18, 19 и 21, соответственно,

и

переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 23, GTN и 24, соответственно.

10. Антитело по любому из пп. 1-7, где антигенсвязывающая область, которая

связывается с CD3, содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 16, или последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 16,

и

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность согласно SEQ ID NO: 22, или последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% идентичную последовательности согласно SEQ ID NO: 22.

11. Антитело по любому из пп. 7 - 10, где равновесная константа диссоциации K_D между антигенсвязывающей областью, которая связывается с CD3, и CD3 находится в диапазоне 1 – 100 нМ, таком как в диапазоне 5 – 100 нМ, в диапазоне 10 – 100 нМ, в диапазоне 1 – 80 нМ, в диапазоне 1 – 60 нМ, в диапазоне 1 – 40 нМ, в диапазоне 1 – 20 нМ, в диапазоне 5 – 80 нМ, в диапазоне 5 – 60 нМ, в диапазоне 5 – 40 нМ, в диапазоне 5 – 20 нМ, в диапазоне 10 – 80 нМ, в диапазоне 10 – 60 нМ, в диапазоне 10 – 40 нМ, или таком как в диапазоне 10 – 20 нМ.

12. Антитело по любому из пп. 7 - 10, где указанное антитело имеет более низкую аффинность связывания для CD3ε человека, чем антитело, имеющее антигенсвязывающую область, содержащую последовательность VH согласно SEQ ID NO: 16 и последовательность VL согласно SEQ ID NO: 22, предпочтительно где указанная аффинность в по меньшей мере 5 раз ниже, такая как по меньшей мере в 10 раз ниже, например, по меньшей мере 20 раз ниже, по меньшей мере 30 раз ниже, по меньшей мере 40 раз ниже, по меньшей мере 45 раз ниже или такая как по меньшей мере в 50 раз ниже.

13. Антитело по любому из пп. 7 - 10, где указанная антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, имеет равновесную константу диссоциации K_D , которая находится в диапазоне 200 – 1000 нМ, такая как в диапазоне 300 – 1000 нМ, в диапазоне 400 – 1000 нМ, в диапазоне 500 – 1000 нМ, в диапазоне 300 – 900 нМ в диапазоне 400 – 900 нМ, в диапазоне 400 – 700 нМ, в диапазоне 500 – 900 нМ, в диапазоне 500 – 800 нМ, в диапазоне 500 – 700 нМ, в диапазоне 600 – 1000 нМ, в диапазоне 600 – 900 нМ, в диапазоне 600 – 800 нМ или такая как в диапазоне 600 – 700 нМ.

14. Антитело по любому из пп. 11 - 13, где

антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность CDR1, последовательность CDR2 и последовательность CDR3,

вариабельная область тяжелой цепи (VH), которая по сравнению с вариабельной областью тяжелой цепи (VH), содержащей последовательность согласно SEQ ID NO: 16, имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из T31, N57, H101, G105, S110 и Y114, причем положения пронумерованы согласно последовательности SEQ ID NO: 16, и

вариабельная область легкой цепи (VL) дикого типа содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно SEQ ID NO: 23, GTN и SEQ ID NO: 24, соответственно.

15. Антитело по п. 14, где антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит в вариабельной области тяжелой цепи (VH) замену, выбранную из группы, состоящей из: T31M, T31P, N57E, H101G, H101N, G105P, S110A, S110G, Y114M, Y114R, Y114V.

16. Антитело по любому из пп. 8-10, где CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3, содержат в общем самое большее 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен по сравнению с CDR1, CDR2 и CDR3 последовательностей согласно SEQ ID NO: 16, причем указанные аминокислотные замены содержат предпочтительно аминокислотные замены, как определено в п. 14 или п. 15.

17. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанный B7H4 человека представляет собой B7H4 человека согласно SEQ ID NO. 1.

18. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, способна связываться с внеклеточным доменом B7H4 человека.

19. Антитело по п. 17 или 18, где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, способна связываться с IgC-подобной константной областью B7H4 человека.

20. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, способна связываться с B7H3-IgV/B7H4-IgC, имеющим последовательность согласно SEQ ID NO. 11.

21. Антитело по п. 20, где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, не способна связываться с B7H4-IgV/B7H3-IgC, имеющим последовательность согласно SEQ ID NO. 10.

22. Антитело по любому из пп. 17-20, где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, содержит:

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 25, и вариабельную область легкой цепи,

содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

b) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 29, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

c) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 36, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 40,

d) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 43, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 47,

e) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 50, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO.54, или

f) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 31, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

g) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 65, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 69.

23. Антитело по любому из пп. 17-20, где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, содержит:

a) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 27 и 28, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35,

b) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 30 и 28, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3,

соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35,

с) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 37, 38 и 39, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 41, DTS и SEQ ID NO. 42,

d) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 44, 45 и 46, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 48, YTS и SEQ ID NO. 49,

е) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 51, 52 и 53, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 55, GAS и SEQ ID NO. 56, или

f) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 32 и 28, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35,

g) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 66, 67 и 68, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 70, GAS и SEQ ID NO. 71.

24. Антитело по любому из пп. 17-20, где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, содержит:

a) варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 25, и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

b) варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 29, и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

с) варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 36, и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 40,

d) варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 43, и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 47,

е) варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 50, и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 54, или

f) варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID

NO. 29, и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33, g) варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 65, и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 69.

25. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, имеет аффинность связывания, которая соответствует значению K_D $5E-7$ М или менее, такая как $1E-7$ М или менее, такая как аффинность связывания, соответствующую значению K_D , которое находится в диапазоне от $5E-7$ до $2E-10$ М, такая как в диапазоне от $2E-7$ до $1E-10$ М или от $1E-7$ до $5E-9$ М.

26. Антитело по п. 25, где аффинность связывания определена посредством биослойной интерферометрии, необязательно согласно Примеру 3 в настоящем документе.

27. Антитело по любому из пп. 25 и 26, где аффинность связывания определена посредством биослойной интерферометрии, предусматривающей стадии:

I) иммобилизации антитела в количестве 1 мкг/мл в течение 600 секунд на биосенсоре Capture против Fc IgG человека,

II) определения ассоциации в течение периода времени 300 секунд и диссоциации в течение периода времени 1000 секунд рекомбинантного белка B7H4 человека с меткой His (Sino Biological № по кат. 10738-H08H; белка, экспрессируемого из конструкции последовательности ДНК, кодирующей VTCN1 человека (Uniprot № доступа Q7Z7D3) (Phe29-Ala258) с С-концевой полигистидиновой меткой) с использованием 2-кратной серии разведений в интервале от 1,56 нМ до 100 нМ,

III) ссылки на данные буферного контроля (0 нМ).

28. Антитело по любому из пп. 25 - 27, где аффинность связывания определена с применением антитела, как определено в любом из предшествующих пунктов, которое представляет собой моноспецифическое двухвалентное антитело, такое как антитело, которое представляет собой полноразмерный IgG1.

29. Антитело по любому из пп. 1-28, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4 человека, причем указанная антигенсвязывающая область способна к перекрестному блокированию

антитела, содержащего варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 29 и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33, и

антитела, содержащего варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 36 и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 40, и

где указанная антигенсвязывающая область не способна к перекрестному блокированию

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 43 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 47,

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 50 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 54, и

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 65 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 69.

30. Антитело по любому из пп. 1-28, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4 человека, причем указанная антигенсвязывающая область способна к перекрестному блокированию

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 43 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 47,

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 50 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 54, и

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 65 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 69,

и где указанная антигенсвязывающая область не способна к перекрестному блокированию

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 29 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33 и

антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 36 и переменную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 40.

31. Антитело по п. 29 или 30, где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, способна связываться с B7H3-IgV/B7H4-IgC согласно SEQ ID NO. 11 и не способна связываться с B7H4-IgV/B7H3-IgC согласно SEQ ID NO. 10.

32. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где каждая

антигенсвязывающая область содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), и где каждая указанная вариабельная область содержит три CDR последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно.

33. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где

с) антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4, является человеческой, и

d) антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, является гуманизированной.

34. Антитело по любому из пп. 1-32, где

с) антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4, является человеческой, и/или

d) антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, является гуманизированной.

35. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело содержит две константные области тяжелой цепи (CH) и две константные области легкой цепи (CL).

36. Антитело по п. 35, где два константных домена тяжелой цепи и две константные области легкой цепи имеют человеческое происхождение.

37. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело представляет собой полноразмерное антитело.

38. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где антитело относится к изотипу IgG1.

39. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, каждая из указанной первой и второй тяжелой цепи содержит по меньшей мере шарнирную область, область CH2 и CH3, где в указанной первой тяжелой цепи по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, была заменена, и в указанной второй тяжелой цепи по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, была заменена, где указанные замены указанной первой и указанной второй тяжелых цепей не находятся в одинаковых положениях, и где положения аминокислот пронумерованы согласно нумерации Eu.

40. Антитело по п. 39, где аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи IgG1 человека, представляет собой R в указанной первой тяжелой цепи, и

аминокислота в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи IgG1 человека, представляет собой L в указанной второй тяжелой цепи, или наоборот.

41. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело содержит первую и необязательно вторую тяжелую цепь, и где первая тяжелая цепь и, если присутствует, вторая тяжелая цепь модифицирована/модифицированы таким образом, что антитело вызывает Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени относительно идентичного немодифицированного антитела.

42. Антитело по п. 41, где антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, и где в обеих первой и второй тяжелых цепях аминокислотные остатки в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации Eu, представляют собой F и E, соответственно.

43. Антитело по п. 41 или 42, где антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, и где в обеих первой и второй тяжелых цепях аминокислотный остаток в положении, соответствующем положению D265 в тяжелой цепи IgG1 человека согласно нумерации Eu, представляет собой A.

44. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело содержит легкую цепь каппа (κ).

45. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело содержит легкую цепь лямбда (λ).

46. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело содержит легкую цепь лямбда (λ) и легкую цепь каппа (κ), например, антитело с тяжелой цепью и легкой цепью лямбда, которые содержат связывающую область, способную связываться с CD3, и тяжелой цепью и легкой цепью каппа, которые содержат связывающую область, способную связываться с B7H4.

47. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с B7H4 человека, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи каппа, и где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3 человека, содержится в тяжелой цепи и легкой цепи, причем указанная тяжелая цепь содержит указанную область VH и константную область тяжелой цепи IgG1, и указанная легкая цепь содержит указанную область VL и константную область легкой цепи лямбда.

48. Антитело по п. 47, где одна константная область тяжелой цепи IgG1 является такой, как определено в SEQ ID NO. 60, а другая является такой, как определено в SEQ ID

NO. 61, и где указанная константная область легкой цепи каппа является такой, как определено в SEQ ID NO. 63, и указанная константная область легкой цепи лямбда является такой, как определено в SEQ ID NO. 64.

49. Антитело по п. 48, где в указанных константных областях тяжелой цепи IgG1, как определено в SEQ ID NO. 60 и 61, удалены их концевые лизины.

50. Антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело не имеет или имеет пониженную Fc-опосредованную эффекторную функцию, и антитело:

a) способно связываться с B7H4-экспрессирующими человеческими опухолевыми клетками так, как описано в Примерах 9 и 10 в настоящем документе,

b) опосредует зависимость от концентрации цитотоксичность в B7H4-экспрессирующих человеческих опухолевых клетках, при применении, например, РВМС или Т-клеток в качестве эффекторных клеток при анализе, как описано в Примерах 11 и 12 в настоящем документе,

c) способно опосредовать зависимость от концентрации цитотоксичность в одной или более линиях B7H4 человека-экспрессирующих опухолевых клеток, выбранных из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650, при применении, например, РВМС или Т-клеток в качестве эффекторных клеток при анализе, как описано в Примерах 11 и 12 в настоящем документе,

d) способно активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии B7H4-экспрессирующих человеческих опухолевых клеток, например, при анализе, как описано в Примере 13 в настоящем документе,

e) способно активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии одной или более линий B7H4 человека-экспрессирующих опухолевых клеток, выбранных из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650, например, при анализе, как описано в Примере 13 в настоящем документе,

f) способно индуцировать цитотоксичность B7H4-экспрессирующих человеческих опухолевых клеток, например, при анализе, как описано в Примерах 11 и 12 в настоящем документе, и/или

g) способно индуцировать опосредованную Т-клетками цитотоксичность в одной или более линиях B7H4 человека-экспрессирующих опухолевых клеток, выбранных из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650, например, при анализе, как описано в Примерах 11 и 12 в настоящем документе.

51. Антитело по п. 47, где антитело имеет IC₅₀ в диапазоне 0,001-5 микрограмм/мл, где IC₅₀ определяют посредством *in vitro* анализа цитотоксичности, предусматривающего стадии:

- i) предоставления выделенных моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) или очищенных Т-клеток из лейкоцитарной пленки здорового человека-донора,
 - ii) предоставления В7Н4-экспрессирующих опухолевых клеток,
 - iii) объединения PBMC или очищенных Т-клеток и линии В7Н4 человека-экспрессирующих опухолевых клеток, выбранной из группы, состоящей из MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR3, NIH-OVCAR-3, HCC1954 и NCI-H1650, во множестве образцов, где соотношение числа Т-клеток из указанных PBMC или очищенных Т-клеток и выбранной опухолевой клетки составляет 8:1,
 - iv) предоставления указанного антитела в серии разведений в указанные образцы в интервале, например, от 0.0128 нг/мл до 10000 нг/мл и
 - v) инкубации образцов, например, в течение 72 часов при 37°C, а затем
 - vi) оценки жизнеспособности В7Н4-экспрессирующих опухолевых клеток,
 - vii) определения процента жизнеспособных клеток для каждого образца разведения
- и
- viii) определения IC50.

52. Антитело по п. 48, где IC50 находится в диапазоне 0,001 - 0,03 микрограмм/мл.

53. Антитело по п. 48, где IC50 находится в диапазоне 0,05 – 5 микрограмм/мл.

54. Антитело, содержащее антигенсвязывающую область, способную связываться с В7Н4 человека, где указанная антигенсвязывающая область, способная связываться с В7Н4 человека, содержит:

a) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 25, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

b) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности согласно SEQ ID NO. 29, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательности согласно SEQ ID NO. 33,

c) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 27 и 28, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35,

d) варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO.: 26, 30 и 28, и варибельную область легкой цепи, содержащую области CDR1, CDR2 и CDR3,

соответственно, последовательностей согласно SEQ ID NO. 34, GAS и SEQ ID NO. 35,

е) варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 25 и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33, или

ф) варибельную область тяжелой цепи (VH) последовательности согласно SEQ ID NO. 29 и варибельную область легкой цепи последовательности согласно SEQ ID NO. 33.

55. Антитело по п. 54, где указанное антитело представляет собой моноспецифическое антитело.

56. Антитело по п. 54 или 55, где указанное антитело представляет собой двухвалентное антитело.

57. Антитело по п. 56, где антитело представляет собой биспецифическое антитело, содержащее дополнительную антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, где предпочтительно указанная дополнительная антигенсвязывающая область, способная связываться с CD3, представляет собой антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3 человека, как определено в любом из пп. 7-16.

58. Композиция, содержащая антитело, как определено в любом из пп. 1 - 57.

59. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, как определено в любом из пп. 1 - 58, и фармацевтически приемлемый носитель.

60. Антитело, как определено в любом из пп. 1 – 57, для применения в качестве лекарственного средства.

61. Антитело для применения в качестве лекарственного средства по п. 60 для применения для лечения заболевания.

62. Антитело для применения в качестве лекарственного средства по п. 61, где заболеванием является рак.

63. Антитело для применения в качестве лекарственного средства по п. 62, где рак характеризуется экспрессией B7H4 в раковых клетках.

64. Антитело для применения в качестве лекарственного средства для применения по п. 63, где указанную экспрессию B7H4 определяют в раковых клетках, полученных у пациента.

65. Антитело для применения в качестве лекарственного средства по любому из пп. 62 – 64, где раком является солидная опухоль.

66. Антитело для применения по любому из пп. 62 - 65, где рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, NSCLC (ADC или SQCC), рака желудка, рака поджелудочной железы, холангиокарциномы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака молочной железы, рака яичников и рака матки.

67. Способ лечения заболевания, причем способ предусматривает введение антитела по любому из пп. 1 - 57, композиции по п. 58 или фармацевтической композиции по п. 59, субъекту, нуждающемуся в этом.

68. Способ по п. 67, причем указанный способ предназначен для лечения рака.

69. Способ по п. 68, где рак выбран из группы, состоящей из карциномы матки (UCS), уротелиальной карциномы мочевого пузыря (BLCA), аденокарциномы поджелудочной железы (PAAD), плоскоклеточной карциномы легкого (LUSC), инвазивной карциномы молочной железы (BRCA), карциномы тела матки и эндометрия (UCEC), серозной цистаденокарциномы яичника (OV) и холангиокарциномы (CHOL).

70. Нуклеиновая кислота, содержащая:

a) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающей области, способной связываться с B7H4, как определено в п. 54, и/или

b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую соответствующую последовательность вариабельной области легкой цепи указанной антигенсвязывающей области, способной связываться с B7H4, как определено в п. 54.

71. Одна или более нуклеиновых кислот, содержащие

a) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4, как определено в любом из пп. 22-24,

b) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую соответствующую последовательность легкой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающую область, способную связываться с B7H4, как определено в любом из пп. 22-24,

c) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в любом из пп. 8-10, и

d) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую соответствующую последовательность легкой цепи антитела, содержащего указанную антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в любом из пп. 8-10.

72. Нуклеиновая кислота или одна или более нуклеиновых кислот по п. 70 или 71, где указанная нуклеиновая кислота представляет собой РНК или ДНК.

73. Нуклеиновая кислота или одна или более нуклеиновых кислот по любому из пп. 70 - 72 для применения для экспрессии в клетках млекопитающих.

74. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту или содержащая одну или более нуклеиновых кислот по любому из пп. 70-73.

75. Клетка по п. 74, где указанная клетка имеет происхождение из человека, как например, эмбриональная клетка почки человека (НЕК), как например, клетка НЕК/Ехрі, или имеет происхождение из грызунов, как например, клетка яичника китайского хомячка, как например, клетка СНО/Н50.

76. Способ получения антитела, способного связываться как с В7Н4, так и с CD3, по любому из пп. 1 - 53, предусматривающий стадии:

а) предоставления антитела, способного связываться с В7Н4, причем указанное антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с В7Н4, как определено в любом из пп. 1 - 6 и 17 - 34,

б) предоставления антитела, способного связываться с CD3, причем указанное антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с CD3, как определено в любом из пп. 1 - 16 и 32 - 34,

с) инкубации указанного антитела, способного связываться с В7Н4, вместе с указанным антителом, способным связываться с CD3, при восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы цистеины в шарнирной области подвергались изомеризации дисульфидной связи, и

д) получения указанного антитела, способного связываться с В7Н4 и CD3.

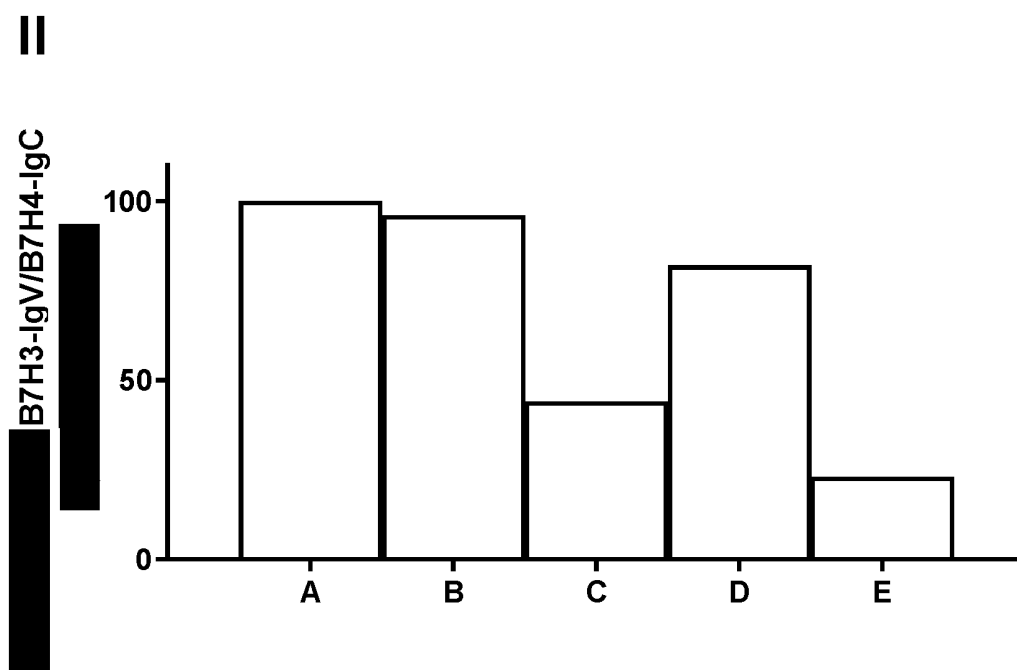
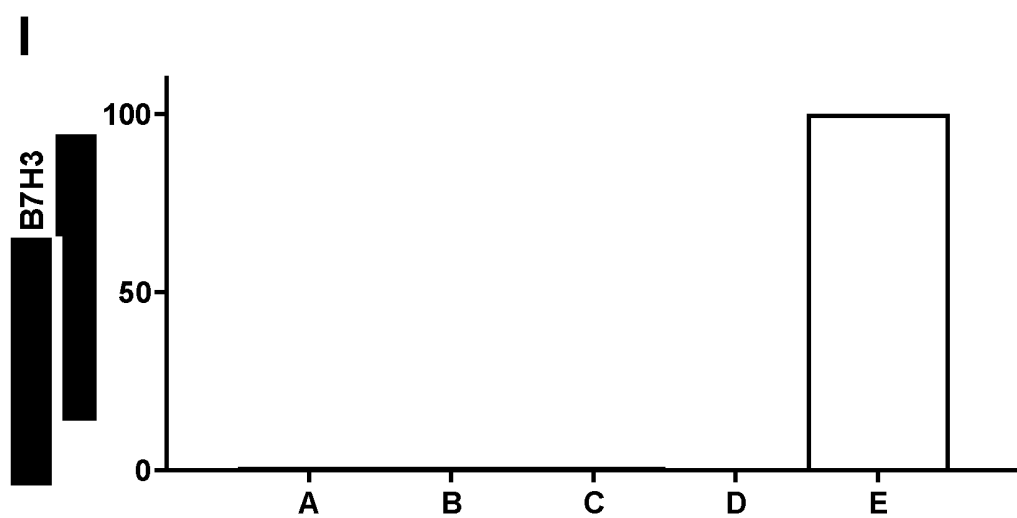
77. Способ получения антитела, способного связываться как с В7Н4, так и с CD3, по п. 76, где стадии а) и/или б) предусматривают:

- предоставление клеток, содержащих вектора экспрессии, для продукции указанного антитела или указанных антител и

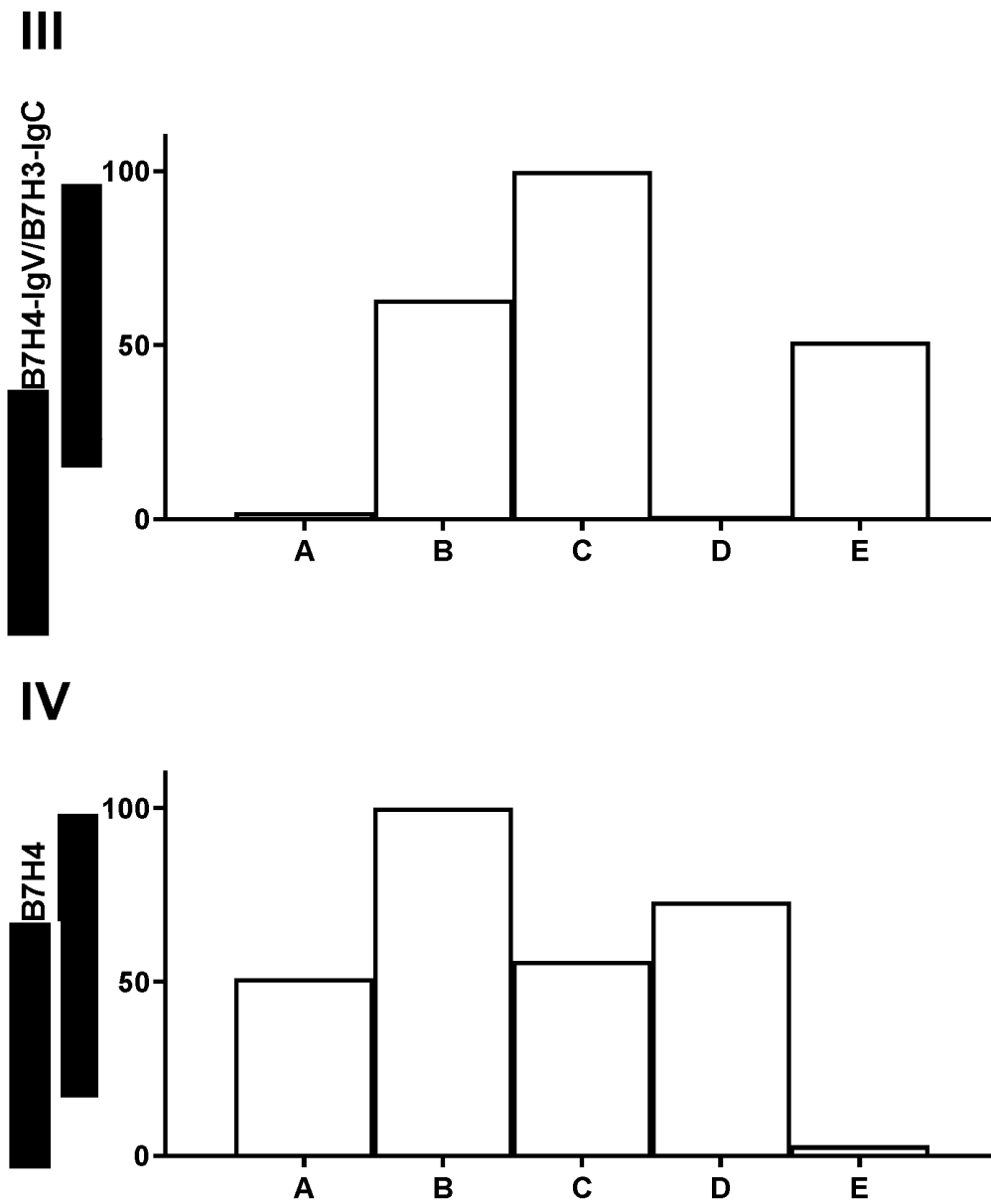
- обеспечение продукции указанного антитела или указанных антител клетками, а затем

- получение указанного антитела или указанных антител, с предоставлением таким образом указанного антитела или указанных антител.

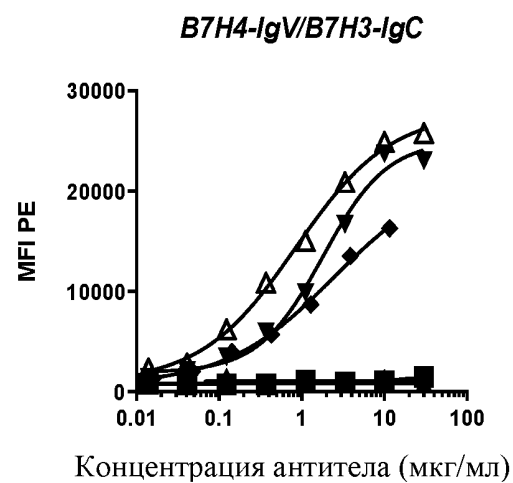
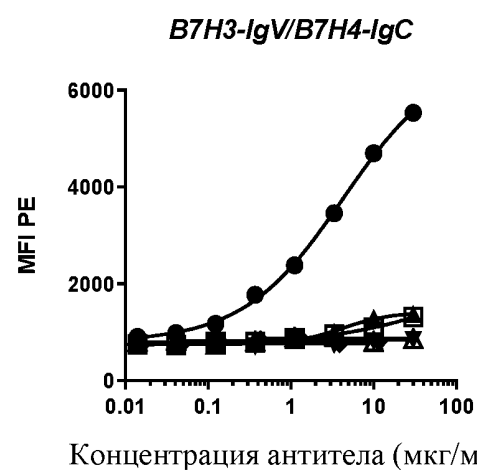
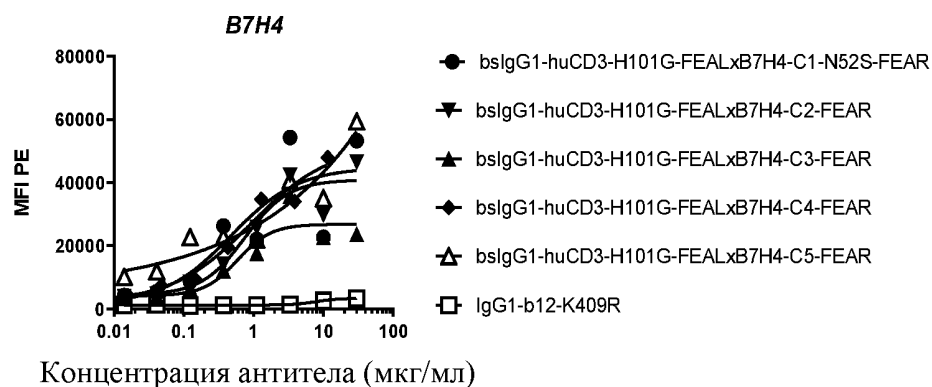
78. Набор из частей, такой как набор для применения в качестве сопутствующей диагностики/для идентификации в популяции пациентов тех пациентов, которые имеют склонность к ответу на лечение антителом, как определено в любом из пп. 1 - 57, содержащий антитело, как определено в любом из пп. 1 и 57, и инструкции по применению указанного набора.



Фиг. 1



Фиг. 1 (продолжение)



Фиг. 2

A

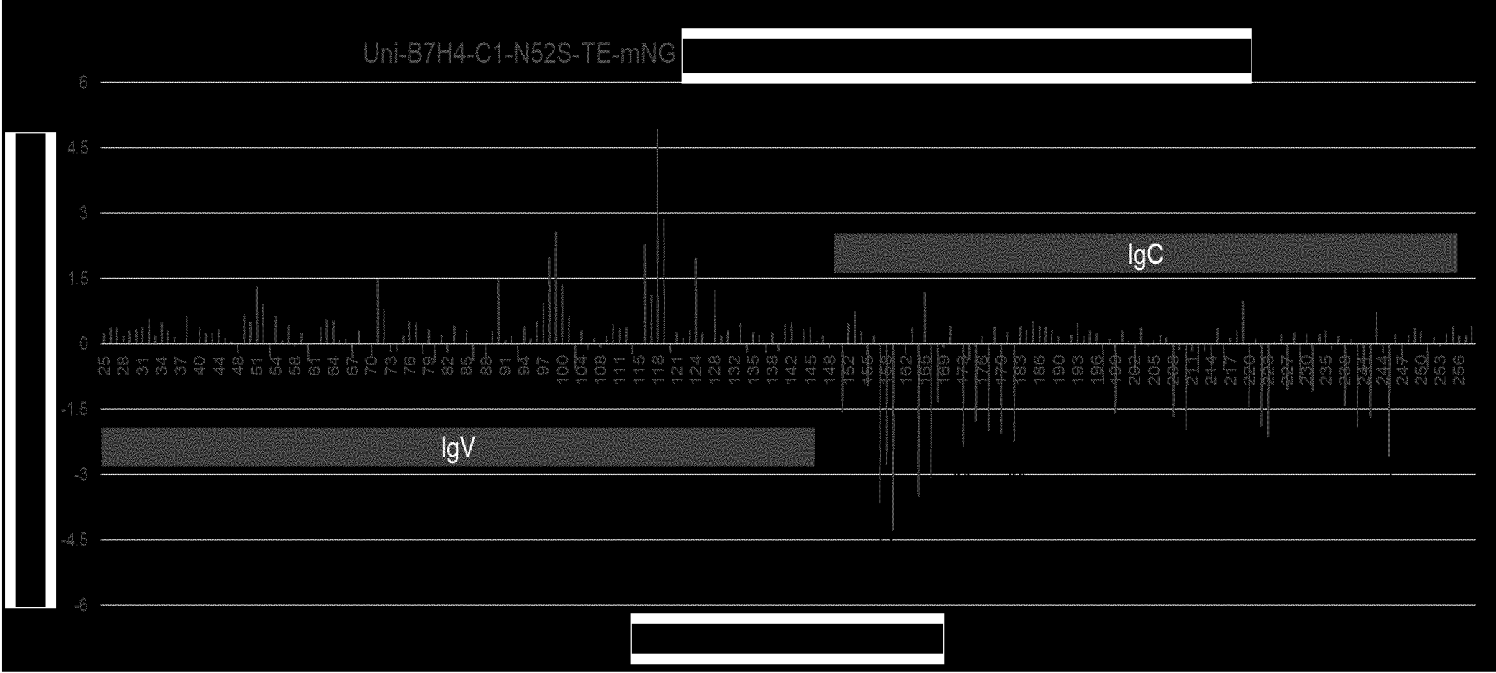
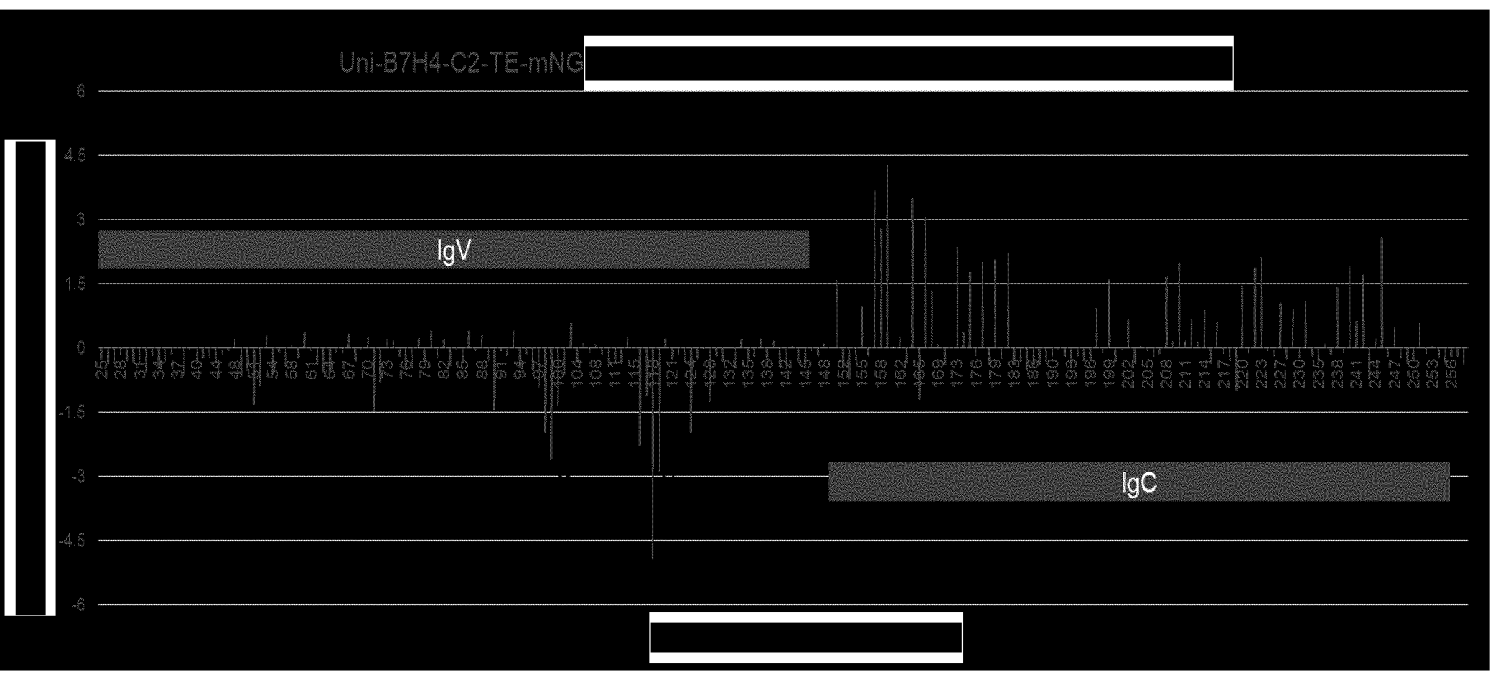


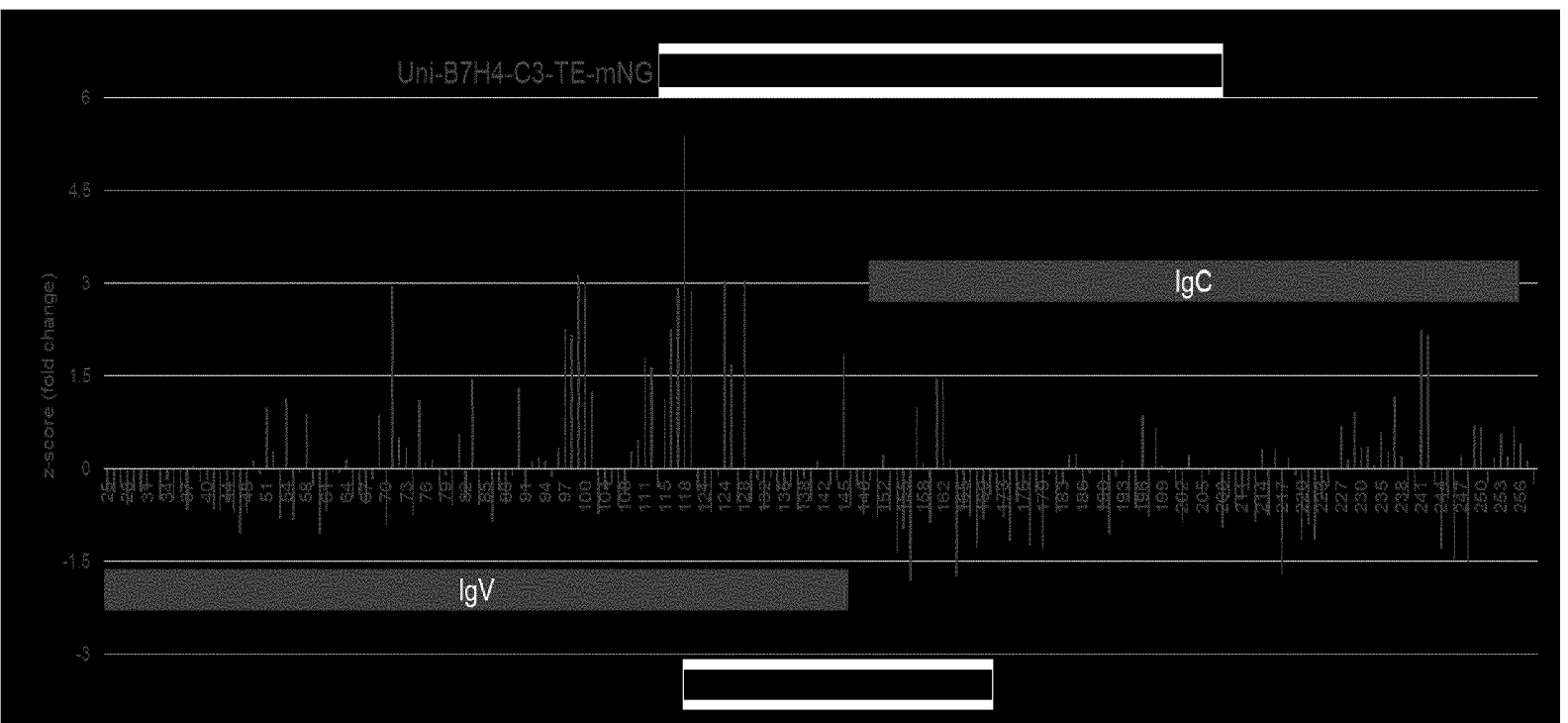
Fig. 3

B

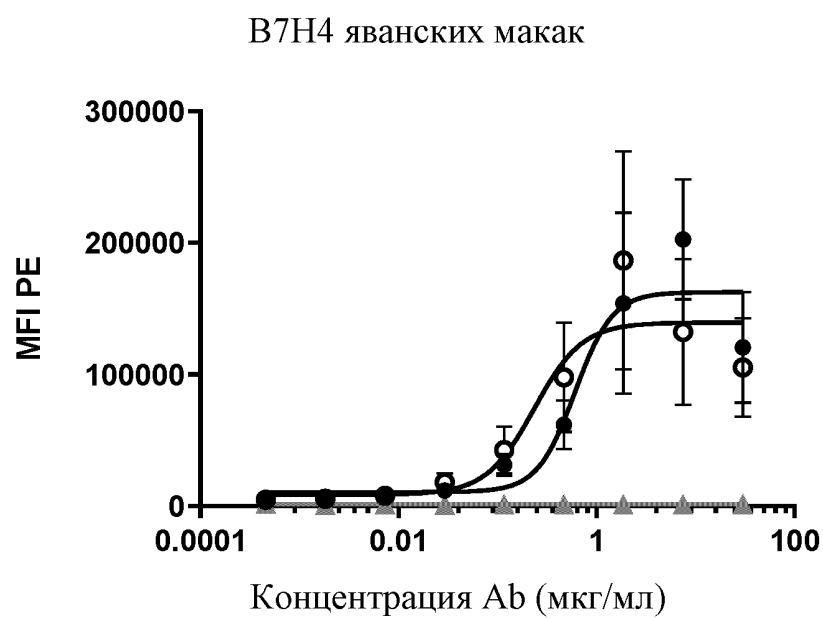
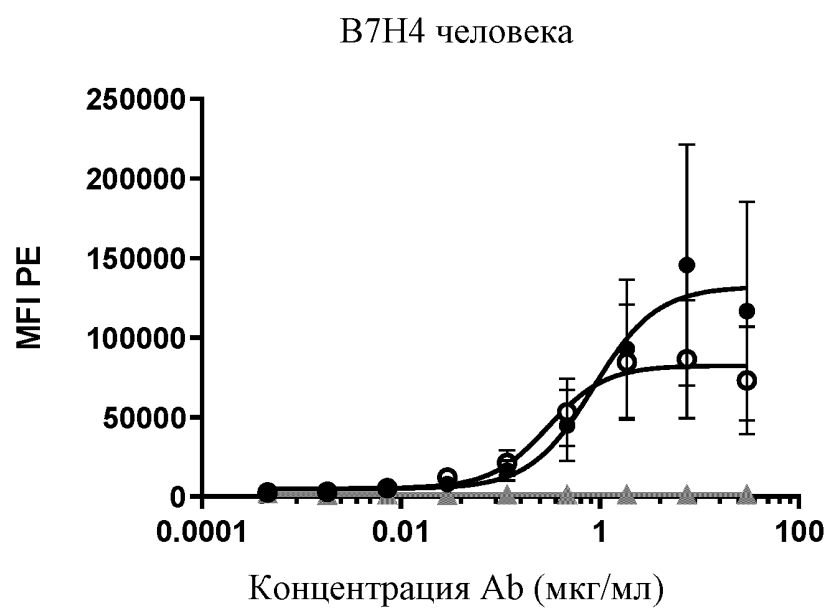


Фиг. 3 (продолжение)

C

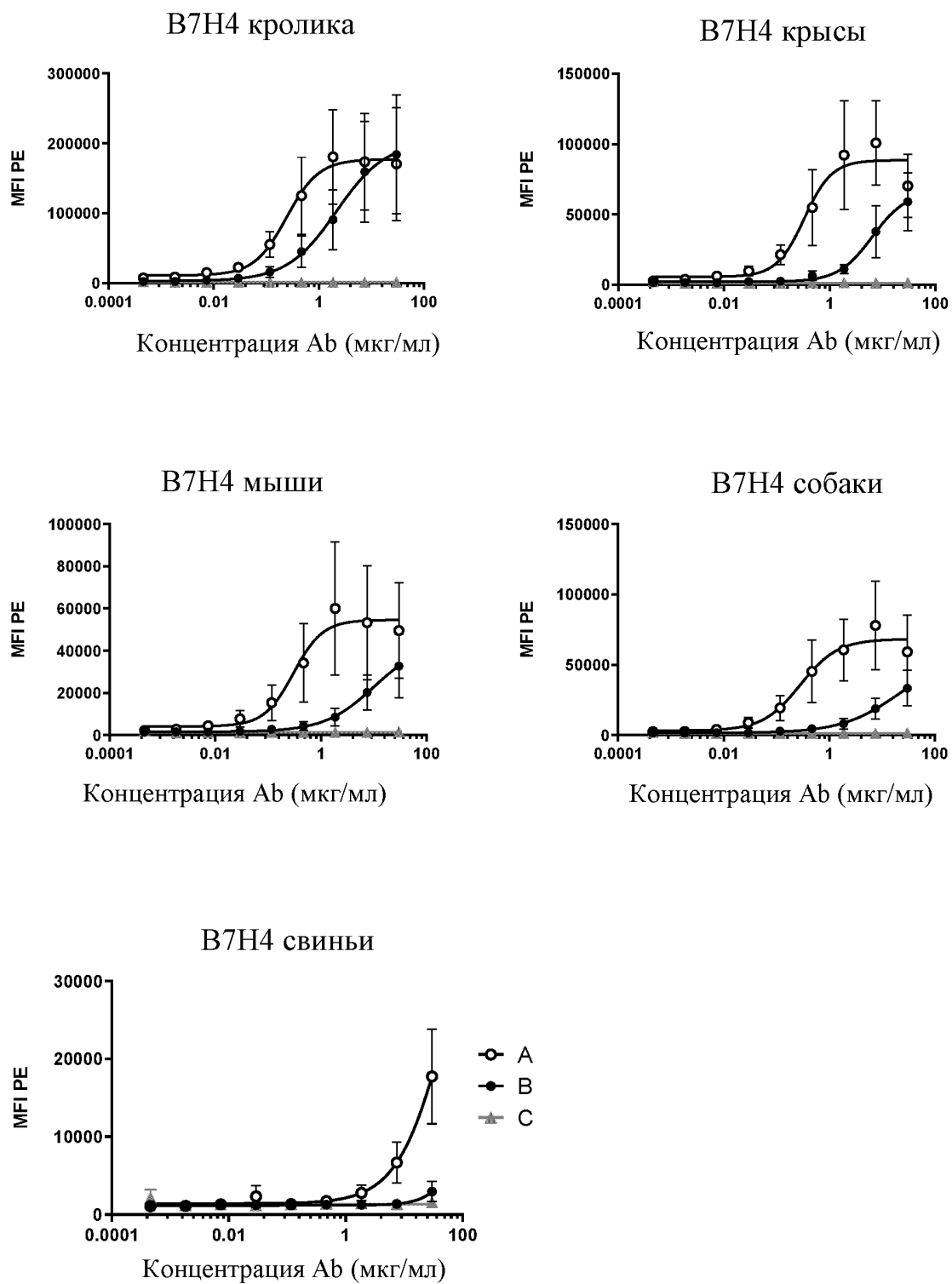


Фиг. 3 (продолжение)

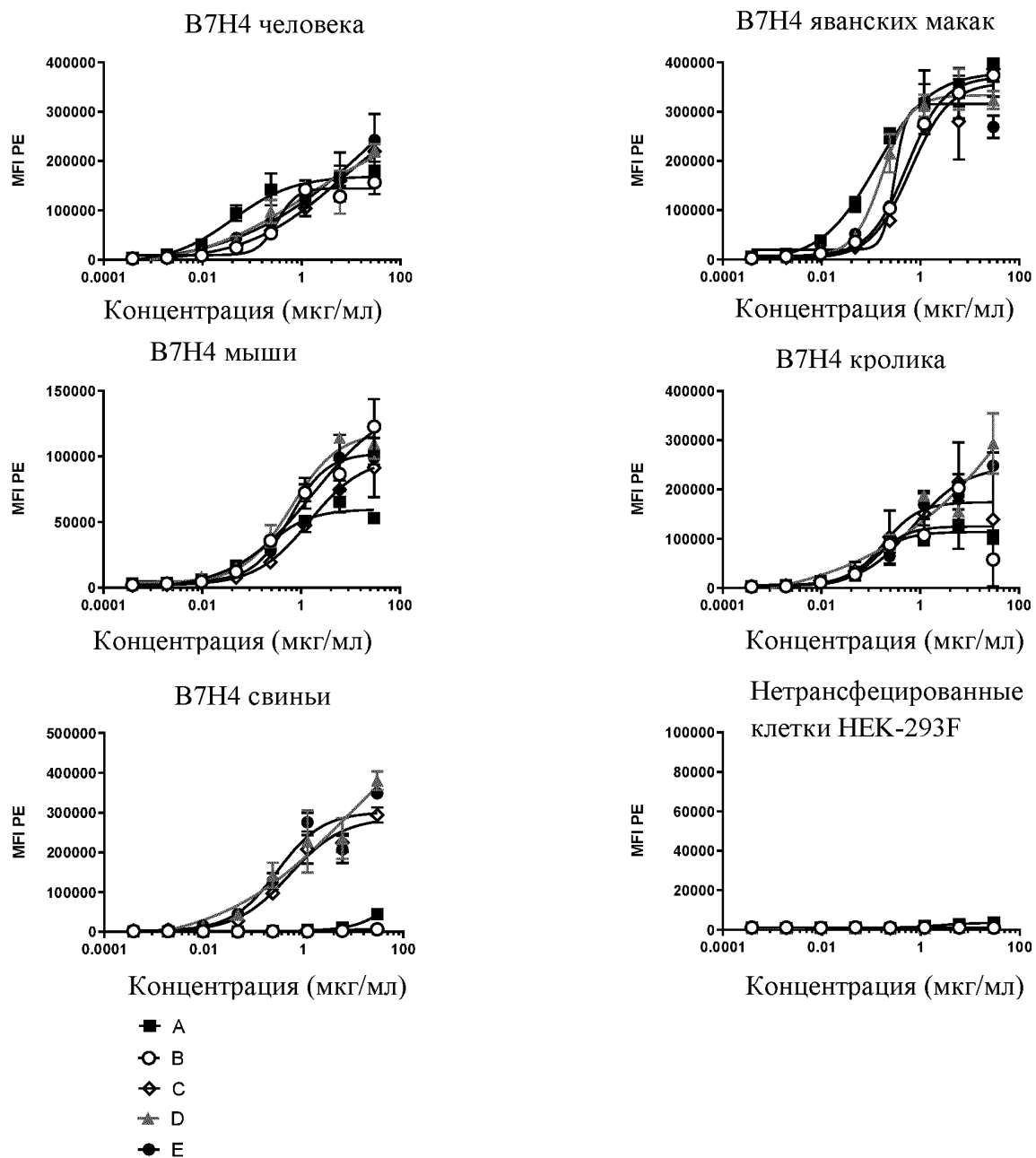


○ A
● B
▲ C

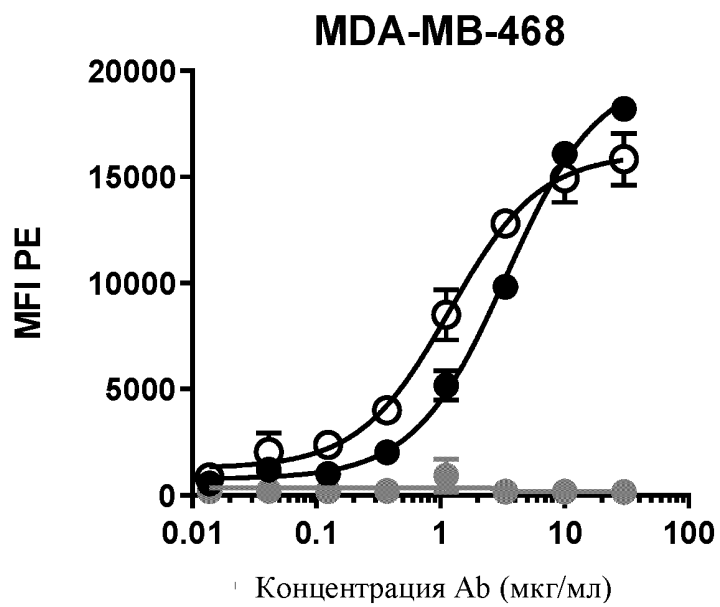
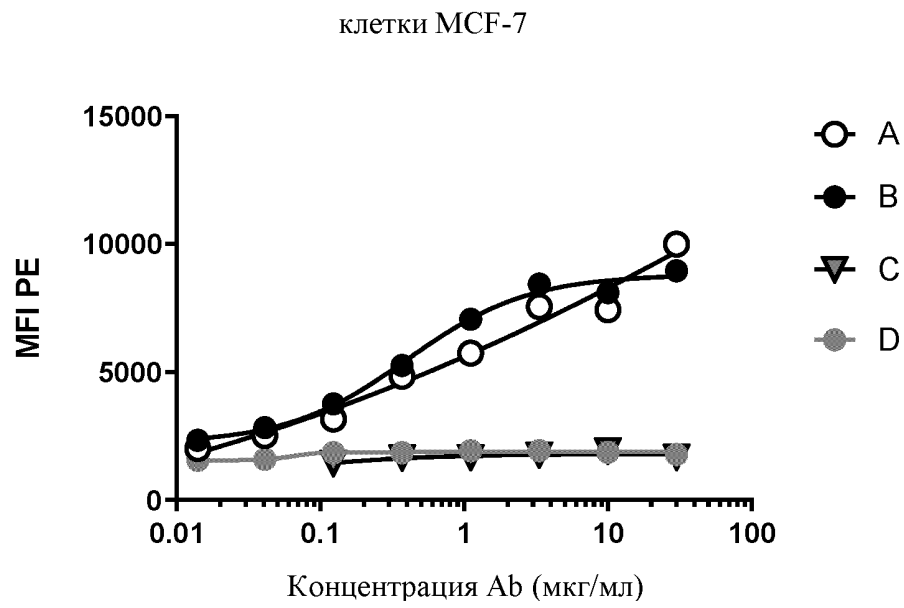
Фиг. 4



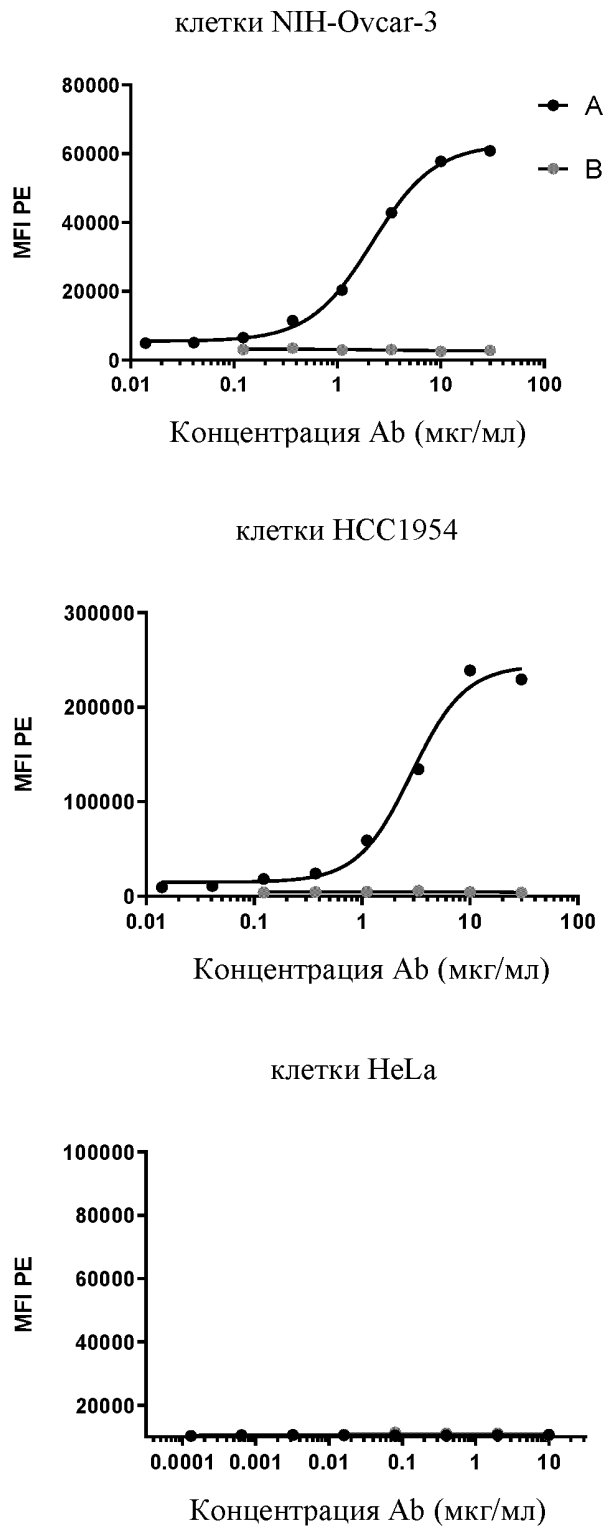
Фиг. 5



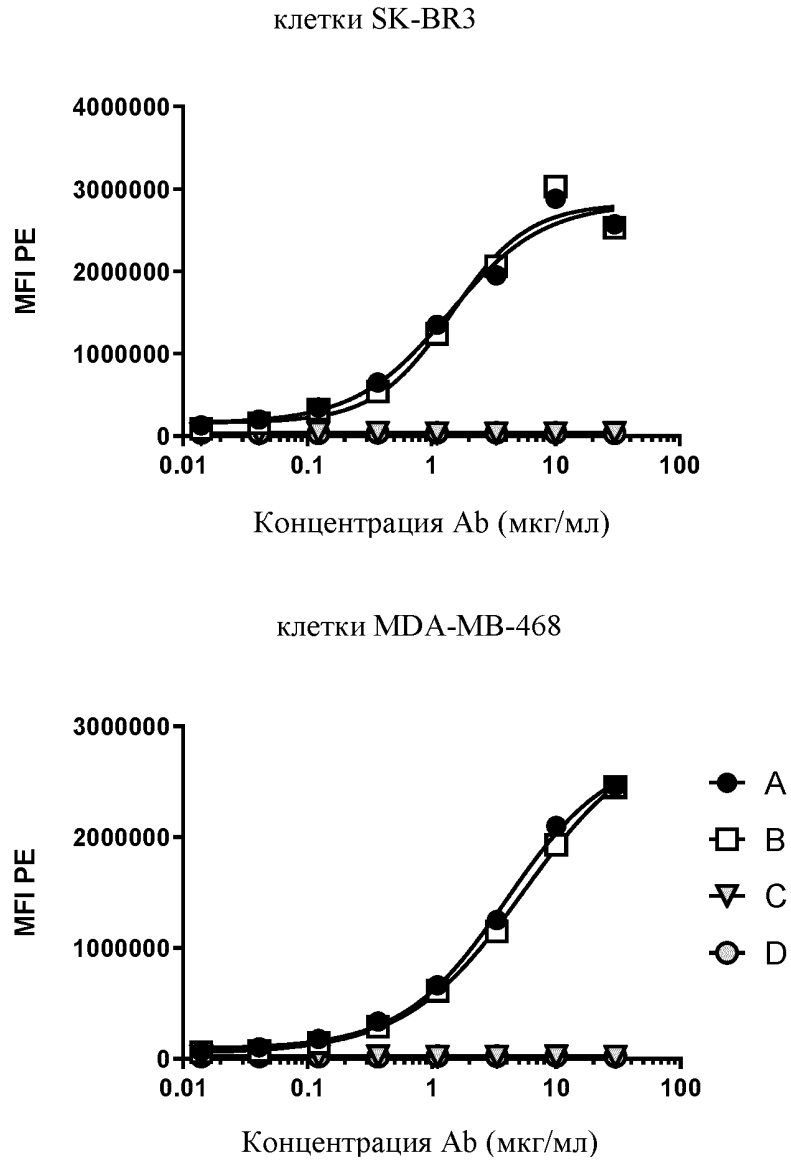
Фиг. 6



Фиг. 7

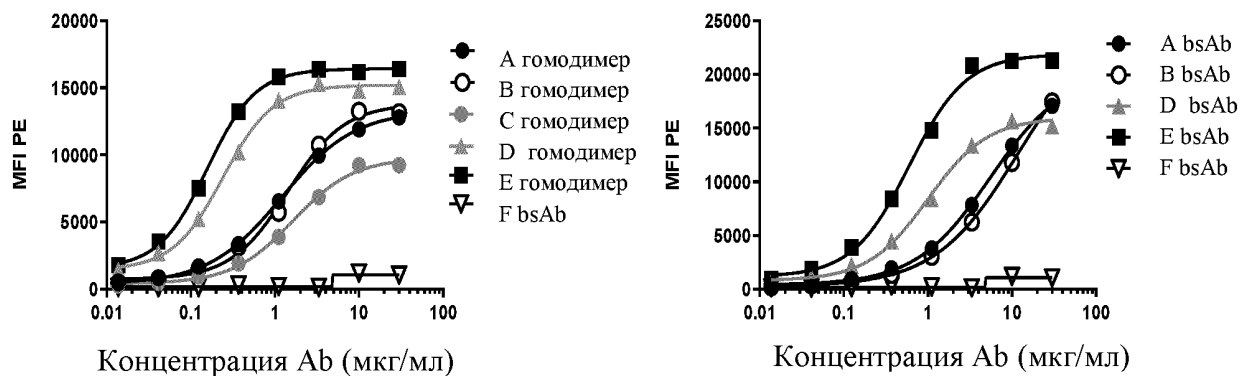


Фиг. 8

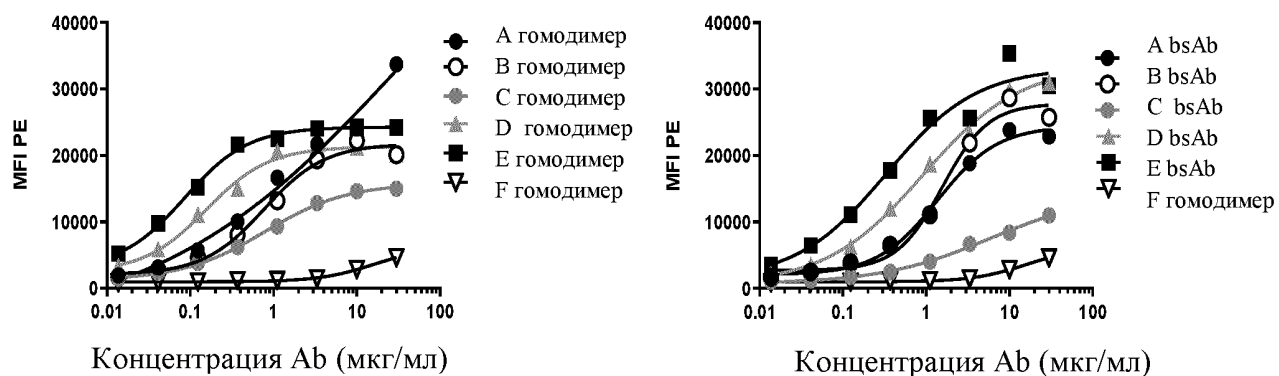


Фиг. 9

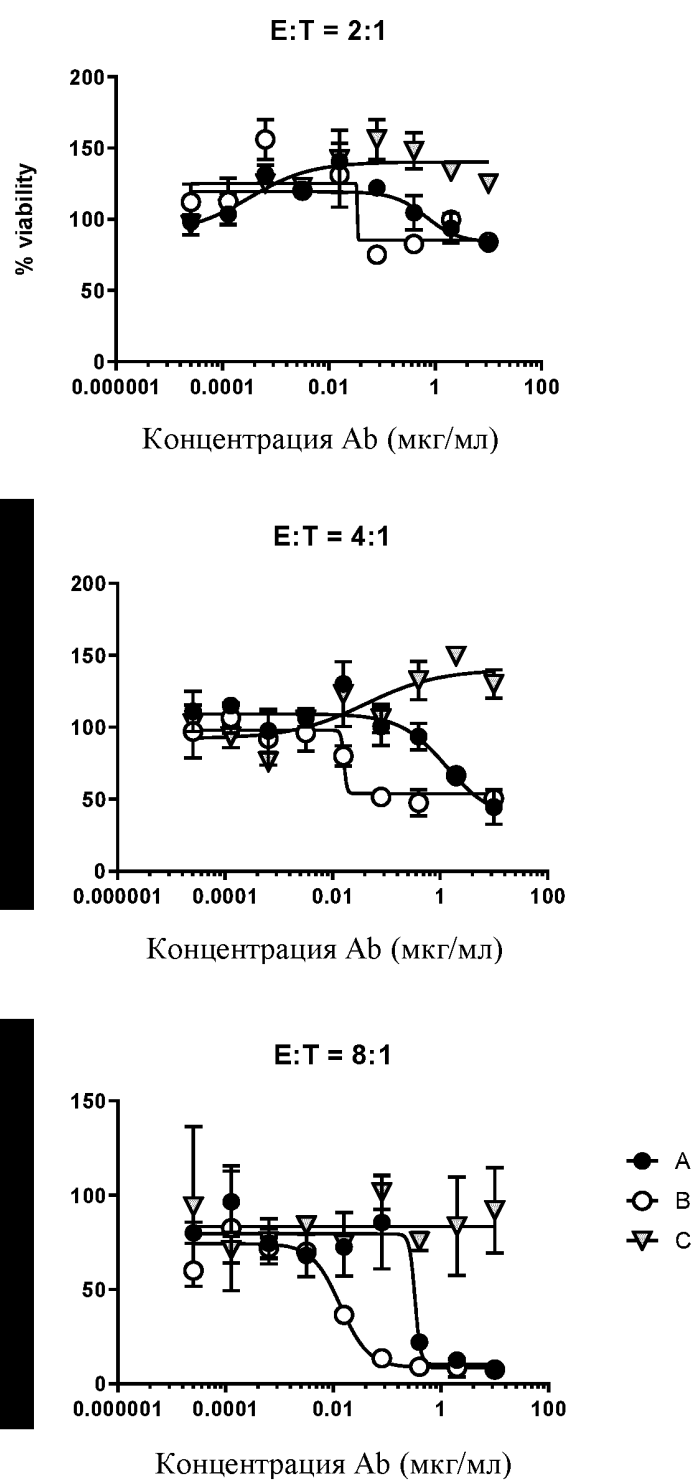
MDA-MB-468



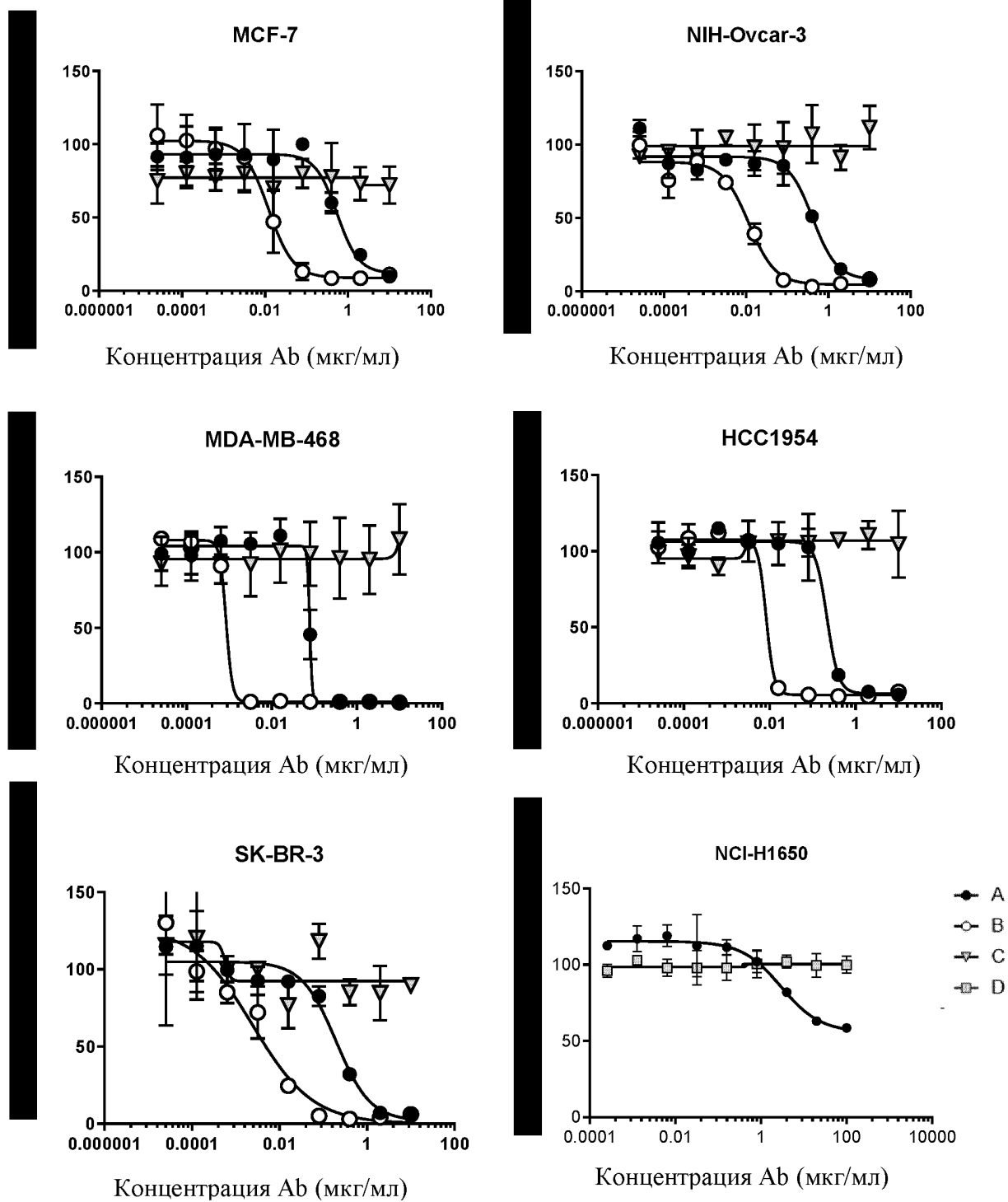
HCC1954



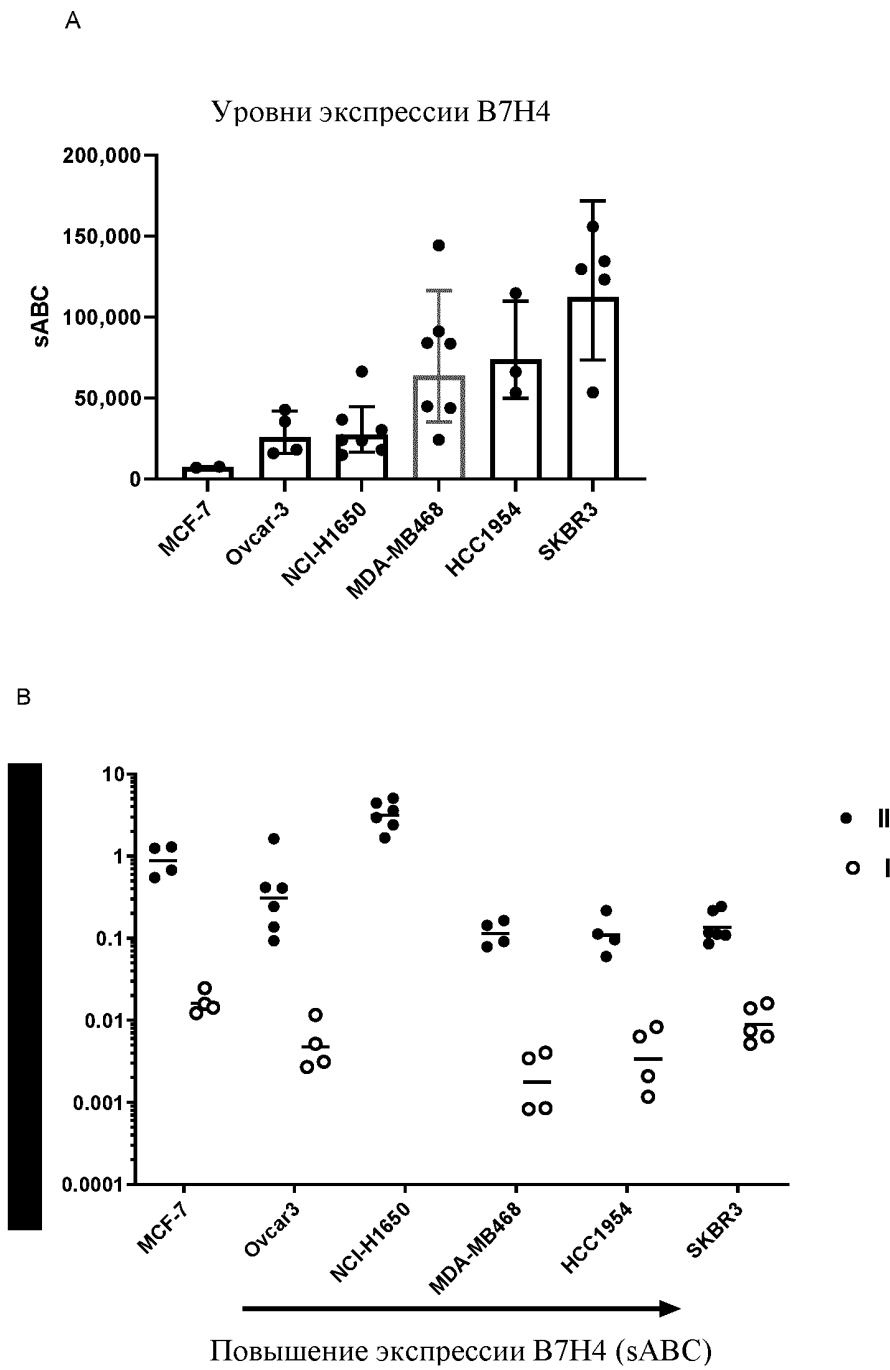
Фиг. 10



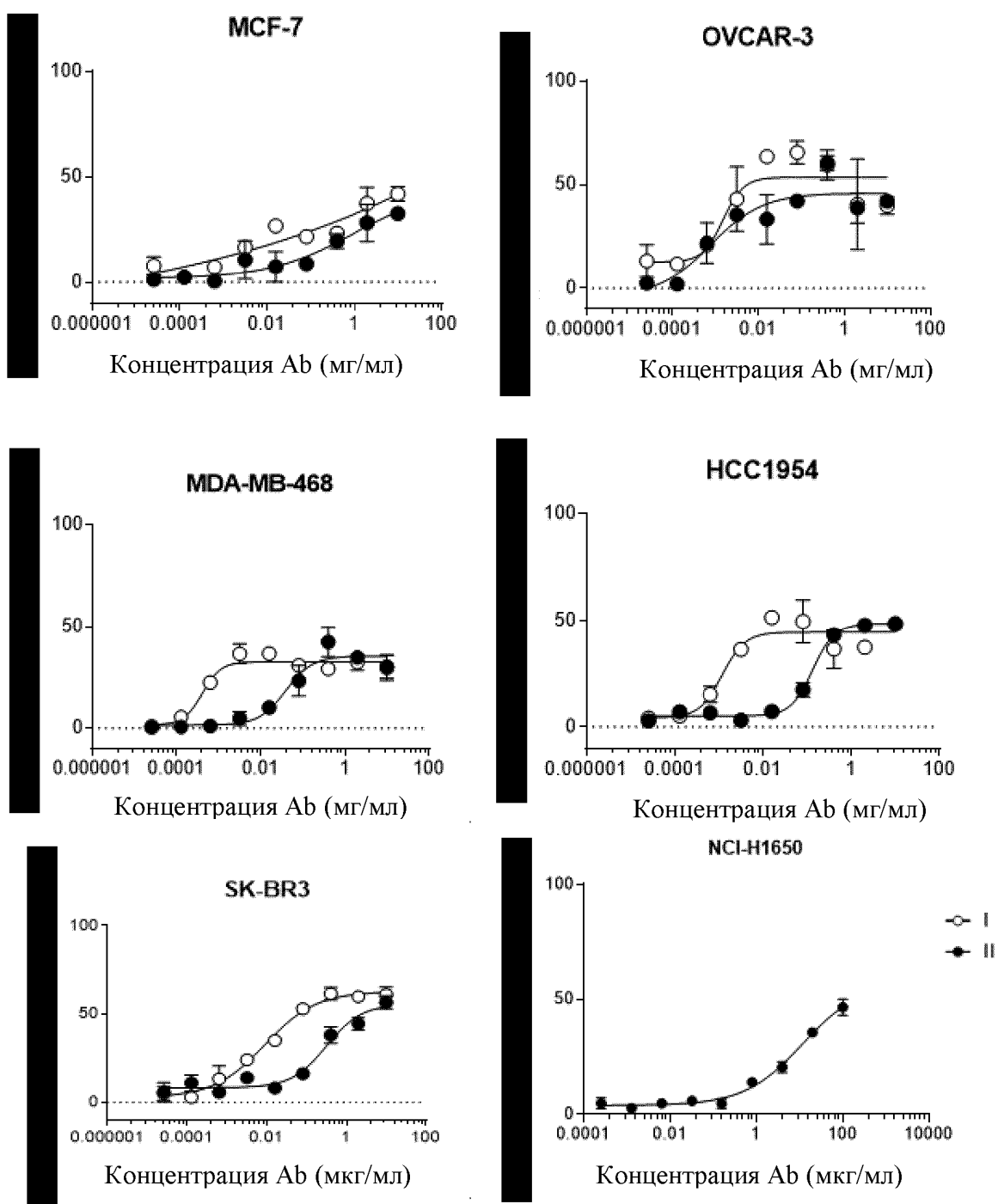
Фиг. 11



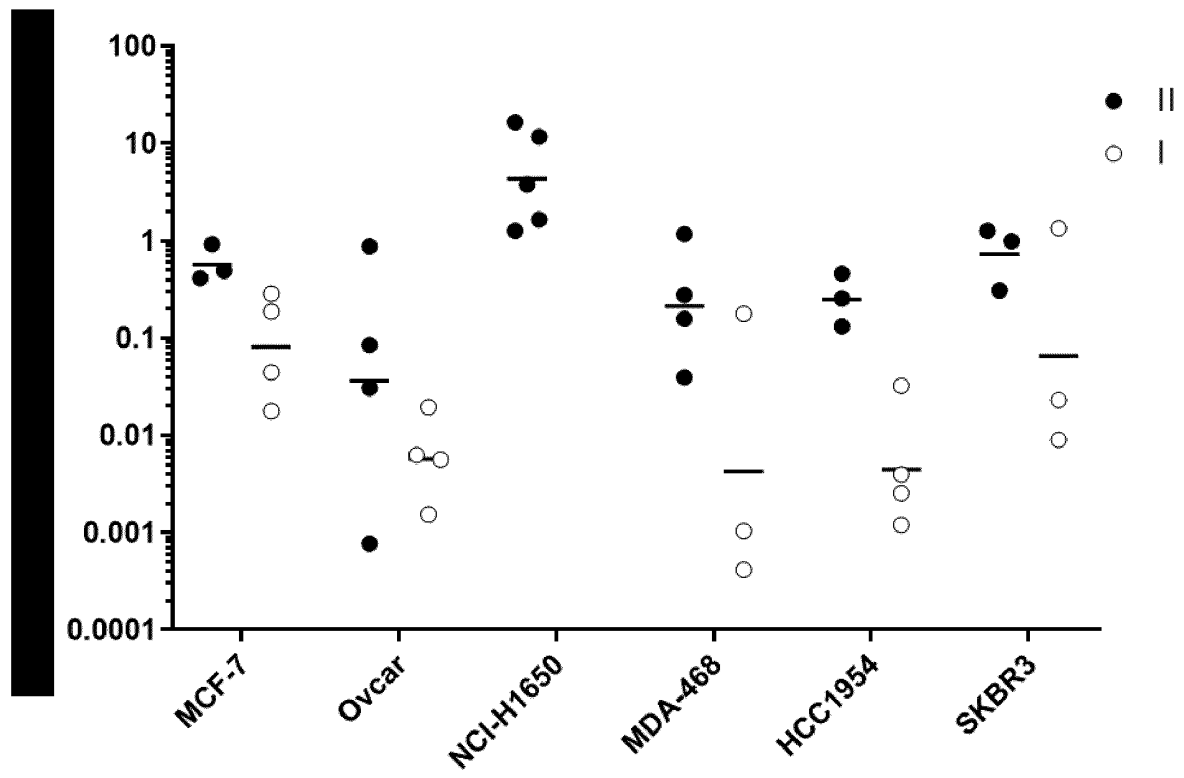
Фиг. 12



Фиг. 13

A

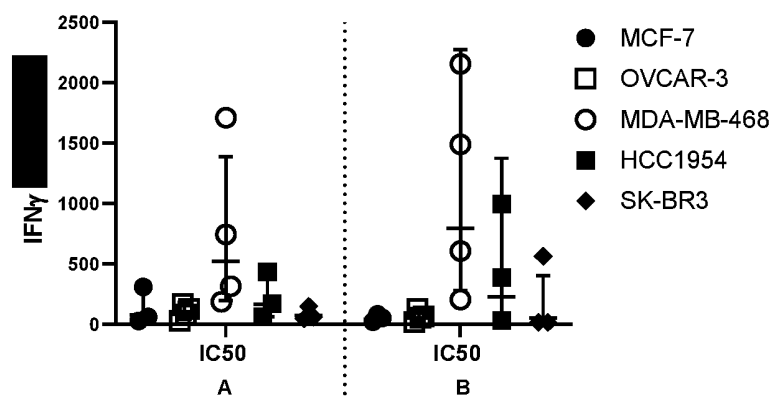
Фиг. 14



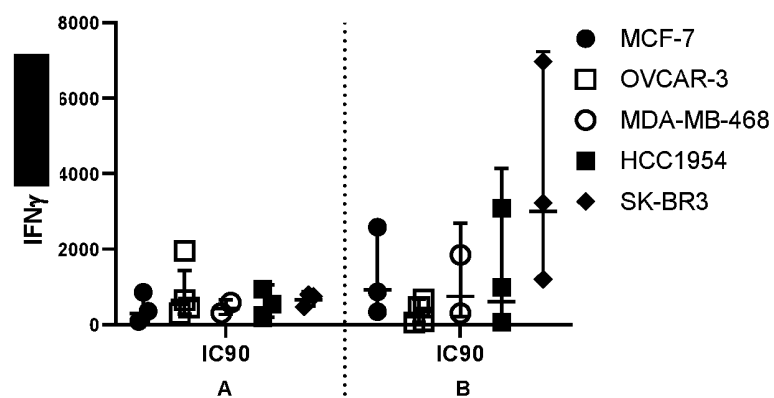
B.

Фиг. 14 (продолжение)

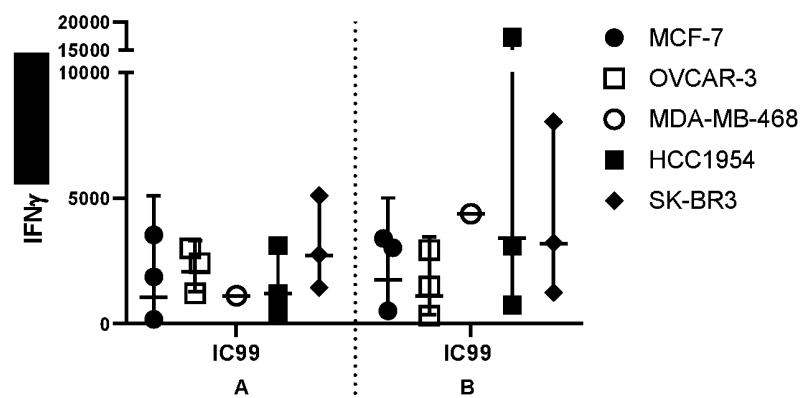
Продукция IFN γ при IC50 клеточной линии



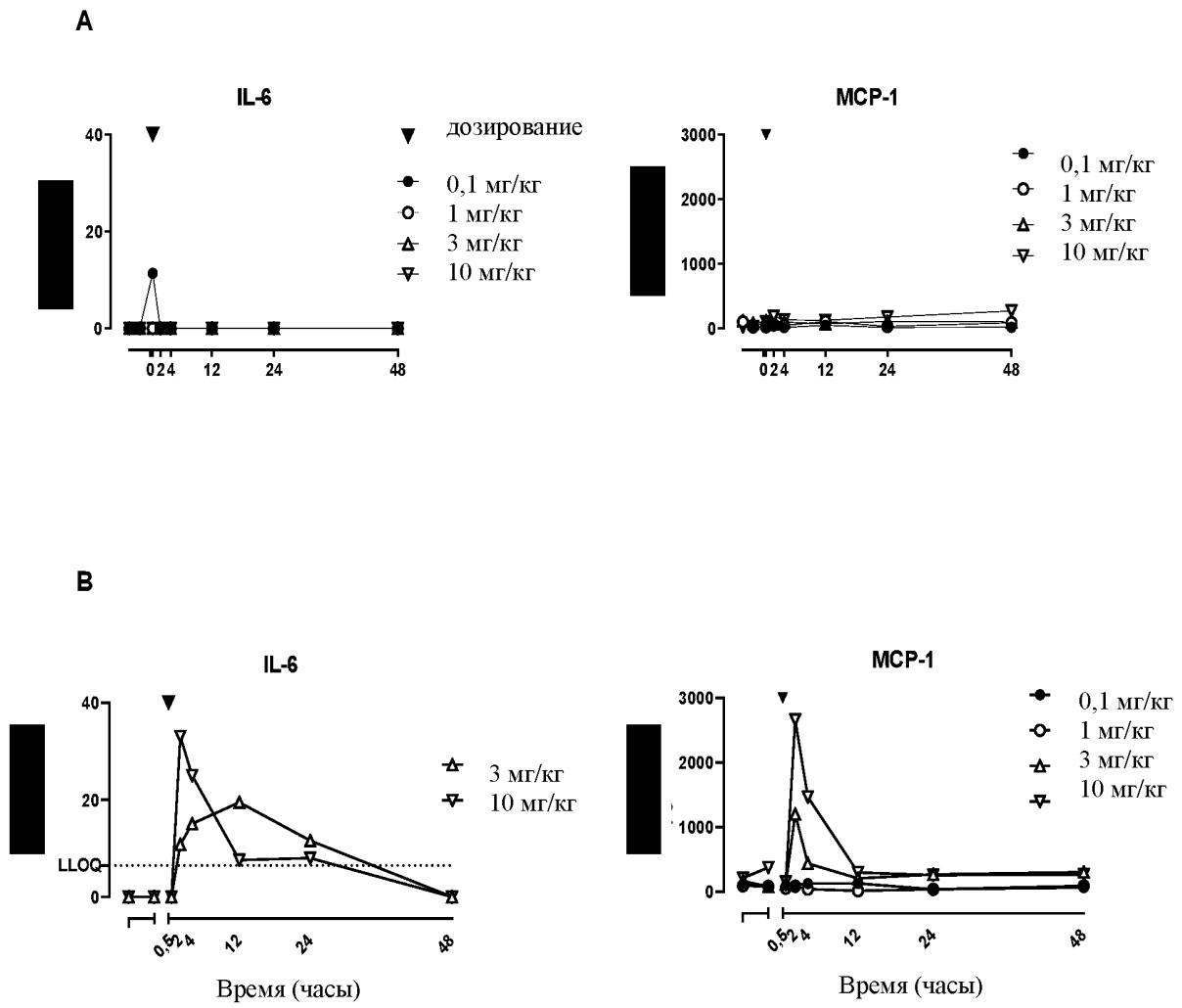
Продукция IFN γ при IC90 клеточной линии



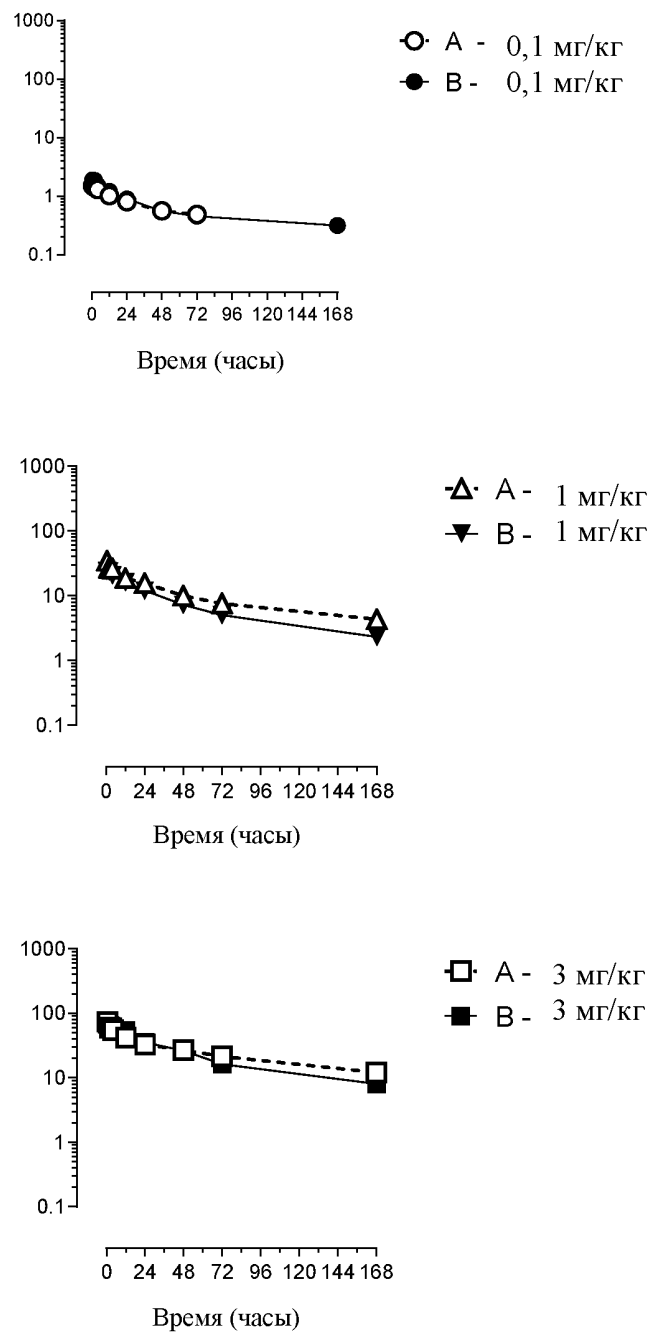
Продукция IFN γ при IC99 клеточной линии



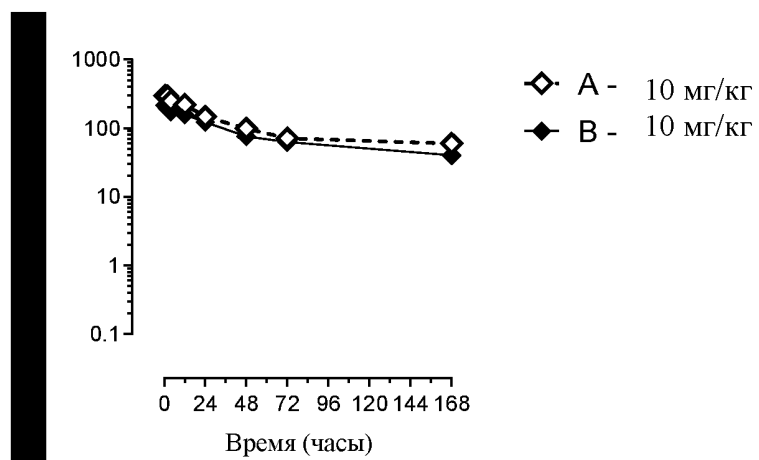
Фиг. 15



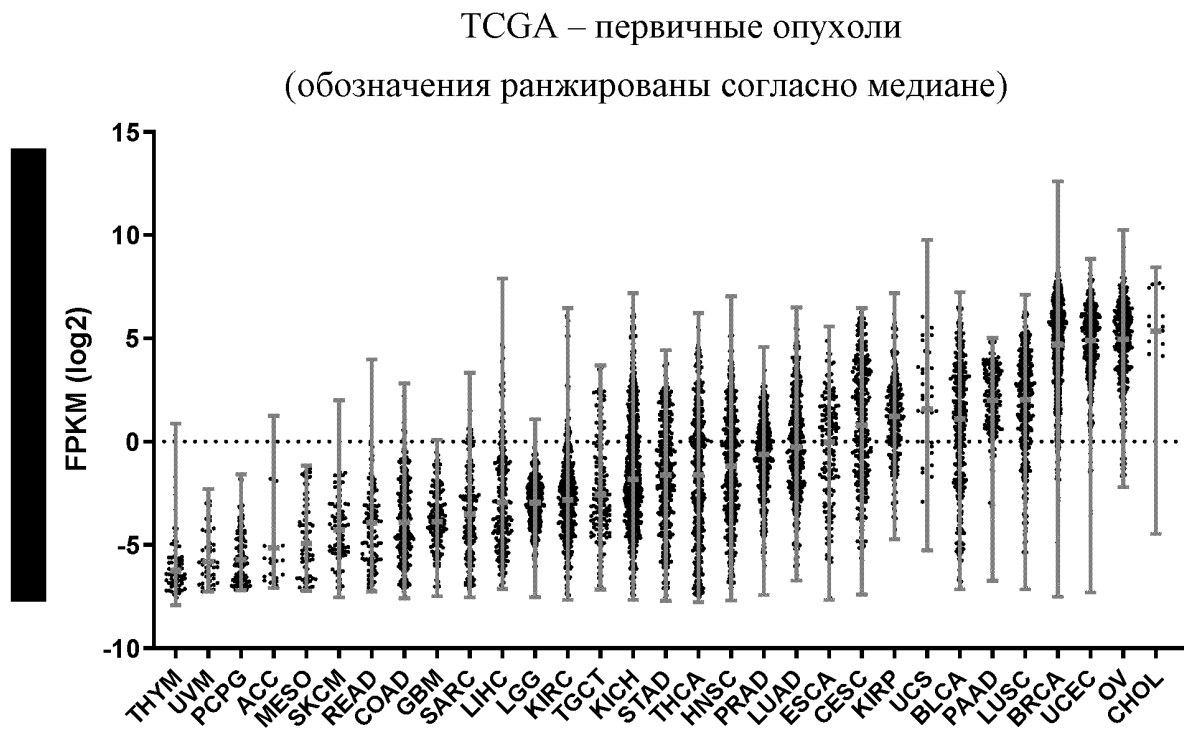
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 17 (продолжение)



Фиг. 18