

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292732 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.19

(51) Int. Cl. C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.30

(54) ТАРГЕТИРУЮЩИЕ DLL3 МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 2020-062326

(32) 2020.03.31

(33) JP

(86) PCT/JP2021/013460

(87) WO 2021/200898 2021.10.07

(71) Заявитель:
ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ
КАЙСЯ (JP)

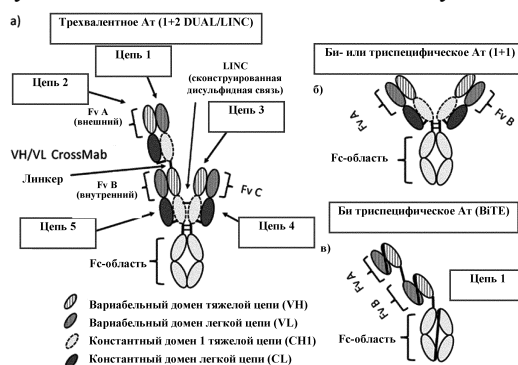
(72) Изобретатель:

Наой Сотаро (JP), Фэн Шу, Игава
Томоюки, Хо Шувэнь Саманта (SG)

(74) Представитель:

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

(57) В изобретении описаны мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые содержат первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, каждый из которых обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно; и третий антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с DLL3, предпочтительно человеческим DLL3, которые индуцируют зависящую от Т-клеток цитотоксичность более эффективно, но в то же время не имеют проблем, связанных с неблагоприятной токсичностью или побочными действиями, которые могут иметь другие мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы. В настоящей заявке описаны мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и фармацевтические композиции, которые можно применять для лечения различных раков, прежде всего ассоциированных с DLL3, которые содержат в качестве действующего вещества антигенсвязывающую молекулу.



A1

202292732

202292732

A1

ТАРГЕТИРУЮЩИЕ DLL3 МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

5

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые содержат первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, 10 каждый из которых обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно; и третий антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с DLL3. Изобретение относится также к нуклеиновым кислотам, кодирующим указанные антигенсвязывающие молекулы; к способам получения указанных 15 антигенсвязывающих молекул; к клеткам-хозяевам, которые экспрессируют или обладают способностью экспрессировать указанные антигенсвязывающие молекулы; к композициям, содержащим указанные антигенсвязывающие молекулы; к применениям указанных антигенсвязывающих молекул или указанных композиций, в частности, в терапевтических целях в области раковых 20 заболеваний.

Предпосылки создания изобретения

Рак является одной из основных причин смертей во всем мире. За исключением некоторых карцином, опухоли при их обнаружении часто оказываются неоперабельными. Традиционные методы лечения рака включают 25 лучевую терапию, химиотерапию и иммунотерапию. Эти методы лечения часто являются недостаточно эффективными, и в конечном итоге после лечения возникает рецидив или метастазирование рака. Отсутствие специфичности в отношении опухоли является одним из факторов, ограничивающих максимальную эффективность; поэтому более специфическая в отношении 30 опухоли молекулярная таргетная терапия стала дополнительным жизненно важным вариантом лечения рака.

Антитела привлекают внимание в качестве фармацевтических средств, поскольку они обладают высокой стабильностью в плазме и небольшим

количеством побочных действий. Среди множества терапевтических антител некоторые типы антител для проявления ими противоопухолевого действия нуждаются в эффекторных клетках. Антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC) представляет собой цитотоксичность, проявляемую эффекторными клетками в отношении связанных с антителами клеток посредством связывания Fc-области антитела с Fc-рецепторами, присутствующими на NK-клетках и макрофагах. К настоящему времени в качестве фармацевтических средств для лечения рака создано большое количество терапевтических антител, которые могут индуцировать ADCC для проявления противоопухолевой эффективности (NPL 1). Терапии, нацеленные на опухолеспецифические экспрессируемые антигены, в которых применяют общепринятые терапевтические антитела, обладают очень высокой противоопухолевой активностью, хотя введение таких антител не всегда может приводить к получению удовлетворительных результатов.

Помимо антител, которые участвуют в проявлении ADCC посредством рекрутинга NK-клеток или макрофагов в качестве эффекторных клеток, рекрутирующие Т-клетки антитела (TR-антитела), которые участвуют в проявлении цитотоксичности посредством рекрутинга Т-клеток в качестве эффекторных клеток, известны с 1980-ых годов (NPL 2-4). TR-антитело представляет собой биспецифическое антитело, которое распознает и связывается с одной из субъединиц, образующих комплекс Т-клеточного рецептора на Т-клетках, в частности, эпсилон-цепью CD3, и антигеном на раковых клетках. Несколько TR-антител в настоящее время находятся в разработке. Катумаксомаб, представляющий собой TR-антитело против ЕpCAM, одобрен в Евросоюзе для лечения злокачественных асцитов. Кроме того, в настоящее время установлено, что тип TR-антитела, который называют «биспецифическим активатором (проводником) Т-клеток (BiTE)», обладает сильной противоопухолевой активностью (NPL 5 и 6). Блинатумомаб, который представляет собой молекулу BiTE против CD19, впервые одобрен FDA в 2014 г. Было доказано, что блинатумомаб обладает существенно более сильной цитотоксической активностью в отношении CD19/CD20-позитивных раковых клеток *in vitro* по сравнению с ритуксимабом, который индуцирует антитело-

обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC) (NPL 7).

Однако известно, что трехфункциональное антитело связывается одновременно как с Т-клеткой, так и с такой клеткой как NK-клетка или макрофаг, независимым от ракового антигена образом, в результате чего экспрессируемые на клетках рецепторы перекрестно связываются, и индуцируется экспрессия различных цитокинов антигеннезависимым образом. По-видимому, системное введение трехфункционального антитела может вызывать побочные действия типа цитокинового шторма в результате указанной индукции экспрессии цитокинов. Так, опубликованы данные о том, что при осуществлении клинического испытания фазы I очень низкая доза катумаксомаба, такая как 5 мкг/индивидуума, представляла собой максимальную переносимую дозу при системном введении для пациентов с немелкоклеточным раком легкого, и что введение более высокой дозы приводило к различным серьезным побочным действиям (NPL 8). При введении катумаксомаба в указанной низкой дозе никогда не достигался его эффективный уровень в крови. Это означает, что при введении катумаксомаба в указанной низкой дозе не удавалось достигать ожидаемого противоопухолевого действия.

При этом в отличие от катумаксомаба в молекуле BiTE отсутствует сайт связывания с Fc-гамма рецептором, и поэтому она не обладает способностью перекрестно связываться с рецепторами, экспрессируемыми на Т-клетках и таких клетках, как NK-клетки и макрофаги, независимым от ракового антигена образом. Так, продемонстрировано, что BiTE не вызывает независимую от ракового антигена индукцию цитокинов, что наблюдается при введении катумаксомаба. Однако, поскольку BiTE представляет собой модифицированную низкомолекулярную молекулу антитела без Fc-области, то существует проблема, связанная с тем, что время ее полужизни в крови после введения пациенту является существенно более коротким по сравнению с антителами IgG-типа, которые традиционно применяют в качестве терапевтических антител. Так, опубликованы данные о том, что время полужизни в крови BiTE при введении *in vivo* составляло примерно несколько часов (NPL 9 и 10). При осуществлении клинических испытаний блинатумомаб вводили путем непрерывной внутривенной инфузии с использованием мининасоса. Указанный метод

введения не только является чрезвычайно неудобным для пациентов, но также с ним связан потенциальный риск медицинских несчастных случаев из-за неисправности устройства или т.п. Таким образом, указанный метод введения нельзя рассматривать в качестве желательного.

- 5 Дельта-подобный 3 (DLL3) представляет собой мембранный белок типа I, принадлежащий к членам семейства лигандов Notch. DLL3 необходим для нормального образования и структурирования сомитов. Мутации в DLL3 вызывают дефекты ребер или спондилолиз у пациентов с аутосомно-рецессивным спондилококостальным дизостозом (NPL 11 и 12). Известны
- 10 проведенные ранее исследования, в которых обнаружены амплификация гена DLL3 на хромосоме и повышенный уровень экспрессии этого гена в линиях раковых клеток (NPL 13) и повышенная экспрессия DLL3 при некоторых глиомах (NPL 14). Кроме того, ранее предложено применение DLL3 в методах диагностики и лечения глиомы, в дополнение к SCLC, с использованием
- 15 усиливающего ADCC антитела, конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) и биспецифической молекулы-активатора Т-клеток в формате BiTE-Fc (PTL 1, 2 и 3).

Перечень процитированных документов

Патентная литература

- 20 [PTL 1] WO 2011/093097.
[PTL 2] WO 2013/126746.
[PTL 3] WO 2017/021349.

Непатентная литература

- [NPL 1] Clin Cancer Res. 16(1), 1 января 2010 г., сс. 11-20.
- 25 [NPL 2] Nature. 314(6012), 18-24 апреля 1985 г., сс. 628-631.
[NPL 3] Int J Cancer. 41(4), 15 апреля 1988 г., сс. 609-615.
[NPL 4] Proc Natl Acad Sci U S A. 83(5), март 1986 г., сс. 1453-1457.
[NPL 5] Proc Natl Acad Sci U S A. 92(15), 18 июля 1995 г., сс. 7021-7025.
[NPL 6] Drug Discov Today. 10(18), 15 сентября 2005 г., сс. 1237-1244.
- 30 [NPL 7] Int J Cancer. 100(6), 20 августа 2002 г., сс. 690-697.
[NPL 8] Cancer Immunol Immunother 56 (10), 2007, сс. 1637-1644.
[NPL 9] Cancer Immunol Immunother. 55 (5), 2006, сс. 503-514.
[NPL 10] Cancer Immunol Immunother. 58 (1), 2009, сс. 95-109.

[NPL 11] Bulman M. P. и др., Nat Genet 24, 2000, сс. 438-441.

[NPL 12] Turnpenny P. D. и др., J Med Genet 40, 2003, сс. 333-339.

[NPL 13] Phillips H. S. Cancer Cell 9, 2006, сс. 157-173.

[NPL 14] Mulledndore M. E. Clin Cancer Res 15, 2009, сс. 2291-2301.

5 Краткое изложение сущности изобретения

Задача, положенная в основу изобретения

Целью настоящего изобретения является создание мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, которые могут оказывать лечебное действие на рак путем рекрутинга Т-клеток вблизи экспрессирующих DLL3 клеток и в результате цитотоксичности Т-клеток в отношении экспрессирующих DLL3 раковых клеток, разработка способов получения мультиспецифических антигенсвязывающих молекул и терапевтических агентов, содержащих мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу в качестве действующего вещества, индуцирующего клеточную цитотоксичность. Другой целью настоящего изобретения является создание фармацевтических композиций, предназначенных для применения для лечения или предупреждения различных типов рака, которые содержат одну из вышеуказанных антигенсвязывающих молекул в качестве действующего вещества, и разработка терапевтических способов применения фармацевтических композиций.

20 Решение задачи

Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые содержат первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, каждый из которых обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно (т.е. они обладают способностью связываться с CD3 и CD137, но не одновременно); и третий антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с DLL3, предпочтительно человеческим DLL3, которые индуцируют зависящую от Т-клеток цитотоксичность более эффективно, но в то же время не имеют проблем, связанных с неблагоприятной токсичностью или побочными действиями, которыми могут обладать другие мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы. В настоящем изобретении предложены мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы и фармацевтические

композиции, содержащие в качестве действующего вещества антигенсвязывающую молекулу, которые можно применять для лечения различных типов рака, прежде всего ассоциированных с DLL3, таких как DLL3-позитивные опухоли.

- 5 В одном из объектов изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, имеет совершенно уникальный(ые) структурный(ые) формат(ы), что улучшает или повышает эффективность мультиспецифических антигенсвязывающих молекул. Предложены новые антигенсвязывающие молекулы с уникальными
- 10 структурными форматами с увеличенным количеством антигенсвязывающих доменов, что приводит к повышенной валентности и/или специфичности в отношении соответствующих антигенов на эффекторных клетках и клетках-мишенях с уменьшенными нежелательными побочными действиями. Один из конкретных объектов настоящего изобретения относится к
- 15 мультиспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые содержат первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, каждый из которых обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно (т.е. они обладают способностью связываться с CD3 и CD137, но не одновременно); и
- 20 третий антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с DLL3, предпочтительно человеческим DLL3, которые индуцируют зависящую от Т-клеток цитотоксичность более эффективно, но в то же время не имеют проблем, связанных с неблагоприятной токсичностью или побочными действиями, которыми могут обладать другие мультиспецифические
- 25 антигенсвязывающие молекулы. В одном из указанных объектов изобретения каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов содержит по меньшей мере одну аминокислотную(ые) мутацию(ии), например, инсерцию цистеина/замену на цистеин/мутацию на цистеин, что приводит к созданию дисульфидной связи между первым и вторым антигенсвязывающими
- 30 фрагментами, удерживающую их вблизи друг к другу, и, например, способствует *цис*-связыванию с антигеном (CD3 и/или CD137) на одной и той же эффекторной клетке в результате стерического препятствия или более короткого расстояния между двумя Dual-Fab, тем самым улучшая профиль безопасности

триспецифического Ат путем предотвращения нежелательного перекрестного сшивания двух CD3/CD137-экспрессирующих иммунных клеток, опосредованного двумя Dual-Fab независимым от DLL3 образом. В одном из конкретных объектов изобретения указанный каждый из первого и второго

5 антигенсвязывающих фрагментов представляет собой Fab и содержит по меньшей мере один остаток цистеина (в результате мутации, замены или инсерции) в CH1-участке, указанный по меньшей мере один остаток цистеина может формировать по меньшей мере одну дисульфидную связь между CH1-участком первого антигенсвязывающего фрагмента и CH1-участком второго

10 антигенсвязывающего фрагмента. В другом конкретном объекте изобретения указанный каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов содержит один остаток цистеина (в результате мутации, замены или инсерции) в положении 191 согласно EU-нумерации CH1-участка, который может формировать одну дисульфидную связь между CH1-участком первого

15 антигенсвязывающего фрагмента и CH1-участком второго антигенсвязывающего фрагмента.

При создании изобретения неожиданно было установлено, что антигенсвязывающие молекулы, имеющие указанные уникальные структурные форматы, обладают более высокой эффективностью по сравнению с

20 мультиспецифическими антителами другого формата (например, BiTE), обладая при этом уменьшенными или минимальными нецелевыми побочными действиями, обусловленными нежелательным перекрестным сшиванием различных клеток (например, эффекторных клеток, таких как Т-клетки).

Более конкретно, в настоящем описании предложены следующие варианты:

25 [1] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая: первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, каждый из которых обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно; и третий антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью

30 связываться с третьим антигеном, предпочтительно антигеном, который экспрессируется в раковой клетке/ткани.

[1A] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, каждый из которых обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно; и третий антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с DLL3, предпочтительно человеческим DLL3.

[2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[1A], в которой первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент каждый содержит вариабельную область антитела, содержащую любой из следующих вариантов, указанных ниже в п.п.

(a1)-(a17):

(a1) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 17, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 31, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 45, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 64, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 69, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 74;

(a2) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 18, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 32, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 46, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a3) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 19, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 33, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a4) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 19, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 33, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 65, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 70, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 75;

(a5) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 20, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 34, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID

NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

5 (а6) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 22, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 36, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 50, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

10 (а7) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 23, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 37, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

15 (а8) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 23, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 37, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

20 (а9) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 24, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 38, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 52, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

25 (а10) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 25, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 39, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 53, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

30 (а11) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 26, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 40, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 54, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

(a12) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 26, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 40, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 54, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a13) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 27, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 41, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 55, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a14) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 28, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 42, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 56, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a15) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 82, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 83, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 84, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 65, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 70, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 75;

(a16) переменная область антитела, обладающая способностью связываться с тем же эпитопом, что и любая из переменных областей антитела, выбранная из указанных в п.п. (a1)-(a15); и

(a17) переменный фрагмент антитела, который конкурирует за связывание с любым из переменных фрагментов антитела, выбранных из указанных в п.п. (a1)-(a15).

[3] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[2], в которой первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент каждый содержит переменную область антитела, содержащую любой из вариантов, указанных ниже в п.п. (a1)-(a17):

(a1) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59;

(a13) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

5 (a14) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(a15) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60;

10 (a16) переменную область антитела, которая связывается с тем же эпитопом, что и любая из переменных областей антитела, выбранная из указанных в п.п. (a1)-(a15); и

(a17) переменный фрагмент антитела, который конкурирует за связывание с любым из переменных фрагментов антитела, выбранных из
15 указанных в п.п. (a1)-(a15).

[3A] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[3], в которой первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент каждый содержит переменную область антитела, содержащую определяющий комплементарность участок (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 20, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 34, CDR 3
20 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73.

[3B] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [3A], в
25 которой первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент каждый содержит переменную область антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

30 [4] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[3B], в которой каждый из первого антигенсвязывающего фрагмента и второго антигенсвязывающего фрагмента представляет собой Fab и содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь, сформированную между CH1-участком

первого антигенсвязывающего фрагмента и CH1-участком второго антигенсвязывающего фрагмента.

[4A] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4], в которой каждый из первого антигенсвязывающего фрагмента и второго антигенсвязывающего фрагмента представляет собой Fab и содержит одну дисульфидную связь, сформированную между аминокислотным остатком в положении 191 согласно EU-нумерации в соответствующем CH1-участке первого антигенсвязывающего фрагмента и второго антигенсвязывающего фрагмента.

[5] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[4A], в которой третий антигенсвязывающий фрагмент слит с одним либо первым антигенсвязывающим фрагментом, либо вторым антигенсвязывающим фрагментом.

[5A] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [5], в которой третий антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab или scFv.

[6] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [5]-[5A], в которой каждый из первого, второго и третьего антигенсвязывающих фрагментов представляет собой молекулу Fab, в которой третий антигенсвязывающий фрагмент слит на С-конце тяжелой цепи Fab (CH1) с N-концом тяжелой цепи Fab одного либо первого антигенсвязывающего фрагмента, либо второго антигенсвязывающего фрагмента, необязательно через пептидный линкер.

[6A] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [5]-[6], в которой указанный пептидный линкер выбран из группы, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249 или SEQ ID NO: 259.

[6Б] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[6A], в которой первый антигенсвязывающий фрагмент идентичен второму антигенсвязывающему фрагменту.

[7] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[6Б], в которой третий антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу кроссовер-Fab, в которой переменные области легкой цепи Fab и

тяжелой цепи Fab обменены и в которой каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов представляет собой молекулу канонического Fab.

5 [8] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [7], в которой в константном домене CL легкой цепи каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислота(ы) в положении 123 и/или 124 независимо представляет(ют) собой лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в которой в константном домене CH1 тяжелой цепи каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов
10 аминокислота в положении 147 и/или аминокислота в положении 213 независимо представляет собой глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-нумерации).

[9] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [8], в которой в константном домене CL легкой цепи каждого из первого и второго
15 антигенсвязывающих фрагментов аминокислоты в положениях 123 и 124 представляют собой аргинин (R) и лизин (K) соответственно (нумерация согласно Кэботу) и в которой в константном домене CH1 тяжелой цепи каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислоты в положениях 147 и 213 представляют собой глутаминовую кислоту (E)
20 (нумерация согласно EU-нумерации).

[10] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[9], в которой третий антигенсвязывающий фрагмент, обладающий способностью связываться с DLL3, содержит вариабельную область антитела, содержащую любой из вариантов, указанных ниже в п.п. (a1)-(a5):

25 (a1) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 233, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 234, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 235, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 237, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 238, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 239;

30 (a2) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 276, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 277, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 278, CDR 1 легкой цепи, имеющий

SEQ ID NO: 279, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 280, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 281;

(a3) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 285, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 286,
5 CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 287, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 288, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 289, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 290;

(a4) переменную область антитела, которая связывается с тем же эпитопом, что и любая из переменных областей антитела, выбранная из
10 указанных в п.п. (a1)-(a3); и

(a5) переменный фрагмент антитела, который конкурирует за связывание с любым из переменных фрагментов антитела, выбранных из указанных в п.п. (a1)-(a3).

[11] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из
15 п.п. [1]-[10], в которой третий антигенсвязывающий фрагмент, обладающий способностью связываться с DLL3, содержит переменную область антитела, содержащую любой из вариантов, указанных ниже в п.п. (a1)-(a6):

(a1) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 232, и переменную область легкой цепи,
20 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236;

(a2) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 264, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 265;

(a3) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 266, и переменную область легкой цепи,
25 содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 267;

(a4) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 268, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 269;

(a5) переменную область антитела, которая связывается с тем же эпитопом, что и любая из переменных областей антитела, выбранная из
30 указанных в п.п. (a1)-(a4); и

(а6) вариабельный фрагмент антитела, который конкурирует за связывание с любым из вариабельных фрагментов антитела, выбранных из указанных в п.п. (а1)-(а4).

5 [11А] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [10] или п. [11], в которой третий антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область антитела, содержащую определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 233, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 234, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 235, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 237, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 238, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 10 239.

[11Б] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [11А], в которой третий антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область антитела, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит 15 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 232, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236.

[12] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[11Б], дополнительно содержащая Fc-домен.

20 [12А] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [12], в которой Fc-домен состоит из первой и второй субъединиц Fc-области, способных к стабильной ассоциации, и в которой Fc-домен обладает пониженной аффинностью связывания с человеческим Fc-гамма-рецептором по сравнению с нативным Fc-доменом человеческого IgG1.

25 [12Б] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [12А], в которой первая субъединица Fc-области выбрана из группы, состоящей из:

(а1) полипептида Fc-области, содержащего Ala в положении 234 и Ala в положении 235;

30 (а2) полипептида Fc-области, содержащего Ala в положении 234 и Ala в положении 235, и Ala в положении 297;

(а3) полипептида Fc-области, содержащего Ala в положении 234, Ala в положении 235, Ala в положении 297, Cys в положении 354 и Trp в положении 366; и

в которой второй полипептид Fc-области выбран из группы, состоящей из:

(a4) полипептида Fc-области, содержащего Ala в положении 234 и Ala в положении 235;

5 (a5) полипептида Fc-области, содержащего Ala в положении 234, Ala в положении 235 и Ala в положении 297;

(a6) полипептида Fc-области, содержащего Ala в положении 234, Ala в положении 235, Ala в положении 297, Cys в положении 349, Ser в положении 366, Ala в положении 368 и Val в положении 407; и

10 в которых аминокислотные положения нумеруют, используя нумерацию согласно EU-индексу.

[12B] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [12]-[12Б], в которой Fc-домен обладает повышенной FcRn-связывающей активностью в условиях кислого pH (например, pH 5,8) по сравнению с Fc-областью нативного IgG.

15 [12Г] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [12В], в которой Fc-домен содержит Ala в положении 434; Glu, Arg, Ser или Lys в положении 438; и Glu, Asp или Gln в положении 440 согласно EU-нумерации.

[12Д] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [12Г], в которой Fc-домен содержит Ala в положении 434; Arg или Lys в положении 438; 20 и Glu или Asp в положении 440 согласно EU-нумерации.

[12Е] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [12Д], в которой Fc-домен дополнительно содержит Ile или Leu в положении 428; и/или Ile, Leu, Val, Thr или Phe в положении 436 согласно EU-нумерации.

25 [12Ж] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [12В]-[12Е], в которой Fc-домен содержит комбинацию аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из:

(a) N434A/Q438R/S440E;

(б) N434A/Q438R/S440D;

(в) N434A/Q438K/S440E;

30 (г) N434A/Q438K/S440D;

(д) N434A/Y436T/Q438R/S440E;

(е) N434A/Y436T/Q438R/S440D;

(ж) N434A/Y436T/Q438K/S440E;

- (з) N434A/Y436T/Q438K/S440D;
(и) N434A/Y436V/Q438R/S440E;
(к) N434A/Y436V/Q438R/S440D;
(л) N434A/Y436V/Q438K/S440E;
5 (м) N434A/Y436V/Q438K/S440D;
(н) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440E;
(о) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440D;
(п) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440E;
(р) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440D;
10 (с) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440E;
(т) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440D;
(у) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440E;
(ф) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440D;
(х) M428L/N434A/Q438R/S440E;
15 (ц) M428L/N434A/Q438R/S440D;
(ч) M428L/N434A/Q438K/S440E;
(ш) M428L/N434A/Q438K/S440D;
(щ) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E;
(э) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440D;
20 (аа) M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440E;
(аб) M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440D;
(ав) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E;
(аг) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440D;
(ад) M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440E;
25 (ае) M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440D;
(аж) L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; и
(аз) L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E,
согласно EU-нумерации.

[123] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из
30 п.п. [12В]-[12Ж], в которой Fc-домен содержит комбинацию аминокислотных
замен M428L/N434A/Q438R/S440E.

[12И] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из
п.п. [12]-[123], в которой Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG,

предпочтительно Fc-домен человеческого IgG, более предпочтительно Fc-домен человеческого IgG1.

[12K] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [12]-[12И], в которой Fc-домен содержит один из следующих вариантов:

5 (а) первую субъединицу Fc, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100, и вторую субъединицу Fc, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 111; и

10 (б) первую субъединицу Fc, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 99, и вторую субъединицу Fc, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 109.

[12Л] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [12]-[12K], в которой каждый из первого и второго антигенсвязывающих
15 фрагментов представляет собой Fab, в которой первый антигенсвязывающий фрагмент слит на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом первой или второй субъединицы Fc-домена, а второй антигенсвязывающий фрагмент слит на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом оставшейся субъединицы Fc-домена.

[12М] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [12Л], в
20 которой третий антигенсвязывающий фрагмент слит на С-конце с N-концом тяжелой цепи Fab любого одного из первого антигенсвязывающего фрагмента или второго антигенсвязывающего фрагмента, необязательно через пептидный линкер.

[13] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из
25 п.п. [1]-[12М], которая содержит пять полипептидов в любой из комбинаций, выбранных из указанных ниже в п.п. (a1)-(a15):

(a1) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 201 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая
30 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208 (цепь 3), и две
полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 214 (цепь 4 и цепь 5);

(a13) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 (цепь 4 и цепь 5);

(a14) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 (цепь 4 и цепь 5); и

(a15) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 231 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 (цепь 4 и цепь 5); и в которой предпочтительно пять полипептидных цепей (цепь 1-цепь 5) соединены и/или находятся в ассоциации друг с другом в соответствии с ориентацией, показанной на фиг. 1(a).

[14] Выделенный полинуклеотид или множество полинуклеотидов, кодирующих мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из п.п. [1]-[13].

[15] Вектор, кодирующий полинуклеотид или множество полинуклеотидов по п. [14].

[16] Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или множество полинуклеотидов по п. [14] или вектор по п. [15].

[17] Способ получения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из п.п. [1]-[13], включающий стадии, на которых а) культивируют клетку-хозяина по п. [16] в условиях, пригодных для экспрессии антигенсвязывающей молекулы, и б) выделяют антигенсвязывающую молекулу.

[17A] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, полученная способом по п. [17].

5 [18] Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из п.п. [1]-[13] и фармацевтически приемлемый носитель.

[19] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[13] или фармацевтическая композиция по п. [18], которая индуцирует цитотоксичность, предпочтительно зависящую от Т-клеток цитотоксичность.

10 [20] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[13] или фармацевтическая композиция по п. [18], предназначенная для применения в качестве лекарственного средства.

15 [21] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [1]-[13] или фармацевтическая композиция по п. [18], предназначенная для применения для лечения или предупреждения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом.

[22] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или фармацевтическая композиция, предназначенная для применения для лечения/предупреждения заболевания по п. [21], где заболевание представляет собой рак.

20 [22A] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или фармацевтическая композиция, предназначенная для применения для лечения/предупреждения заболевания по п. [22], где заболевание представляет собой DLL3-экспрессирующий рак или DLL3-позитивный рак.

25 [22B] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или фармацевтическая композиция, предназначенная для применения для лечения/предупреждения заболевания по п. [22] или п. [22A], где рак представляет собой рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого) и меланому.

30 [23] Применение мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из п.п. [1]-[13] или фармацевтической композиции по п. [18] для приготовления лекарственного средства для лечения или предупреждения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом.

[24] Способ лечения заболевания у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве композиции, которая содержит мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из п.п. [1]-[13] или фармацевтическую композицию по п. [18].

[25] Применение по п. [23] или способ по п. [24], в котором заболевание представляет собой рак, предпочтительно DLL3-позитивный рак или DLL3-экспрессирующий рак.

[25A] Применение или способ по п. [25], в котором рак представляет собой DLL3-экспрессирующий рак или DLL3-позитивный рак.

[25B] Применение или способ по п. [25A], в котором рак представляет собой рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого) или меланому.

[26] Способ индукции лизиса клетки-мишени, включающий приведение в контакт клетки-мишени с мультиспецифической антигенсвязывающей молекулой по одному из п.п. [1]-[13] или фармацевтической композицией по п. [18] в присутствии Т-клетки.

[27] Набор, включающий композицию по п. [18]; и листовку-вкладыш в упаковку, которая включает инструкции по применению для лечения или замедления развития рака у индивидуума, предпочтительно DLL3-позитивного рака или DLL3-экспрессирующего рака.

[27A] Набор по п. [27], где рак представляет собой рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого) и меланому.

Другим объектом настоящего изобретения является:

[28] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая: антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно; и антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с DLL3, предпочтительно человеческим DLL3.

[29] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [28], в которой антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно, содержит вариабельную область антитела, содержащую любой из следующих вариантов, указанных ниже в п.п. (a1)-(a17):

(a1) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 17, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 31, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 45, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 64, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 69, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 74;

(a2) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 18, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 32, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 46, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a3) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 19, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 33, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a4) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 19, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 33, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 65, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 70, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 75;

(a5) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 20, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 34, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a6) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 22, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 36, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 50, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a7) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 23, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 37, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID

NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

5 (a8) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 23, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 37, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

10 (a9) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 24, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 38, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 52, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

15 (a10) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 25, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 39, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 53, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

20 (a11) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 26, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 40, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 54, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

25 (a12) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 26, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 40, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 54, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

30 (a13) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 27, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 41, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 55, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a14) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 28, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 42, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 56, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a15) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 82, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 83, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 84, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 65, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 70, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 75;

(a16) переменная область антитела, которая связывается с тем же эпитопом, что и любая из переменных областей антитела, выбранная из п.п. (a1)-(a15); и

(a17) переменный фрагмент антитела, который конкурирует за связывание с любым из переменных фрагментов антитела, выбранных из указанных в п.п. (a1)-(a15).

[30] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [28]-[29], в которой антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно, содержит переменную область антитела, содержащую любой из вариантов, указанных ниже в п.п. (a1)-(a17):

(a1) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59;

(a2) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(a3) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(a4) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60;

(a16) переменную область антитела, которая связывается с тем же эпитопом, что и любая из переменных областей антитела, выбранная из указанных в п.п. (a1)-(a15); и

5 (a17) переменный фрагмент антитела, который конкурирует за связывание с любым из переменных фрагментов антитела, выбранных из указанных в п.п. (a1)-(a15).

Следующим объектом настоящего изобретения является:

[31] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит пять полипептидных цепей в любой из комбинаций, выбранных из
10 указанных ниже в п.п.(a1)-(a15):

(a1) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208 (цепь 3), и две
15 полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепь 4 и цепь 5);

(a2) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 203 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209 (цепь 3), и две
20 полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепь 4 и цепь 5);

(a3) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209 (цепь 3), и две
25 полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепь 4 и цепь 5);

(a4) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209 (цепь 3), и две
30

3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепь 4 и цепь 5);

10 цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 212 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 (цепь 4 и цепь 5);

15 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная
цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213 (цепь
3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 215 (цепь 4 и цепь 5);

20 последовательность SEQ ID NO: 226 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная
цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213 (цепь
3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 215 (цепь 4 и цепь 5);

(a14) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 (цепь 4 и цепь 5); и

(a15) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная

цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 231 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 (цепь 4 и цепь 5);

и в которой предпочтительно пять полипептидных цепей (цепь 1-цепь 5)

5 соединены и/или находятся в ассоциации друг с другом в соответствии с ориентацией, показанной на фиг. 1(a).

Следующим объектом настоящего изобретения является:

[32] Антигенсвязывающая молекула, обладающая способностью связываться с DLL3, которая содержит вариабельную область антитела, содержащую любой из вариантов, указанных ниже в п.п. (a1)-(a5):

10 (a1) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 233, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 234, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 235, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 237, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 238, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 239;

(a2) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 276, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 277, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 278, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 279, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 280, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 281;

20 (a3) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 285, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 286, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 287, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 288, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 289, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 290;

(a4) вариабельную область антитела, которая связывается с тем же эпитопом, что и любая из вариабельных областей антитела, выбранная из указанных в п.п. (a1)-(a3); и

30 (a5) вариабельный фрагмент антитела, который конкурирует за связывание с любым из вариабельных фрагментов антитела, выбранных из указанных в п.п. (a1)-(a3).

[33] Антигенсвязывающая молекула, обладающая способностью связываться с DLL3, которая содержит переменную область антитела, содержащую любой из вариантов, указанных ниже в п.п. (a1)-(a6):

(a1) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 232, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236;

(a2) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 264, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 265;

(a3) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 266, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 267;

(a4) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 268, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 269;

(a5) переменную область антитела, которая связывается с тем же эпитопом, что и любая из переменных областей антитела, выбранная из указанных в п.п. (a1)-(a4); и

(a6) переменный фрагмент антитела, который конкурирует за связывание с любым из переменных фрагментов антитела, выбранных из указанных в п.п. (a1)-(a4).

Еще одним объектом настоящего изобретения является:

[2-1] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит:

(a) первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, каждый из которых связывается с человеческим CD3 и содержит переменную область антитела, которая может быть одинаковой или различной и которая независимо выбрана из группы, состоящей из

(a1) переменной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 17, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 31, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 45, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 64, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 69, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 74;

(a2) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 18, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 32, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 46, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой
5 цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a3) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 19, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 33, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой
10 цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a4) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 19, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 33, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 65, CDR 2 легкой
15 цепи, имеющий SEQ ID NO: 70, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 75;

(a5) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 20, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 34, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой
20 цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a6) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 22, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 36, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 50, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой
25 цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a7) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 23, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 37, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой
30 цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a8) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 23, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 37, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий

SEQ ID NO: 51, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

(a9) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 24, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 38, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 52, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a10) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 25, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 39, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 53, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

(a11) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 26, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 40, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 54, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

(a12) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 26, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 40, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 54, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a13) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 27, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 41, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 55, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a14) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 28, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 42, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 56, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

и

(a15) варибельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 82, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 83, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 84, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 65, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 70, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 75;
и

(б) третий антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с человеческим дельта-подобным 3 (DLL3) и содержит варибельную область антитела, которая содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 233, CDR 2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 234, CDR 3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 235, CDR 1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 237, CDR 2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 238, и CDR 3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 239.

[2-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [2-1], в которой каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов содержит варибельную область антитела, которая может быть одинаковой или различной и которая независимо выбрана из группы, состоящей из

(a1) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59;

(a2) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(a3) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(a4) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60;

(a5) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(a6) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

5 (a7) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(a8) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

10 (a9) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(a10) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и вариабельной области легкой цепи, 15 содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(a11) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

20 (a12) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(a13) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

25 (a14) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; и

(a15) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и вариабельной области легкой цепи, 30 содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

[2-2A] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [2-1]-[2-2], в которой первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент каждый содержит вариабельную область

антитела, содержащую определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 20, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 34, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73.

[2-2Б] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.[2-2А], в которой первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент каждый содержит переменную область антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

[2-2В] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [2-1]-[2-2Б], в которой третий антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область антитела, содержащую VH, которая содержит SEQ ID NO: 232, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 236.

[2-3] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [2-1]-[2-2В], в которой каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов представляет собой Fab, который имеет остаток цистеина в положении 191 (EU-нумерация), и в которой присутствует дисульфидная связь, соединяющая два остатка цистеина.

[2-4] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [2-3], в которой каждый из первого, второго и третьего антигенсвязывающих фрагментов представляет собой Fab, который содержит тяжелую цепь, содержащую VH и CH1-домен, и легкую цепь, содержащую VL и константный домен легкой цепи (CL), и в которой С-конец тяжелой цепи третьего антигенсвязывающего фрагмента слит непосредственно или через пептидный линкер с N-концом тяжелой цепи Fab либо первого антигенсвязывающего фрагмента, либо второго антигенсвязывающего фрагмента.

[2-5] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [2-4], в которой С-конец тяжелой цепи третьего антигенсвязывающего фрагмента слит через пептидный линкер с N-концом тяжелой цепи Fab либо первого антигенсвязывающего фрагмента, либо второго антигенсвязывающего фрагмента, и в которой пептидный линкер имеет аминокислотную

последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249 и SEQ ID NO: 259.

[2-6] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [2-5], в которой в CL-домене каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислоты в положениях 123 и 124 (нумерация Кэбота) представляют собой аргинин и лизин соответственно; и в которой в CH1-домене каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислота в каждом из положений 147 и 213 (EU-нумерация) представляет собой глутаминовую кислоту.

[2-7] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [2-6], дополнительно содержащая Fc-домен.

[2-8] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [2-7], в которой Fc-домен содержит первую и вторую субъединицы Fc-области, в которой первая субъединица Fc-области выбрана из группы, состоящей из:

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234 и 235;

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297;

и

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297, цистеин в положении 354 и триптофан в положении 366; и

вторая субъединица Fc-области выбрана из группы, состоящей из:

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234 и 235;

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297; и

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297, цистеин в положении 349, серин в положении 366, аланин в положении 368 и валин в положении 407,

где нумерация всех положений соответствует EU-нумерации.

Еще одним объектом настоящего изобретения является:

[3-1] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит:

(а) первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, каждый из которых связывается с человеческим CD137 и содержит переменную область антитела, которая может быть одинаковой или различной и которая независимо выбрана из группы, состоящей из

- 5 (а1) переменной области антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 17, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 31, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 45, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 64, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 69, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 74;
- 10 (а2) переменной области антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 18, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 32, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 46, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;
- 15 (а3) переменной области антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 19, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 33, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;
- 20 (а4) переменной области антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 19, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 33, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 65, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 70, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 75;
- 25 (а5) переменной области антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 20, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 34, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;
- 30 (а6) переменной области антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 22, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 36, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий

SEQ ID NO: 50, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a7) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 23, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 37, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a8) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 23, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 37, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

(a9) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 24, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 38, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 52, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a10) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 25, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 39, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 53, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

(a11) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 26, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 40, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 54, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

(a12) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 26, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 40, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 54, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a13) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 27, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 41, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 55, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a14) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 28, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 42, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 56, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73; и

(a15) вариабельной области антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 82, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 83, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 84, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 65, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 70, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 75; и

(б) третий антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с человеческим дельта-подобным 3 (DLL3) и содержит вариабельную область антитела, которая содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 233, CDR 2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 234, CDR 3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 235, CDR 1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 237, CDR 2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 238, и CDR 3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 239.

[3-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [3-1], в которой каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов содержит вариабельную область антитела, которая может быть одинаковой или различной и которая независимо выбрана из группы, состоящей из

(a1) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59;

(a13) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

5 (a14) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; и

(a15) варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

10 [3-2A] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [3-1]-[3-2], в которой первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент каждый содержит варибельную область антитела, содержащую определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 20, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 15 34, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73.

[3-2Б] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.[3-2A], в которой первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий 20 фрагмент каждый содержит варибельную область антитела, содержащую варибельную область тяжелой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и варибельную область легкой цепи, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

25 [3-2B] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [3-1]-[3-2Б], в которой третий антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельную область антитела, содержащую VH, которая содержит SEQ ID NO: 232, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 236.

30 [3-3] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. [3-1]-[3-2B], в которой каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов представляет собой Fab, который имеет остаток цистеина в положении 191 (EU-нумерация), и в которой присутствует дисульфидная связь, соединяющая два остатка цистеина.

[3-4] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [3-3], в которой каждый из первого, второго и третьего антигенсвязывающих фрагментов представляет собой Fab, который содержит тяжелую цепь, содержащую VH и CH1-домен, и легкую цепь, содержащую VL и константный домен легкой цепи (CL), и в которой С-конец тяжелой цепи третьего антигенсвязывающего фрагмента слит непосредственно или через пептидный линкер с N-концом тяжелой цепи Fab либо первого антигенсвязывающего фрагмента, либо второго антигенсвязывающего фрагмента.

[3-5] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [3-4], в которой С-конец тяжелой цепи третьего антигенсвязывающего фрагмента слит через пептидный линкер с N-концом тяжелой цепи Fab либо первого антигенсвязывающего фрагмента, либо второго антигенсвязывающего фрагмента, и в которой пептидный линкер имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249 и SEQ ID NO: 259.

[3-6] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [3-5], в которой в CL-домене каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислоты в положениях 123 и 124 (нумерация Кэбота) представляют собой аргинин и лизин соответственно; и в которой в CH-домене каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислота в каждом из положений 147 и 213 (EU-нумерация) представляет собой глутаминовую кислоту.

[3-7] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [3-6], дополнительно содержащая Fc-домен.

[3-8] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [3-7], в которой Fc-домен содержит первую и вторую субъединицы Fc-области, в которой первая субъединица Fc-области выбрана из группы, состоящей из:

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234 и 235;

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297;

и

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297, цистеин в положении 354 и триптофан в положении 366; и вторая субъединица Fc-области выбрана из группы, состоящей из:

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234 и 235;

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297; и

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297, цистеин в положении 349, серин в положении 366, аланин в положении 368 и валин в положении 407,

где нумерация всех положений соответствует EU-нумерации.

Еще одним объектом настоящего изобретения является:

[4-1] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит:

(а) первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, каждый из которых связывается с человеческим CD3 и содержит переменную область антитела, которая может быть одинаковой или различной и которая независимо выбрана из группы, состоящей из указанных в п.п. (a1)-(a15):

(a1) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 17, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 31, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 45, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 64, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 69, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 74;

(a2) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 18, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 32, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 46, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a3) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 19, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 33, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий

SEQ ID NO: 47, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a4) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 19, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 33, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 65, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 70, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 75;

(a5) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 20, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 34, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a6) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 22, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 36, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 50, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a7) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 23, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 37, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a8) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 23, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 37, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

(a9) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарный участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 24, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 38, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 52, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a10) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 25, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 39, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 53, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

(a11) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 26, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 40, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 54, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

(a12) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 26, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 40, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 54, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a13) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 27, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 41, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 55, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a14) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 28, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 42, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 56, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

и

(a15) переменная область антитела, которая содержит определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 82, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 83, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 84, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 65, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 70, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 75;

и

(б) третий антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с человеческим дельта-подобным 3 (DLL3) и содержит переменную область антитела, которая содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 233, CDR 2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 234, CDR 3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 235, CDR 1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 237, CDR 2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 238, и CDR 3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 239.

[4-2] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит: а) первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, каждый из которых содержит переменную область антитела, которая может быть одинаковой или различной и которая независимо выбрана из группы, состоящей из

(a1) переменной области антитела, содержащей переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 59;

(a2) переменной области антитела, содержащей переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 4, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 58;

(a3) переменной области антитела, содержащей переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 58;

(a4) переменной области антитела, содержащей переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 60;

(a5) переменной области антитела, содержащей переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 58;

(a6) переменной области антитела, содержащей переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 58;

(a7) переменной области антитела, содержащей переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 58;

(a8) вариабельной области антитела, содержащей вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 61;

5 (a9) вариабельной области антитела, содержащей вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 10, и вариабельную область легкой цепи (VL), SEQ ID NO: 58;

(a10) вариабельной области антитела, содержащей вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 61;

10 (a11) вариабельной области антитела, содержащей вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 61;

(a12) вариабельной области антитела, содержащей вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 12, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 58;

(a13) вариабельной области антитела, содержащей вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 58;

20 (a14) вариабельной области антитела, содержащей вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 58; и

(a15) вариабельной области антитела, содержащей вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит SEQ ID NO: 81, и вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит SEQ ID NO: 60;

25 и

(б) третий антигенсвязывающий фрагмент, который содержит вариабельную область антитела, которая содержит VH, содержащую SEQ ID NO: 232, и VL, содержащую SEQ ID NO: 236.

[4-3] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-1], в
30 которой вариабельные области первого и второго антигенсвязывающих фрагментов антитела идентичны.

[4-4] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-2], в которой вариабельные области первого и второго антигенсвязывающих фрагментов антитела идентичны.

5 [4-5] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-3], в которой каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов представляет собой Fab, который имеет остаток цистеина в положении 191 (EU-нумерация), и в которой присутствует дисульфидная связь, соединяющая эти два остатка цистеина.

10 [4-6] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-4], в которой каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов представляет собой Fab, который имеет остаток цистеина в положении 191 (EU-нумерация), и в которой присутствует дисульфидная связь, соединяющая эти два остатка цистеина.

15 [4-7] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-5], в которой каждый из первого, второго и третьего антигенсвязывающих фрагментов имеет форму Fab, который содержит VH, VL, CH1-домен и константный домен легкой цепи (CL), и в которой С-конец CH1-домена третьего антигенсвязывающего фрагмента слит непосредственно или через пептидный линкер с N-концом VH либо первого антигенсвязывающего фрагмента, либо
20 второго антигенсвязывающего фрагмента.

[4-8] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-6], в которой каждый из первого, второго и третьего антигенсвязывающих фрагментов имеет форму Fab, который содержит CH1-домен и константный домен легкой цепи (CL), и в которой С-конец CH1-домена третьего
25 антигенсвязывающего фрагмента слит непосредственно или через пептидный линкер с N-концом VH либо первого антигенсвязывающего фрагмента, либо второго антигенсвязывающего фрагмента.

[4-9] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-7], в которой слияние происходит через пептидный линкер, содержащий
30 аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249 и SEQ ID NO: 259.

[4-10] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-8], в которой слияние происходит через пептидный линкер, содержащий

аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249 и SEQ ID NO: 259.

5 [4-11] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-9], в которой третий антигенсвязывающий фрагмент представляет собой кроссовер-Fab, в котором VH сцеплена с CL-доменом и VL сцеплена с CH1-доменом и в которой каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов представляет собой канонический Fab, в котором VH сцеплена с CH1-доменом и VL-сцеплена с CL-доменом.

10 [4-12] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-10], в которой третий антигенсвязывающий фрагмент представляет собой кроссовер-Fab, в котором VH сцеплена с CL-доменом и VL сцеплена с CH1-доменом, и в которой каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов представляет собой канонический Fab, в котором VH сцеплена с CH1-доменом и VL-сцеплена с CL-доменом.

15 [4-13] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-11], в которой в CL-домene каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислоты в положениях 123 и 124 (нумерация Кэбота) представляют собой аргинин и лизин соответственно; и в которой в CH1-домene каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислота в
20 каждом из положений 147 и 213 (EU-нумерация) представляет собой глутаминовую кислоту.

[4-14] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-12], в которой в CL-домene каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислоты в положениях 123 и 124 (нумерация Кэбота)
25 представляют собой аргинин и лизин соответственно; и в которой в CH1-домene каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислота в каждом из положений 147 и 213 (EU-нумерация) представляет собой глутаминовую кислоту.

[4-15] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-13],
30 дополнительно содержащая Fc-домен.

[4-16] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-14], дополнительно содержащая Fc-домен.

[4-17] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-15], в которой Fc-домен содержит первую и вторую субъединицы Fc-области, в которой первая субъединица Fc-области выбрана из группы, состоящей из:

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234 и 235;

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297;

и

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297, цистеин в положении 354 и триптофан в положении 366; и вторая субъединица Fc-области выбрана из группы, состоящей из:

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234 и 235;

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297; и

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297, цистеин в положении 349, серин в положении 366, аланин в положении 368 и валин в положении 407,

где нумерация всех положений соответствует EU-нумерации.

[4-18] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-16], в которой Fc-домен содержит первую и вторую субъединицы Fc-области, в которой первая субъединица Fc-области выбрана из группы, состоящей из:

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234 и 235;

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297;

и

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297, цистеин в положении 354 и триптофан в положении 366; и вторая субъединица Fc-области выбрана из группы, состоящей из:

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234 и 235;

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297; и

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297, цистеин в положении 349, серин в положении 366, аланин в

5 положении 368 и валин в положении 407,

где нумерация всех положений соответствует EU-нумерации.

[4-19] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит пять полипептидов в комбинации, выбранной из группы, которая состоит из указанных ниже в п.п. А-П:

10 (А) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепь 4 и цепь 5);

15 (Б) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 203 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепи 4 и 5);

20 (В) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепи 4 и 5);

25 (Г) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепи 4 и 5);

30 (Д) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепи 4 и 5);

5 полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 214 (цепи 4 и 5);

10 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 210 (цепь 3), и две
полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 214 (цепи 4 и 5);

15 последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211 (цепь 3), и две
полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 214 (цепи 4 и 5);

20 SEQ ID NO: 220 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепи 4 и 5);

25 (И) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 221 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211 (цепь 3), и две
полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную
30 последовательность SEQ ID NO: 214 (цепи 4 и 5);

(K) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая

[4-20] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-19], которая содержит полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 203 (цепь 1), полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209 (цепь 3), и две полипептидные цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепи 4 и 5).

[4-21] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-19], которая содержит полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204 (цепь 1), полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209 (цепь 3), и две полипептидные цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепи 4 и 5).

[4-22] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-19], которая содержит полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205 (цепь 1), полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209 (цепь 3), и две полипептидные цепи, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепи 4 и 5).

[4-23] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит:

(а) первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, каждый из которых связывается с человеческим CD3 и содержит переменную область антитела, которая содержит CDR 1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 20, CDR 2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 34, CDR 3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 73;

и

(б) третий антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с человеческим DLL3 и содержит переменную область антитела, которая

содержит CDR 1 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 233, CDR 2 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 234, CDR 3 тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 235, CDR 1 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 237, CDR 2 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 238, и CDR 3 легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 239.

[4-24] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-23], в которой переменная область антитела каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов содержит VH, которая содержит SEQ ID NO: 6, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 58; и переменная область антитела третьего антигенсвязывающего фрагмента содержит VH, которая содержит SEQ ID NO: 232, и VL, которая содержит SEQ ID NO: 236.

[4-25] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-24], в которой каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов представляет собой Fab, который имеет остаток цистеина в положении 191 (EU-нумерация), и в которой присутствует дисульфидная связь, соединяющая эти два остатка цистеина.

[4-26] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-25], в которой каждый из первого, второго и третьего антигенсвязывающих фрагментов имеет форму Fab, который содержит VH, VL, CH1-домен и CL-домен, и в которой С-конец CH1-домена третьего антигенсвязывающего фрагмента слит непосредственно или через пептидный линкер с N-концом VH либо первого антигенсвязывающего фрагмента, либо второго антигенсвязывающего фрагмента.

[4-27] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-26], в которой слияние происходит через пептидный линкер, содержащий аминокислотную последовательность, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249 и SEQ ID NO: 259.

[4-28] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-27], в которой третий антигенсвязывающий фрагмент представляет собой кроссовер-Fab, в котором VH сцеплена с CL-доменом и VL сцеплена с CH1-доменом, и в которой каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов представляет собой канонический Fab, в котором VH сцеплена с CH1-доменом и VL-сцеплена с CL-доменом.

[4-29] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-28], в которой в CL-домене каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислоты в положениях 123 и 124 (нумерация Кэбота) представляют собой аргинин и лизин соответственно; и в которой в CH1-домене каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислота в каждом из положений 147 и 213 (EU-нумерация) представляет собой глутаминовую кислоту.

[4-30] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-29], дополнительно содержащая Fc-домен.

[4-31] Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. [4-30], в которой Fc-домен содержит первую и вторую субъединицы Fc-области, в которой первая субъединица Fc-области выбрана из группы, состоящей из:

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234 и 235;

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297;

и

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297, цистеин в положении 354 и триптофан в положении 366; и

в которой вторая субъединица Fc-области выбрана из группы, состоящей из:

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234 и 235;

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297; и

полипептида Fc-области, содержащего аланин в каждом из положений 234, 235 и 297, цистеин в положении 349, серин в положении 366, аланин в положении 368 и валин в положении 407,

где нумерация всех положений соответствует EU-нумерации.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 – строение и правило обозначения а) трехвалентного Ат в формате DUAL/LINC (1+2), б) биспецифического Ат в каноническом формате Ат и в) биспецифического Ат в BiTE-формате;

на фиг. 2 – данные о TDCC-активности антител в отношении клеточных линий SK-MEL30. а) Сравнение TDCC при использовании биспецифических форматов DUAL/LINC и CD3. б) Влияние длины линкера на цитотоксичность;

на фиг. 3 – данные об эффективности *in vivo* антител в отношении ксенотрансплантатов NCI-H1436 на мышинной модели huNOG. На Y-оси отложен объем опухолей (мм³), а на X-оси отложены дни после имплантации опухолей;

на фиг. 4 – результаты анализа инфильтрации CD8 Т-клеток. Опухоли собирали в указанные моменты времени после инъекции антител и анализировали инфильтрацию Т-клеток с помощью проточного цитометра;

на фиг. 5 – результаты анализа маркеров истощения на CD8 Т-клетках. Опухоли собирали в день 7 после инъекции антител и анализировали экспрессию маркеров истощения с помощью проточного цитометра;

на фиг. 6 – схематическое изображение структур белков полноразмерного человеческого DLL3 и ECD-фрагментов человеческого DLL3. Показан также эпитоп, распознаваемый каждым из антител к DLL3. EGF-домен имеет шесть областей, EGF1-EGF6, в направлении от N-концевой стороны к С-концевой стороне.

Описание вариантов осуществления изобретения

Технологии и процедуры, которые описаны или на которые сделаны ссылки в настоящем описании, в целом хорошо известны специалистам в данной области, и их широко применяют с использованием общепринятых методологий, таких, например, как описанные у Sambrook и др., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; Current Protocols in Molecular Biology (под ред. F.M. Ausubel и др., 2003); серии Methods in Enzymology (изд-во Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (под ред. M.J. MacPherson, B.D. Hames и G.R. Taylor, 1995), Antibodies, A Laboratory Manual, под ред. Harlow и Lane, 1988 и Animal Cell Culture (под ред. R.I. Freshney, 1987); Oligonucleotide Synthesis (под ред. M.J. Gait, 1984); Methods in Molecular Biology, изд-во Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (под ред. J.E. Cellis, 1998) из-во Academic Press; Animal Cell Culture (под ред. R.I. Freshney, 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather и P.E. Roberts, 1998), изд-во Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (под ред. A. Doyle, J.B. Griffiths и D.G. Newell, 1993-8),

- изд-во J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (под ред. D.M. Weir и C.C. Blackwell); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (под ред. J.M. Miller и M.P. Calos, 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (под ред. Mullis и др., 1994); Current Protocols in Immunology (под ред. J.E. Coligan и др., 1991);
- 5 Short Protocols in Molecular Biology (изд-во Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway и P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (под ред. D. Catty., изд-во IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (под ред. P. Shepherd и C. Dean, изд-во Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E.
- 10 Harlow и D. Lane, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (под ред. M. Zanetti и J. D. Capra, изд-во Harwood Academic Publishers, 1995); и Cancer: Principles and Practice of Oncology (под ред. V.T. DeVita и др., изд-во J.B. Lippincott Company, 1993).

Представленные ниже с целью иллюстрации определения и подробное

15 описание даны для облегчения понимания настоящего изобретения.

Определения

Аминокислоты

В настоящем описании для обозначения аминокислот применяли одно- или трехбуквенные коды или оба обозначения, например, Ala/A, Leu/L, Arg/R, Lys/K,

20 Asn/N, Met/M, Asp/D, Phe/F, Cys/C, Pro/P, Gln/Q, Ser/S, Glu/E, Thr/T, Gly/G, Trp/W, His/H, Tyr/Y, Ile/I или Val/V.

Изменение аминокислот

Для аминокислотного изменения (обозначаемого также в настоящем описании как «аминокислотная замена» или «аминокислотная мутация») в

25 аминокислотной последовательности антигенсвязывающей молекулы можно применять известные методы, такие как сайтнаправленный мутагенез (Kunkel и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1985, сс. 488-492)) и ПЦР с перекрывающимися праймерами. Кроме того, можно применять также несколько известных методов в качестве методов аминокислотного изменения для замены

30 на не встречающиеся в естественных условиях аминокислоты (Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35, 2006, сс. 225-249 и Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (11), 2003, сс. 6353-6357). Например, можно применять бесклеточную систему трансляции (Clover Direct (фирма Protein Express)), которая содержит тРНК,

несущую не встречающуюся в естественных условиях аминокислоту, связанную с комплементарной амбер-супрессорной тРНК одного из стоп-кодонов, UAG-кодона (амбер-кодон).

В настоящем описании значение понятия «и/или», применяемого для описания сайта аминокислотного изменения, включает каждую из комбинаций, в которой можно объединять «и» и «или». Например, в частности, понятие «заменены аминокислоты в положениях 33, 55 и/или 96» включает следующие варианты аминокислотных изменений: аминокислота(ы) в (а) положении 33, (б) положении 55, (в) положении 96, (г) положениях 33 и 55, (д) положениях 33 и 96, (е) положениях 55 и 96 и (ж) положениях 33, 55 и 96.

Кроме того, в настоящем описании в качестве обозначения, характеризующего изменения аминокислот, можно применять соответственно обозначение, в котором перед и после номера конкретного положения указаны однобуквенные или трехбуквенные коды аминокислот до и после изменения соответственно. Например, обозначение N100bL или Asn100bLeu используют для описания замены содержащейся в варибельной области антитела аминокислоты Asn в положении 100b (согласно нумерации Кэбота) на Leu. Таким образом, написанный перед номером аминокислотного положения согласно нумерации Кэбота однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты обозначает аминокислоту до замены, а написанный после номера однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты обозначает аминокислоту после замены. Аналогично этому, изменение P238D или Pro238Asp, которое используют для обозначения замены аминокислоты в Fc-области, содержащейся в константной области антитела, означает замену Pro в положении 238 (согласно EU-нумерации) на Asp. Таким образом, написанный перед номером номера аминокислотного положения согласно EU-нумерации однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты обозначает аминокислоту до замены, а написанный после номера однобуквенный или трехбуквенный код аминокислоты обозначает аминокислоту после замены.

Полипептиды

В контексте настоящего описания понятие «полипептид» относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (которые называют также пептидными связями). Понятие

«полипептид» относится к любой цепи, состоящей из двух или большего количества аминокислот, и не относится к конкретной длине продукта. Так, «пептиды», «дипептиды», «трипептиды», «олигопептиды», «белок», «аминокислотная цепь» или любое другое понятие, применяемое для обозначения цепи, состоящей из двух или большего количества аминокислот, подпадает под определение «полипептид» и понятие «полипептид» можно использовать вместо или взаимозаменяемо с любым из указанных понятий. Подразумевается также, что понятие «полипептид» относится к продуктам пост-экспрессионных модификаций полипептида, включая (но не ограничиваясь только ими) гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитическое расщепление или модификацию с помощью не встречающихся в естественных условиях аминокислот. Полипептид может иметь происхождение из естественного биологического источника или его можно получать методом рекомбинации, но он необязательно транслируется с созданной нуклеотидной последовательности. Его можно создавать любым методом, включая химический синтез. Полипептид, указанный в настоящем описании, может иметь размер, составляющий примерно 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 25 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 200 или более, 500 или более, 1000 или более или 2000 или более аминокислот. Полипептиды могут иметь трехмерную структуру, хотя они необязательно имеют указанную структуру. Полипептиды с определенной трехмерной структурой называют уложенными (т.е. имеющими укладку), а полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой, а скорее могут принимать большое количество различных конформаций, называют неуложенными

Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности

«Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» относительно полипептидной референс-последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-последовательности, после выравнивая последовательностей и при необходимости интродукции брешей для достижения максимального процента

идентичности последовательностей, и не рассматривая какие-либо консервативные замены в качестве компонента при оценке идентичности последовательностей. Сравнительный анализ для целей определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, известными в данной области, используя, например, публично доступные компьютерные программы, такие как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определять соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей настоящего изобретения величины % идентичности аминокислотных последовательностей получали, применяя компьютерную программу для сравнения последовательностей ALIGN-2. Авторство компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2 принадлежит фирме Genentech, Inc., и исходный код был представлен в комплекте с документацией для пользователей в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован как U.S. Copyright Registration № TXU510087. Программа ALIGN-2 публично доступна от фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, шт. Калифорния, или ее можно компилировать на основе исходного кода. Программу ALIGN-2 можно компилировать для применения в операционной системе UNIX, включая цифровую систему UNIX V4.0D. Все параметры, требуемые для сравнения последовательностей, устанавливаются программой ALIGN-2 и не должны изменяться. В ситуациях, в которых ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотных последовательностей данной аминокислотной последовательности А по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б или относительно нее (что в альтернативном варианте можно обозначать как то, что данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б или относительно нее), рассчитывают следующим образом: $100 \times \text{дробь } X/Y$,

где X обозначает количество аминокислотных остатков, определенных как идентичные совпадения при оценке с помощью программы для сравнительного анализа последовательностей ALIGN-2, когда с помощью программы осуществляли выравнивание A и B, и где Y обозначает общее количество аминокислотных остатков в B. Должно быть очевидно, что, если длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, то % идентичности аминокислотных последовательностей A относительно B не может быть равен % идентичности аминокислотной последовательности B относительно A. Если специально не указано иное, то все величины % идентичности аминокислотных последовательностей, указанные в настоящем описании, получали с использованием описанной в предыдущем параграфе компьютерной программы ALIGN-2.

Методы рекомбинации и композиции

Антитела и антигенсвязывающие молекулы можно получать, используя методы рекомбинации и композиции, например, описанные в патенте США № 4816567. Одним из вариантов осуществления изобретения является выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, представленное в настоящем описании. Указанная нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкие и/или тяжелые цепи антитела). Следующим вариантом осуществления изобретения является(ются) один или несколько векторов (например, экспрессионных векторов), который(е) содержит(ат) указанную нуклеиновую кислоту. Еще одним вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, которая содержит указанную нуклеиновую кислоту. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин содержит (например, в результате трансформации указанными векторами): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную

последовательность, содержащую VN антитела. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, например, клетку яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидную клетку (например, Y0-, NS0-, Sp20-клетку). Одним из вариантов осуществления изобретения является способ получения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, где способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело, описанное выше, в условиях, пригодных для экспрессии антитела, и необязательно выделение антитела из клетки-хозяина (или среды для культивирования клетки-хозяина).

Для рекомбинантного получения антитела, представленного в настоящем описании, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, описанное выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Указанную нуклеиновую кислоту легко можно выделять и секвенировать с помощью общепринятых процедур (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые обладают способностью специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела).

Приемлемые клетки-хозяева для клонирования или экспрессии кодирующих антитело векторов включают прокариотические или эукариотические клетки, представленные в настоящем описании. Например, антитела можно получать в бактериях, в частности, когда не требуются гликозилирование и связанная с Fc эффекторная функция. Сведения об экспрессии фрагментов антитела и полипептидов в бактериях см. например, в патентах США №№ 5648237, 5789199 и 5840523 (см. также у Charlton в: *Methods in Molecular Biology*, под ред. Lo B.K.C., изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 245-254 описание экспрессии фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессии антитело можно выделять из пасты бактериальных клеток в виде растворимой фракции и дополнительно очищать.

Помимо прокариотических организмов в качестве хозяев, пригодных для клонирования или экспрессии векторов, которые кодируют антитела, можно использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых

были «гуманизированы», что позволяет получать антитело с частично или полностью человеческой схемой гликозилирования (см. Gerngross, Nat. Biotech. 22, 2004, сс. 1409-1414 и Li и др., Nat. Biotech. 24, 2006, сс. 210-215).

Клетки-хозяева, которые можно использовать для экспрессии
5 гликозилированного антитела, получают также из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных животных). Примерами клеток беспозвоночных являются клетки насекомых, а также можно применять клетки растений. Были выявлены многочисленные штаммы бакуловирусов и соответствующие
10 пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, прежде всего для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

В качестве хозяев можно применять также культуры растительных клеток (см., например, патенты США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описание технологии PLANTIBODIESTM для получения антител в трансгенных растениях).

15 В качестве хозяев можно применять также клетки позвоночных животных. Например, можно использовать клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Другими примерами приемлемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная с помощью OB40 (COS-7); линия клеток почки эмбриона
20 человека (HEK 293-клетки или клетки линии 293, описанные, например, у Graham и др., J. Gen. Virol., 36, 1977, с. 59); клетки почки детеныша хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (TM4-клетки, описанные, например, у Mather, Biol. Reprod., 23, 1980, сс. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки
25 человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, у Mather и др., Annals N.Y. Acad. Sci., 383, 1982, сс. 44-68); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другими ценными линиями клеток-хозяев млекопитающих
30 являются клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая DHFR⁻-CHO-клетки (Urlaub и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, с. 4216); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор конкретных линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно применять для производства антител,

см., например, у Yazaki и Wu, в: Methods in Molecular Biology под ред. В.К.С. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268.

Рекомбинантное получение антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем описании, можно осуществлять с помощью методов, аналогичных описанным выше, с использованием клетки-хозяина, которая содержит (например, трансформирована) один или несколько векторов, содержащих нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую полную антигенсвязывающую молекулу или часть антигенсвязывающей молекулы.

Антигенсвязывающая молекула и мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы

Понятие «антигенсвязывающая молекула» в контексте настоящего описания относится к любой молекуле, которая содержит антигенсвязывающий центр, или к любой молекуле, которая обладает связывающей активностью в отношении антигена, и может относиться также к таким молекулам как пептид или белок, состоящий примерно из пяти или большего количества аминокислот. Пептид и белок не ограничены имеющими происхождение из живого организма, и, например, могут представлять собой полипептид, полученный из искусственно созданной последовательности. Они могут представлять собой также любой полипептид, выбранный из встречающегося в естественных условиях полипептида, синтетического полипептида, рекомбинантного полипептида и т.п. Кроме того, одним из вариантов указанной в настоящем описании антигенсвязывающей молекулы являются каркасные молекулы, которые содержат известную стабильную конформационную структуру, такую как альфа/бета-бочка (-баррель), в качестве каркаса, и в которых часть молекулы входит в состав антигенсвязывающего центра.

Понятие «мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы» относится к антигенсвязывающим молекулам, которые связываются специфически с несколькими антигенами. Понятие «биспецифическая» означает, что антигенсвязывающая молекула обладает способностью специфически связываться по меньшей мере с двумя различными антигенными детерминантами. Понятие «триспецифическая» означает, что антигенсвязывающая молекула обладает способностью специфически

связываться по меньшей мере с тремя различными антигенными детерминантами. В конкретных вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, указанная в настоящем описании, представляет собой триспецифическую антигенсвязывающую молекулу, т.е. она обладает способностью специфически связываться с тремя различными антигенами: она обладает способностью связываться либо с CD3, либо с CD137, но не связывается одновременно с обоими антигенами, и обладает способностью специфически связываться с DLL3.

Первым объектом настоящего изобретения является мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая: первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, каждый из которых обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно; и третий антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с третьим антигеном, предпочтительно антигеном, который экспрессируется в раковой клетке/ткани. В конкретных вариантах осуществления изобретения третий антиген, связывающийся третьим антигенсвязывающим фрагментом, представляет собой DLL3 и предпочтительно человеческий DLL3.

Первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент могут представлять собой «антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью (Dual)», который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не одновременно, что более подробно будет описано ниже. Третий антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой «связывающий антиген DLL3 фрагмент», что более подробно будет описано ниже.

В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый из первого антигенсвязывающего фрагмента и второго антигенсвязывающего фрагмента представляет собой молекулу Fab и содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь, образованную между СН1-участком первого антигенсвязывающего фрагмента и СН1-участком второго антигенсвязывающего фрагмента. Дисульфидная связь может быть образована между аминокислотными остатками в положении 191 согласно EU-нумерации в соответствующем СН1-участке первого антигенсвязывающего фрагмента и второго антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления изобретения третий антигенсвязывающий фрагмент, который может представлять собой Fab или scFv, слит с любым либо первым антигенсвязывающим фрагментом, либо вторым антигенсвязывающим фрагментом. В случае, когда каждый из первого, 5 второго и третьего антигенсвязывающего фрагмента представляет собой молекулу Fab, третий антигенсвязывающий фрагмент может быть слит на С-конце тяжелой цепи Fab (CH1) с N-концом тяжелой цепи Fab либо первого антигенсвязывающего фрагмента, либо второго антигенсвязывающего фрагмента, необязательно через пептидный линкер. Репрезентативные 10 пептидные линкеры включают линкеры, состоящие из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249 или SEQ ID NO: 259. В конкретных вариантах осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент идентичен второму антигенсвязывающему фрагменту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения третий 15 антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу кроссовер-Fab, в которой переменные области легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab обменены и в которой каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов представляет собой молекулу канонического Fab.

В некоторых вариантах осуществления в константном домене CL легкой 20 цепи каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислота(ы) в положении 123 и/или 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в которой в константном домене CH1 тяжелой цепи каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислота в положении 147 и/или 25 аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-нумерации).

В других вариантах осуществления изобретения в константном домене CL легкой цепи каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов 30 аминокислоты в положениях 123 и 124 представляют собой аргинин (R) и лизин (K) соответственно (нумерация согласно Кэботу) и в константном домене CH1 тяжелой цепи каждого из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислоты в положениях 147 и 213 представляют собой глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-нумерации).

Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула может дополнительно содержать Fc-домен, что подробно будет описано ниже. В случае, когда каждый из первого и второго антигенсвязывающих фрагментов представляет собой Fab, первый антигенсвязывающий фрагмент может быть
5 слит на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом первой или второй субъединицы Fc-домена, а второй антигенсвязывающий фрагмент может быть слит на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом оставшейся субъединицы Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления изобретения третий антигенсвязывающий фрагмент слит на С-конце с N-концом тяжелой цепи Fab либо первого
10 антигенсвязывающего фрагмента, либо второго антигенсвязывающего фрагмента, необязательно через пептидный линкер.

Другим объектом настоящего изобретения является указанная в настоящем описании мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит: антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью
15 связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно; и антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с DLL3, предпочтительно человеческим DLL3. В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не
20 может связываться с CD3 и CD137 одновременно, представляет собой «антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью», обладающий способностью связываться с CD3 и CD137, но не одновременно, который подробно описан ниже.

Компоненты мультиспецифических антигенсвязывающих молекул,
25 предлагаемых в настоящем изобретении, можно сливать друг с другом в различных конфигурациях. Примеры конфигурацией представлены на фиг. 1(а), их следует рассматривать в сочетании с таблицами 10-1 – 10-3.

Согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения компоненты мультиспецифических антигенсвязывающих молекул (например,
30 антигенсвязывающий фрагмент, Fc-домен) можно сливать непосредственно или через различные линкеры, прежде всего пептидные линкеры, которые содержат одну или несколько аминокислот, как правило, примерно 2-20 аминокислот, которые указаны в настоящем описании или известны в данной области.

Предпочтительно неиммуногенные пептидные линкеры включают, например, пептидные линкеры (G4S)_n, (SG4)_n, (G4S)_n или G4(SG4)_n, в которых n, как правило, обозначает число от 1 до 10, как правило, от 2 до 4.

Пироглутамилирование

5 Известно, что, когда антитело экспрессируется в клетках, то антитело модифицируется после трансляции. Примеры пост-трансляционной модификации включают отщепление лизина на С-конце тяжелой цепи с помощью карбоксипептидазы; модификацию глутамина или глутаминовой кислоты на N-конце тяжелой цепи и легкой цепи в пироглутаминовую кислоту
10 путем пироглутамилирования; гликозилирование; окисление; деаμιдирование; и гликирование, и известно, что такие пост-трансляционные модификации встречаются в различных антителах (Journal of Pharmaceutical Sciences, т. 97, 2008, сс. 2426-2447).

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифические
15 антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, включают также пост-трансляционную модификацию. Примеры пост-трансляционной модификации включают пироглутамилирование на N-конце вариабельной области тяжелой цепи и/или делецию лизина на С-конце тяжелой цепи. В данной области известно, что такая пост-трансляционная модификация,
20 представляющая собой пироглутамилирование на N-конце и делецию лизина на С-конце, не оказывает никакого влияния на активность антитела (Analytical Biochemistry, т. 348, 2006, с.с. 24-39).

Антигенсвязывающий фрагмент

В контексте настоящего описания понятие «антигенсвязывающий
25 фрагмент» относится к полипептидной молекуле, которая специфически связывается с антигеном. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью направлять субстанцию, к которой он присоединен, к сайту-мишени, например, специфическому типу опухолевой клетки, экспрессирующей раковый антиген (DLL3). В другом
30 варианте осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью активировать передачу сигналов через его антиген-мишень, например, антиген комплекса Т-клеточного рецептора (в частности, CD3) и/или костимуляторный рецептор (CD137). Антигенсвязывающие фрагменты

включают антитела и их фрагменты, что дополнительно будет указано в настоящем описании. Конкретные антигенсвязывающие фрагменты включают антигенсвязывающий домен или переменную область антитела, включающую переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела. В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты могут содержать константные области антитела, что дополнительно будет указано в настоящем описании и известно в данной области. Пригодные константные области тяжелой цепи включают любые из относящихся к пяти изотипам: альфа, дельта, эпсилон, гамма или мю. Пригодные константные области легкой цепи включают любые из относящихся к двум изотипам: каппа и ламбда.

В контексте настоящего описания понятия «первый», «второй» и «третий» касательно антигенсвязывающих фрагментов и т.д. применяют для удобства различения, когда присутствует более одного фрагмента каждого типа.

Использование этих понятий не предназначено для придания определенного порядка или ориентации мультиспецифической антигенсвязывающей молекуле, если это четко не обозначено.

В другом объекте изобретения антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемый в настоящем изобретении, который указан в настоящем описании, можно применять в новом химерном антигенном рецепторе (CAR), содержащем один или несколько антигенсвязывающих фрагментов, указанных в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления изобретения CAR, предлагаемый в изобретении, может содержать конструкцию scFv, а в предпочтительном варианте осуществления изобретения может содержать и содержит переменную область тяжелой и легкой цепей, указанных в настоящем описании. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанные химерные антигенные рецепторы можно применять для лечения или предупреждения пролиферативного нарушения и любых его рецидивов или метастазов.

Антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не одновременно

Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, указанная в настоящем описании, содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий

фрагмент, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно (который в настоящем описании обозначают также как «антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью (Dual)» или первый антигенсвязывающий фрагмент» или «Dual-Fab» или «Dual-Ig»). В конкретном варианте осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит два антигенсвязывающих фрагмента с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» и «второй антигенсвязывающий фрагмент», каждый из которых можно обозначать как «Dual-Fab»). В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый из двух антигенсвязывающих фрагментов с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab») обеспечивает одновалентное связывание с CD3 или CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно. В конкретном варианте осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит не больше двух антигенсвязывающих фрагментов с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab»).

В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab»), как правило, представляет собой молекулу Fab, в частности, молекулу канонического Fab. В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab») представляет собой домен, который содержит переменные области легкой цепи и тяжелой цепи антитела (VL и VH). Приемлемые примеры указанных доменов, содержащих переменные области легкой цепи и тяжелой цепи антитела, включают «одноцепочечный Fv (scFv)», «одноцепочечное антитело», «Fv», «одноцепочечный Fv 2 (scFv2)», «Fab», «F(ab')₂» и т.д.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab») специфически

связывается с полным пептидом или с частью неполного пептида CD3. В конкретном варианте осуществления изобретения CD3 представляет собой CD3 человека или CD3 обезьян циномолгус, более конкретно человеческий CD3. В конкретном варианте осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент обладает перекрестной реактивностью (т.е. специфически связывается с) CD3 человека и обезьян циномолгус. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью специфически связываться с эpsilon-субъединицей CD3, в частности, эpsilon-субъединицей человеческого CD3, которая представлена в SEQ ID NO: 7 (NP_000724.1) (в скобках представлены регистрационные номера RefSeq). В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab») обладает способностью специфически связываться с эpsilon-цепью CD3, которая экспрессируется на поверхности эукариотических клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab») связывается с эpsilon-цепью CD3, которая экспрессируется на поверхности Т-клеток.

В конкретных вариантах осуществления изобретения CD137 представляет собой человеческий CD137. В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтительные примеры антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, включают антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab»), связывающийся с тем же эпитопом, что и эпитоп человеческого CD137, с которым связывается антитело, выбранное из группы, которая состоит из:

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность
SPCPPNSFSSAGGQRTCD

ICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKG
C (SEQ ID NO: 21),

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность
DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC (SEQ ID NO: 35),

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность
LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKEC
SSTSNAEC (SEQ ID NO: 49), и

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность
5 LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC (SEQ ID NO: 105) в белке человеческого
CD137.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий
фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент»
или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab») содержит любую
10 из последовательностей переменных областей антитела, представленных ниже
в таблице 1. В конкретных вариантах осуществления изобретения
антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый
антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент»,
или «Dual-Fab») содержит любую из комбинаций переменной области тяжелой
15 цепи и переменной области легкой цепи, которые представлены в таблице 1.

Таблица 1
SEQ ID NO: переменных областей антигенсвязывающего фрагмента с двойной
специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй
антигенсвязывающий фрагмент», или «DUAL-Fab»)

Обозначение	SEQ ID NO:	
	Переменная область тяжелой цепи (VH)	Переменная область легкой цепи (VL)
DualAE08	3	59
DualAE06	4	58
DualAE17	5	58
DualAE10	5	60
DualAE05	6	58
DualAE19	8	58
DualAE20	9	58
DualAE21	9	61
DualAE22	10	58
DualAE23	11	61
DualAE09	12	61
DualAE18	12	58
DualAE14	13	58
DualAE15	14	58
DualAE16	81	60

В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий
20 фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент»
или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab») содержит

последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 6, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO:

5 58. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab») содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab») содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 14, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 58. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab») содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab») содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 81, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 58. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент»,

или «Dual-Fab») содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab») содержит любую из комбинаций последовательностей HVR, которые представлены ниже в таблице 2.

Таблица 2

SEQ ID NO: последовательностей HRV (CDR) антигенсвязывающего фрагмента с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «DUAL-Fab»)

Обозначение	SEQ ID NO:					
	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
DualAE08	17	31	45	64	69	74
DualAE06	18	32	46	63	68	73
DualAE17	19	33	47	63	68	73
DualAE10	19	33	47	65	70	75
DualAE05	20	34	48	63	68	73
DualAE19	22	36	50	63	68	73
DualAE20	23	37	51	63	68	73
DualAE21	23	37	51	66	71	76
DualAE22	24	38	52	63	68	73
DualAE23	25	39	53	66	71	76
DualAE09	26	40	54	66	71	76
DualAE18	26	40	54	63	68	73
DualAE14	27	41	55	63	68	73
DualAE15	28	42	56	63	68	73
DualAE16	82	83	84	65	70	75

10

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab») каждый содержит переменную область антитела, содержащую любой из вариантов, указанных ниже в п.п. (a1)-(a17):

15

(a1) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 17, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 31, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 45, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 64, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 69, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 74;

20

5 имеющий SEQ ID NO: 73;

10 имеющий SEQ ID NO: 73;

15 имеющий SEO ID NO: 75;

20 имеющий SEQ ID NO: 73;

25 имеющий SEO ID NO: 73;

30 имеющий SEO ID NO: 73;

(a8) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 23, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 37, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID

NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

5 (a9) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 24, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 38, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 52, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

10 (a10) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 25, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 39, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 53, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

15 (a11) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 26, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 40, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 54, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

20 (a12) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 26, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 40, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 54, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

25 (a13) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 27, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 41, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 55, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

30 (a14) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 28, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 42, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 56, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a15) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 82, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 83, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 84, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 65, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 70, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 75;

(a16) переменную область антитела, которая связывается с тем же эпитопом, что и любая из переменных областей антитела, выбранная из п.п. (a1)-(a15); и

(a17) переменный фрагмент антитела, который конкурирует за связывание с любым из переменных фрагментов антитела, выбранных из указанных в п.п. (a1)-(a15).

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или антигенсвязывающий фрагмент с двойной специфичностью («первый антигенсвязывающий фрагмент» или «второй антигенсвязывающий фрагмент», или «Dual-Fab»), предлагаемые в настоящем изобретении, включают также пост-трансляционную модификацию. Примеры пост-трансляционной модификации включают пироглутамилирование на N-конце переменной области тяжелой цепи и/или делецию лизина на C-конце тяжелой цепи. В данной области известно, что такая пост-трансляционная модификация, представляющая собой пироглутамилирование на N-конце и делецию лизина на C-конце, не оказывает никакого влияния на активность антитела (Analytical Biochemistry, т. 348, 2006, сс. 24-39).

Антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью связываться с DLL3

Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, указанная в настоящем описании, содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент, обладающий способностью связываться с дельта-подобным 3 (DLL3) (который обозначают также в настоящем описании как «фрагмент, связывающийся с антигеном DLL3» или «третий антигенсвязывающий фрагмент» или «антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с DLL3»).

В конкретных вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит один антигенсвязывающий фрагмент, который обладают способностью связываться с DLL3. В конкретных вариантах

осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит два антигенсвязывающих фрагмента, которые обладают способностью связываться с DLL3 («фрагмент, связывающий антиген DLL3»). В конкретном указанном варианте осуществления изобретения каждый из этих антигенсвязывающих фрагментов специфически связывается с одним и тем же эпитопом DLL3. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения все эти «фрагменты, связывающие антиген DLL3» являются идентичными. В одном из вариантов осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит молекулу иммуноглобулина, которая обладает способностью специфически связываться с DLL3 («фрагмент, связывающий антиген DLL3»). В одном из вариантов осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит не больше двух антигенсвязывающих фрагментов, которые обладают способностью специфически связываться с DLL3 («фрагменты, связывающие антиген DLL3»).

В конкретных вариантах осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, представляет собой молекулу кроссовер-Fab, в которой либо переменные, либо константные области тяжелой и легкой цепей обменены. В конкретных вариантах осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, представляет собой молекулу кроссовер-Fab, в которой переменные области легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab обменены.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, специфически связывается с внеклеточным доменом DLL3. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, специфически связывается с эпитопом во внеклеточном домене DLL3. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, связывается с белком DLL3, который экспрессируется на поверхности эукариотических клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, связывается с белком DLL3, который экспрессируется на поверхности раковых клеток.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, связываются с эпитопом во внеклеточном домене (ECD), т.е. домене,

простирающемся от N-конца непосредственно до ТМ-области, но не в ТМ-область или С-концевой внутриклеточный домен. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, могут связываться с эпитопом в любом/любой из вышеуказанных

- 5 доменов/областей в ECD. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, связываются с эпитопом в области, простирающейся от EGF6 непосредственно до ТМ-области. Более конкретно, мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, могут связываться с эпитопом в области, представленной в SEQ ID NO: 89, в человеческом DLL3. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, связываются с EGF1-, EGF2-, EGF3-, EGF4-, EGF5- или EGF6-областью или с областью, простирающейся от EGF6 непосредственно до ТМ-области, в человеческом DLL3, или с эпитопом в EGF1-, EGF2-, EGF3-, EGF4-, EGF5- или EGF6-области или области, простирающейся от EGF6 непосредственно до ТМ-области, в человеческом DLL3. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, можно получать из ранее описанных антител к DLL3, в которых охарактеризованы связывающиеся с антителами эпитопы DLL3 (например, в WO 2019/131988 и WO 2011/093097).

- В конкретных вариантах осуществления изобретения мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержат любую из последовательностей переменных областей антител, представленных ниже в таблице 1В. В конкретных вариантах осуществления изобретения мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержат любую из комбинаций переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи, которые представлены в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержат домен, который содержит

вариабельный фрагмент антитела, конкурирующий за связывание с DLL3 с любой из вариабельных областей антител, представленных в таблице 3.

Таблица 3

SEQ ID NO: последовательностей вариабельных областей
приведенного в качестве примера фрагмента, связывающего антиген DLL3

Обозначение	SEQ ID NO:	
	Вариабельная область тяжелой цепи (VH)	Вариабельная область легкой цепи (VL)
DL301	305	313
DL306	306	314
DL309	307	315
DL312	308	316
DLL3-14	309	317
DLL3-22	310	318
DLL3-4	311	319
DLL3-6	312	320
DLA0106	260	261
DLA0126	262	263
DLA0316	264	265
DLA0379	266	267
DLA0580	268	269
DLA0641	270	271
DLA0769	272	273
DLA0841	274	275
D30841AE05	297	236
D30841AE08	298	236
D30841AE11	298	302
D30841AE12	299	236
D30841AE13	232	236
D30841AE14	300	236
D30841AE15	301	236

5

В одном из вариантов осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньше мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 232, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньше мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 236. В одном из вариантов осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 232, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236.

10

15

В одном из вариантов осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 300, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 236. В одном из вариантов осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 300, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236.

В одном из вариантов осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 301, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 236. В одном из вариантов осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 301, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236.

В одном из вариантов осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 274, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 275. В одном из вариантов осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 275.

В одном из вариантов осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%

идентична SEQ ID NO: 264, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньше мере примерно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична SEQ ID NO: 265. В одном из вариантов осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 264, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 265.

В конкретных вариантах осуществления изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержит любую из комбинаций последовательностей HVR, представленных ниже в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, содержат домен, который содержит вариабельный фрагмент антитела, который конкурирует для связывания с DLL3 с любой из вариабельных областей антител, представленных в таблице 4, или конкурирует за связывание с DLL3 с любым вариабельным фрагментом антитела, который содержит последовательность HVR, идентичную последовательностям HVR-участков вариабельных областей антитела, которые представлены в таблице 4.

Таблица 4

SEQ ID NO: последовательностей HRV (CDR) приведенного в качестве примера фрагмента, связывающего антиген DLL3

Обозначение	SEQ ID NO:					
	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
DLA0316	276	277	278	279	280	281
DLA0580	285	286	287	288	289	290
DLA0769	291	292	293	294	295	296
DLA0841	282	283	284	237	238	239
D30841AE05	233	234	303	237	238	239
D30841AE08	233	234	235	237	238	239
D30841AE11	233	234	235	237	238	304
D30841AE12	233	234	235	237	238	239
D30841AE13	233	234	235	237	238	239
D30841AE14	233	234	235	237	238	239
D30841AE15	233	234	235	237	238	239

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3,

предлагаемые в настоящем изобретении, содержат переменную область антитела, содержащую любой из вариантов, указанных ниже в п.п. (a1)-(a5):

(a1) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 233, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 234, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 235, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 237, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 238, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 239;

(a2) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 276, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 277, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 278, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 279, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 280, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 281;

(a3) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 285, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 286, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 287, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 288, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 289, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 290;

(a4) переменную область антитела, которая связывается с тем же эпитопом, что и любая из переменных областей антитела, выбранная из указанных в п.п. (a1)-(a3); и

(a5) переменный фрагмент антитела, который конкурирует за связывание с любым из переменных фрагментов антитела, выбранных из указанных в п.п. (a1)-(a3).

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула или фрагмент, связывающий антиген DLL3, предлагаемые в настоящем изобретении, включают также пост-трансляционную модификацию. Примеры пост-трансляционной модификации включают пироглутамилирование на N-конце переменной области тяжелой цепи и/или делецию лизина на C-конце тяжелой цепи. В данной области известно, что такая пост-трансляционная модификация, представляющая собой пироглутамилирование на N-конце и делецию лизина на C-конце, не оказывает никакого влияния на активность антитела (Analytical Biochemistry, т. 348, 2006, сс. 24-39).

В другом объекте изобретения фрагмент, связывающий антиген DLL3, предлагаемый в настоящем изобретении, можно применять в новом химерном антигеном рецепторе (CAR), включающем DLL3-связывающий домен (DLL3 CAR). В конкретных вариантах осуществления изобретения DLL3-связывающий домен (и DLL3 CAR), предлагаемый в изобретении, содержит конструкцию scFv и в предпочтительном варианте осуществления изобретения может содержать переменные области тяжелой и легкой цепей, указанные в настоящем описании. В других предпочтительных вариантах осуществления изобретения DLL3-связывающий домен (и DLL3 CAR), предлагаемый в изобретении, может содержать конструкцию scFv или ее фрагмент, содержащий переменные области тяжелых и легких цепей, указанные в настоящем описании. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанные химерные антигенные рецепторы можно применять для лечения или предупреждения пролиферативного нарушения и любых его рецидивов или метастазов.

В конкретных вариантах осуществления изобретения белок DLL3 экспрессируется на иницилирующих опухоль клетках. DLL3 CAR экспрессируется на цитотоксических лимфоцитах (предпочтительно аутологичных цитотоксических лимфоцитах) в результате генетической модификации (например, трансдукции), что приводит к образованию чувствительных к DLL3 лимфоцитов, которые можно применять для таргетинга и уничтожения DLL3-позитивных опухолевых клеток. Как будет подробно обсуждаться в настоящем описании, CAR, предлагаемые в изобретении, как правило, содержат внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий DLL3-связывающий домен, который активирует конкретные лимфоциты и продуцирует иммунный ответ в отношении DLL3-позитивных опухолевых клеток. Выбранные варианты осуществления изобретения включают иммунологически активные клетки-хозяева, которые экспонируют указанный CAR, и различные полинуклеотидные последовательности и векторы, кодирующие DLL3 CAR, предлагаемый в изобретении. Другие объекты изобретения включают способы повышения активности Т-лимфоцитов или естественных клеток-киллеров (NK) у индивидуума путем интродукции клетки-хозяина, которая экспрессирует молекулу DLL3 CAR, в организм индивидуума, страдающего раком, и лечения

индивидуума. Указанные объекты изобретения включают среди прочего рак легкого (например, мелкоклеточный рак легкого) и меланому.

Антиген

В контексте настоящего описания понятие «антиген» относится к сайту (например, непрерывный участок аминокислот или конформационная конфигурация, состоящая из различных участков несмежных аминокислот) на полипептидной макромолекуле, с которой связывается антигенсвязывающий фрагмент с образованием комплекса антигенсвязывающий фрагмент – антиген. антигенные детерминанты могут присутствовать, например, на поверхностях опухолевых клеток, на поверхностях инфицированных вирусом клеток, на поверхностях других пораженных заболеванием клеток, на поверхности иммунных клеток, в свободном состоянии в сыворотке крови и/или во внеклеточном матриксе (ECM). Если не указано иное, то белки, которые рассматриваются в качестве антигенов в настоящем описании (например, CD3, CD137, DLL3), могут представлять собой любую нативную форму белков из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы). В конкретном варианте осуществления изобретения антиген представляет собой человеческий CD3, человеческий CD137 или человеческий DLL3. В контексте настоящего описания при ссылке на конкретный белок понятие включает «полноразмерный» непротессированный белок, а также любую форму белка, которая образуется в результате процессинга в клетке. Понятие включает также встречающиеся в естественных условиях варианты белка, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты.

В конкретных вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, указанная в описании, связывается с эпитопом CD3, CD137 или DLL3, консервативным для CD3, CD137 или DLL3 из различных видов. В конкретных вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящей заявке, представляет собой триспецифическую антигенсвязывающую молекулу, т.е. молекулу, которая обладает способностью специфически связываться с тремя различными антигенами – обладает способностью связываться либо с одним CD3, либо с одним CD137, но не может связываться с

обоими антигенами одновременно, и обладает способностью специфически связываться с DLL3.

В конкретных вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула специфически связывается с полным пептидом или с частью неполного пептида CD3. В конкретном варианте осуществления изобретения CD3 представляет собой CD3 человека или CD3 обезьян циномолгус, более конкретно человеческий CD3. В конкретном варианте осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула обладает перекрестной реактивностью (т.е. специфически связывается с) CD3 человека и обезьян циномолгус. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула обладает способностью специфически связываться с эпсилон-субъединицей CD3, в частности, эпсилон-субъединицей человеческого CD3, которая представлена в SEQ ID NO: 7 (NP_000724.1) (в скобках представлены регистрационные номера RefSeq). В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула обладает способностью специфически связываться с эпсилон-цепью CD3, которая экспрессируется на поверхности эукариотических клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула связывается с эпсилон-цепью CD3, экспрессируемой на поверхности Т-клеток.

В конкретных вариантах осуществления изобретения CD137 представляет собой человеческий CD137. В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтительные примеры антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, включают антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с тем же эпитопом, что и эпитоп человеческого CD137, с которым связывается антитело, выбранное из группы, которая состоит из:

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCS MCEQDCKQGQELTKKGC (SEQ ID NO: 21),

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC (SEQ ID NO: 35),

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность
LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKEC
SSTSNAEC (SEQ ID NO: 49), и

антитела, которое распознает область, содержащую последовательность
5 LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC (SEQ ID NO: 105) в белке человеческого
CD137.

В контексте настоящего описания понятие «DLL3» относится к любому
нативному DLL3 (дельта-подобный 3) из любого применяемого в качестве
источника позвоночного животного, включая, если не указано иное,
10 млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например,
мыши и крысы). Понятие включает «полноразмерный» непротессированный
DLL3, а также любую форму DLL3, которая образуется в результате процессинга
в клетке. Понятие включает также встречающиеся в естественных условиях
варианты DLL3, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты.
15 Аминокислотная последовательность приведенного в качестве примера
человеческого DLL3 известна в виде эталонной последовательности NCBI
(RefSeq) NM_016941.3, а аминокислотная последовательность приведенного в
качестве примера DLL3 обезьян циномолгус известна в виде эталонной
последовательности NCBI XP_005589253.1, и аминокислотная
20 последовательность приведенного в качестве примера мышинного DLL3 известна
в виде эталонной последовательности NCBI NM_007866.2.

Человеческий белок DLL3 содержит трансмембранную (TM) область и
внутриклеточный домен в С-концевой области и DSL-(Notch)-домен в N-
концевой области (см., например, фиг. 6). Кроме того, DLL3 имеет EGF-домен,
25 содержащий шесть участков, EGF1-EGF6 в направлении от N-концевой области
к С-концевой области. В некоторых вариантах осуществления изобретения
мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент,
связывающий антиген DLL3, предлагаемые в настоящем изобретении,
связываются с эпитопом во внеклеточном домене (ECD), т.е. домене,
30 простирающемся от N-конца непосредственно до TM-области, но не в TM-
область или в С-концевой внутриклеточный домен. Мультиспецифические
антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3,
предлагаемые в настоящем изобретении, могут связываться с эпитопом

любом/любой из вышеуказанных доменов/областей в ECD. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, связываются с эпитопом в области, простирающейся от EGF6 непосредственно до ТМ-области. Более конкретно, мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, предлагаемые в настоящем изобретении, могут связываться с эпитопом в области, представленной в SEQ ID NO: 89, в человеческом DLL3. В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, связываются с EGF1-, EGF2-, EGF3-, EGF4-, EGF5- или EGF6-областью или с областью, простирающейся от EGF6 непосредственно до ТМ-области в человеческом DLL3, или с эпитопом в EGF1-, EGF2-, EGF3-, EGF4-, EGF5- или EGF6-области или области, простирающейся от EGF6 непосредственно до ТМ-области в человеческом DLL3.

В человеческом DLL3 вышеуказанные домены/области имеют следующие аминокислотные остатки (см., например, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NYJ7> или WO 2013/126746):

внеклеточный домен (ECD): аминокислотные остатки в положениях 1-492;
DSL-домен: аминокислотные остатки в положениях 176-215;
EGF-домен: аминокислотные остатки в положениях 216-465;
EGF1-область: аминокислотные остатки в положениях 216-249;
EGF2-область: аминокислотные остатки в положениях 274-310;
EGF3-область: аминокислотные остатки в положениях 312-351;
EGF4-область: аминокислотные остатки в положениях 353-389;
EGF5-область: аминокислотные остатки в положениях 391-427;
EGF6-область: аминокислотные остатки в положениях 429-465;
область от EGF6 непосредственно до ТМ-области: аминокислотные остатки в положениях 429-492;
ТМ-область: аминокислотные остатки в положениях 493-513; и
С-концевой внутриклеточный домен: аминокислотные остатки в положениях 516-618 (или 516-587 в некоторых изоформах). Указанные выше

аминокислотные положения относятся также к аминокислотным положениям в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 90.

Таким образом, мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, предлагаемые в настоящем изобретении, могут связываться с указанной/указанным выше областью/доменом, имеющей/имеющим аминокислотные остатки в указанных выше положениях в человеческом DLL3. Это означает, что мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или фрагмент, связывающий антиген DLL3, предлагаемые в настоящем изобретении, могут связываться с эпитопом в указанной/указанным выше областью/доменом, имеющей/имеющим аминокислотные остатки в указанных выше положениях в человеческом DLL3.

Белок DLL3, применяемый в настоящем изобретении, может представлять собой белок DLL3, который имеет описанную выше последовательность, или может представлять собой модифицированный белок, который имеет последовательность, полученную из описанной выше последовательности путем модификации одной или нескольких аминокислот. Примеры модифицированного белка, который имеет последовательность, полученную из описанной выше последовательности путем модификации одной или нескольких аминокислот, могут включать полипептиды, идентичные на 70% или более, предпочтительно на 80% или более, более предпочтительно на 90% или более, еще более предпочтительно на 95% или более аминокислотной последовательности, описанной выше. Альтернативно этому, можно применять неполные пептиды этих белков DLL3.

Белок DLL3, применяемый в настоящем изобретении, не ограничен его происхождением и предпочтительно представляет собой белок DLL3 человека или обезьян циномолгус.

В некоторых вариантах осуществления изобретения в случае белка DLL3 можно прим применять белки ECD-фрагментов DLL3 (или вариантов ECD). В зависимости от сайта усечения фрагменты/варианты могут содержать в направлении от N-концевой области к С-концевой области DSL-домен до EGF6, от EGF1 до EGF6, от EGF2 до EGF6, от EGF3 до EGF6, от EGF4 до EGF6, EGF5 и EGF6, или EGF6. Фрагменты /варианты могут содержать также область, простирающуюся непосредственно за EGF6-областью непосредственно до TM-

области. Flag-метку можно присоединять к С-концу фрагментов/вариантов, используя методику, хорошо известную в данной области.

Антигенсвязывающий домен

Понятие «антигенсвязывающий домен» относится к участку антитела, который содержит область, специфически связывающуюся и комплементарную участку антигена или всему антигену. Антигенсвязывающий домен может быть представлен одним или несколькими переменными доменами антитела (которые называют также переменными областями). Предпочтительно антигенсвязывающие домены содержат и переменную область легкой цепи антитела (VL), и переменную область тяжелой цепи антитела (VH). Указанные предпочтительные антигенсвязывающие домены включают, например, «одноцепочечный Fv (scFv)», «однодоменное антитело или VHH», «одноцепочечное антитело», «Fv», «одноцепочечный Fv2 (scFv2)», «Fab» и «F(ab')₂».

Переменная область

В контексте настоящего описания понятие «переменная область» или «переменный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гиперпеременных участка (HVR) (см., например, Kindt и др., Kuby Immunology, 6-ое изд., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). Одного VH- или VL-домена может быть достаточно для обеспечения специфичности связывания антигена. Кроме того, антитела, которые связываются с конкретным антигеном, можно выделять, используя VH- или VL-домен из антитела, которое связывается с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных VL- или VH-доменов соответственно (см., например, Portolano и др., J. Immunol. 150, 1993, сс. 880-887; Clarkson и др., Nature 352, 1991, сс. 624-628).

HVR или CDR

Понятие «гиперпеременный участок» или «HVR» в контексте настоящего описания относится к каждому из участков переменного домена антитела, последовательности которых являются гиперпеременными («определяющие

комплементарность участки» или «CDR») и/или формируют петли определенной структуры («гипервариабельные петли»), и/или содержат контактирующие с антигеном остатки («контакты с антигеном»). Гипервариабельные участки (HVR) обозначают также как «определяющие комплементарность участки» (CDR), и эти понятия в контексте настоящего описания применяют взаимозаменяемо со ссылкой на положения вариабельной области, которые формируют антигенсвязывающие участки. Как правило, антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Примеры HVR включают:

(а) гипервариабельные петли, включающие аминокислотные остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917);

(б) CDR, включающие аминокислотные остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991);

(в) области контакта с антигеном, включающие аминокислотные остатки 27с-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum и др., J. Mol. Biol. 262, 1996, сс. 732-745); и

(г) комбинации остатков, указанных в подпунктах (а), (б) и/или (в), включающие аминокислотные остатки HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) и 94-102 (H3).

Если не указано иное, то остатки в HVR и другие остатки в вариабельном домене (например, остатки в FR) нумеруют согласно Kabat и др., выше.

HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 обозначают также как «H-CDR1», «H-CDR2», «H-CDR3», «L-CDR1», «L-CDR2» и «L-CDR3» соответственно.

Способность связываться с CD3 и CD137, но отсутствие способности связываться с CD3 и CD137 одновременно

Обладает ли вариабельная область антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, «способностью связываться с CD3 и CD137» можно определять с помощью метода, известного в данной области.

Для этой цели можно, например, применять метод электрохемилюминесценции (ECL-метод) (BMC Research Notes 4, 2011, с. 281).

В частности, например, для низкомолекулярного антитела, содержащего область, которая обладает способностью связываться с CD3 и CD137, например, Fab-область, меченную биотином антигенсвязывающую молекулу, подлежащую тестированию, или одновалентное антитело (антитело, в котором отсутствует одна из двух Fab-областей, которые присутствуют в каноническом антителе), смешивают с CD3 или CD137, меченным сульфо-меткой (комплекс с Ru), и смесь добавляют на планшет с иммобилизованным стрептавидином. При осуществлении этой операции меченная биотином антигенсвязывающая молекула, подлежащая тестированию, связывается со стрептавидином на планшете. Свет испускается от сульфо-метки и люминесцентный сигнал можно обнаруживать с помощью устройства Sector Imager 600 или 2400 (фирма MSD К.К.) или т.п., подтверждая тем самым связывание вышеуказанной области антигенсвязывающей молекулы, подлежащей тестированию, с CD3 или CD137.

Альтернативно этому, указанный анализ можно проводить с помощью ELISA, FACS (сортировка клеток с активированной флуоресценцией), ALPHAScreen (скрининг на основе гомогенного анализа усиленной за счет эффекта близости люминесценции), метода BIACORE, основанного на явлении поверхностного плазмонного резонанса (SPR), и т.д. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (11), 2006, сс. 4005-4010).

В частности, анализ можно проводить с использованием, например, анализатора взаимодействия Biacore (фирма GE Healthcare Japan Corp.) на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Анализатор Biacore включает любую модель, такую как Biacore T100, T200, X100, A100, 4000, 3000, 2000, 1000 или С. Любой сенсорный чип для Biacore, такой как чип CM7, CM5, CM4, CM3, C1, SA, NTA, L1, HPA или Au, можно применять в качестве сенсорного чипа. Белки для захвата антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, такие как белок А, белок G, белок L, антитела к человеческому IgG, антитела к человеческому IgG-Fab, антитела к человеческой L-цепи, антитела к человеческой Fc, антигенные белки или антигенные пептиды, иммобилизуют на сенсорном чипе с помощью метода сочетания, такого как аминное сочетание, дисульфидное сочетание или

альдегидное сочетание. CD3 или CD137 инъецируют на чип в качестве аналита и измеряют взаимодействие с получением сенсограммы. При осуществлении этой операции концентрацию CD3 или CD137 можно выбирать в диапазоне от нескольких мкМ до нескольких пМ в зависимости от силы взаимодействия

5 (например, KD) анализируемого образца.

Альтернативно этому, на сенсорном чипе можно иммобилизовывать CD3 или CD137 вместо антигенсвязывающей молекулы, с которым образцу антитела, подлежащего тестированию, в свою очередь дают взаимодействовать. Обладает ли переменная область антитела антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой
10 в настоящем изобретении, связывающей активностью в отношении CD3 или CD137, можно определять на основе величины константы диссоциации (KD), рассчитанной из сенсограммы, характеризующей взаимодействие, или на основе увеличения уровня на сенсограмме, характеризующей взаимодействие, после воздействия образца антигенсвязывающей молекулы по сравнению с уровнем до
15 воздействия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения активность или аффинность связывания переменной области антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, с представляющим интерес антигеном (т.е. CD3 или CD137) оценивают при 37°C (для CD137) или 25°C (для CD3) с использованием
20 устройства Biacore T200 (фирма GE Healthcare) или устройства Biacore 8K (фирма GE Healthcare). Антитело к человеческой Fc (например, фирмы GE Healthcare) иммобилизуют на всех проточных ячейках сенсорного CM4-чипа с использованием набора для аминного сочетания (например, фирмы GE Healthcare). Антигенсвязывающие молекулы или переменные области антитела
25 захватывают на сенсорных поверхностях, покрытых антителом к Fc, затем на проточную ячейку инъецируют антиген (CD3 или CD137). Уровни захвата антигенсвязывающих молекул или переменных областей антитела могут соответствовать 200 резонансным единицам (RU). Рекомбинантный человеческий CD3 или CD137 можно инъецировать в концентрации 2000-125нМ,
30 полученной путем двукратного серийного разведения, после чего оценивать диссоциацию. Все антигенсвязывающие молекулы или переменные области антитела и аналиты приготавливают в ACES-буфере, pH 7,4, содержащем 20мМ ACES, 150мМ NaCl, 0,05% Твин 20, 0,005% NaN₃. Сенсорную поверхность

регенерируют после каждого цикла с помощью 3М $MgCl_2$. Аффинность связывания определяют путем обработки и подгонки данных к модели связывания 1:1 с помощью, например, программного обеспечения Biacore Insight Evaluation, версия 2.0 (фирма GE Healthcare) или программного обеспечения Biacore 8K Evaluation (фирма GE Healthcare). Величины KD рассчитывают для оценки специфической активности или аффинности связывания антигенсвязывающих доменов, предлагаемых в настоящем изобретении.

ALPHAScreen-анализ (скрининг на основе ALPHA) осуществляют с помощью технологии ALPHA, в которой используют два типа гранул (донор и акцептор) на основе следующего принципа: люминесцентные сигналы поддаются обнаружению только тогда, когда указанные две гранулы находятся в непосредственной близости благодаря биологическому взаимодействию между молекулой, связанной с гранулой-донором, и молекулой, связанной с гранулой-акцептором. Возбужденные лазерным пучком фотосенсибилизаторы в грануле-доноре превращают кислород окружающей среды в возбужденный синглетный кислород. Когда молекулы синглетного кислорода распространяются от гранулы-донора и достигают гранулы-акцептора, расположенной в непосредственной близости к ней, то индуцируется хемилюминесцентная реакция в грануле, что в результате приводит к испусканию света. В отсутствие взаимодействия между молекулой, связанной с гранулой-донором, и молекулой, связанной с гранулой-акцептором, синглетный кислород, который продуцируется гранулой-донором, не достигает гранулы-акцептора. В результате хемилюминесцентная реакция не происходит.

Одну из субстанций (лиганд), предназначенных для исследования взаимодействия, иммобилизуют на тонкой золотой пленке сенсорного чипа. Сенсорный чип освещают светом с задней поверхности таким образом, чтобы имело место полное отражение на границе раздела между тонкой золотой пленкой и стеклом. В результате этого в части отраженного света формируется область с пониженной интенсивностью отражения (SPR-сигнал). Другую субстанцию (аналит), предназначенную для исследования взаимодействия, пропускают по поверхности сенсорного чипа. Когда аналит связывается с лигандом, масса иммобилизованной молекулы-лиганда возрастает, что приводит к изменению показателя преломления растворителя на поверхности сенсорного

чипа. Указанное изменение показателя преломления приводит к тому, что положение SPR-сигнала сдвигается (в противоположность этому, положение сигнала возвращается в исходное положение, если происходит диссоциация связанных молекул). С помощью Biacore-системы строят график, откладывая по

5 оси ординат величину сдвига, т.е. изменение массы на поверхности сенсорного чипа, и таким образом получают в качестве результатов анализа зависимость изменения массы от времени (сенсограмму). На сенсограмме можно определять количество аналита, связанного с лигандом, захваченным на поверхности сенсорного чипа (уровень изменения ответа на сенсограмме до и после

10 взаимодействия с аналитом). Однако, поскольку связанное количество зависит также от количества лиганда, то сравнение следует осуществлять в условиях, в которых используют практически одинаковые количества лиганда.

Кинетические параметры, т.е. константу скорости ассоциации (k_a) и константу скорости диссоциации (k_d), можно определять из представленных в виде кривых

15 сенсограмм, и рассчитывать константу диссоциации (KD) как отношение двух указанных констант. Для анализа ингибирования также предпочтительно применяют BIACORE-метод. Примеры анализа ингибирования описаны в Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс. 4005-4010.

Понятие «не связывается с CD3 и CD137 (4-1BB) одновременно» или «не

20 может связываться с CD3 и CD137 (4-1BB) одновременно» означает, что антигенсвязывающий фрагмент или вариабельная область антитела, предлагаемая в настоящем изобретении, не может связываться с CD137 в состоянии, когда она связана с CD3, и антигенсвязывающий фрагмент или вариабельная область антитела не может связываться с CD3 в состоянии, когда

25 она связана с CD137. В этом контексте фраза «не связывается с CD3 и CD137 одновременно» включает отсутствие перекрестного связывания клетки, экспрессирующей CD3, с клеткой, экспрессирующей CD137, или отсутствие одновременного связывания с CD3 и CD137, каждый из которых экспрессируется на различных клетках. Указанная фраза включает также случай,

30 при котором вариабельная область обладает способностью связываться с обоими CD3 и CD137 одновременно, когда CD3 и CD137 не экспрессируются на клеточных мембранах, как в случае с растворимыми белками, или когда они оба находятся в одной и той же клетке, но не может одновременно связываться с

CD3 и CD137, каждый из которых экспрессируется в разных клетках. Указанная
вариабельная область антитела не ограничена конкретной областью, если
вариабельная область антитела обладает указанными функциями. Их примеры
включают вариабельные области, полученные из вариабельной области антитела
5 IgG-типа путем изменения части ее аминокислот таким образом, чтобы они
связывались с требуемым антигеном. Подлежащую изменению аминокислоту
выбирают, например, из аминокислот, изменение которых не отменяет
связывание с антигеном в вариабельной области антитела, которая связывается с
CD3 или CD137.

10 В этом контексте фраза «экспрессируется на различных клетках» означает
только то, что антигены экспрессируются на отличных друг от друга клетках.
Комбинация таких клеток может представлять собой, например, одни и те же
типы клеток, такие как Т-клетка и другая Т-клетка, или может представлять
собой различные типы клеток, такие как Т-клетка и NK-клетка.

15 Тот факт, что антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем
изобретении, «не связывается с CD3 и CD137 одновременно» можно
подтверждать следующим образом: устанавливают, что антигенсвязывающая
молекула обладает связывающей активностью в отношении и CD3, и CD137;
затем дают либо CD3, либо CD137 связываться заранее с антигенсвязывающей
20 молекулой, которая содержит вариабельную область, обладающую указанной
связывающей активностью; а затем с помощью указанного выше метода
определяют присутствие или отсутствие ее связывающей активности в
отношении другого антигена. Альтернативно этому, указанный факт можно
подтверждать также, определяя, ингибируется ли связывание
25 антигенсвязывающей молекулы либо с CD3, либо с CD137, иммобилизованным
на ELISA-планшете или сенсорном чипе, после добавления в раствор другого
антигена. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание
антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, либо с
CD3, либо с CD137 ингибируется при связывании антигенсвязывающей
30 молекулы с другим антигеном по меньшей мере на 50%, предпочтительно на
60% или более, более предпочтительно на 70% или более, более
предпочтительно на 80% или более, еще более предпочтительно на 90% или
более или еще более предпочтительно на 95% или более.

Согласно одному из объектов изобретения, когда осуществляют иммобилизацию одного антигена (например, CD3), то ингибирование связывания антигенсвязывающей молекулы с CD3 можно определять в присутствии другого антигена (например, CD137) с помощью методов, известных в данной области (т.е. ELISA, BIACORE и др.). Согласно другому объекту изобретения, когда осуществляют иммобилизацию CD137, то ингибирование связывания антигенсвязывающей молекулы с CD137 можно определять в присутствии CD3. При осуществлении любого из двух указанных выше объектов изобретения считается, что антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, не связывается одновременно с CD3 и CD137, если связывание ингибируется по меньшей мере на 50%, предпочтительно на 60% или более, более предпочтительно на 70% или более, более предпочтительно на 80% или более, еще более предпочтительно на 90% или более или еще более предпочтительно на 95% или более.

В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация антигена, инъецируемого в качестве аналита, по меньшей мере в 1, 2, 5, 10, 30, 50 или 100 раз выше, чем концентрация другого антигена, предназначенного для иммобилизации.

В предпочтительном варианте концентрация антигена, инъецируемого в качестве аналита, в 100 раз выше, чем концентрация другого антигена, предназначенного для иммобилизации, и связывание ингибируется по меньшей мере на 80%.

В одном из вариантов осуществления изобретения рассчитывают отношение величины KD связывающей активности антигенсвязывающей молекулы в отношении CD3 (аналита) к величине KD связывающей активности антигенсвязывающей молекулы в отношении CD137 ($KD(CD3)/KD(CD137)$), и для осуществления указанного выше анализа в условиях конкуренции можно использовать концентрацию CD3 (аналита), которая в зависимости от величины отношения $KD(KD(CD3)/KD(CD137))$ в 10, 50, 100 или 200 раз выше концентрации CD137 (иммобилизованного) (например, можно выбирать в 1, 5, 10 или 20 раз более высокую концентрацию, когда отношение величин KD составляет 0,1. Кроме того, можно выбирать в 100, 500, 1000 или 2000 раз более высокую концентрацию, когда отношение величин KD составляет 10).

Согласно одному из объектов изобретения, когда осуществляют иммобилизацию одного антигена (например, CD3), то ослабление сигнала связывания антигенсвязывающей молекулы с CD3 можно определять в присутствии другого антигена (например, CD137) с помощью методов, известных в данной области (т.е. ELISA, ECL и т.д.). Согласно другому объекту изобретения, когда осуществляют иммобилизацию CD137, то ослабление сигнала связывания антигенсвязывающей молекулы с CD137 также можно определять в присутствии CD3. При осуществлении любого из двух указанных выше объектов изобретения, считается, что антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, не связывается одновременно с CD3 и CD137, если характеризующий связывание сигнал ослабевает по меньшей мере на 50%, предпочтительно на 60% или более, более предпочтительно на 70% или более, более предпочтительно на 80% или более, еще более предпочтительно на 90% или более или еще более предпочтительно на 95% или более.

В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация антигена, инъецируемого в качестве аналита, по меньшей мере в 1, 2, 5, 10, 30, 50 или 100 раз выше, чем концентрация другого антигена, предназначенного для иммобилизации.

В предпочтительном варианте концентрация антигена, инъецируемого в качестве аналита, в 100 раз выше, чем концентрация другого антигена, предназначенного для иммобилизации, и связывание ингибируется по меньшей мере на 80%.

В одном из вариантов осуществления изобретения рассчитывают отношение величины KD связывающей активности антигенсвязывающей молекулы в отношении CD3 (аналита) к величине KD связывающей активности антигенсвязывающей молекулы в отношении CD137 (иммобилизованного) ($KD(CD3)/KD(CD137)$), и для осуществления указанного выше анализа в условиях конкуренции можно использовать концентрацию CD3 (аналита), которая в зависимости от величины отношения $KD(KD(CD3)/KD(CD137))$ в 10, 50, 100 или 200 раз выше концентрации CD137 (иммобилизованного) (например, можно выбирать в 1, 5, 10 или 20 раз более высокую концентрацию, когда отношение величин KD составляет 0,1. Кроме того, можно выбирать в 100, 500, 1000 или

2000 раз более высокую концентрацию, когда отношение величин KD составляет 10).

В частности, в случае применения, например, ECL-метода, готовят меченную биотином подлежащую тестированию антигенсвязывающую молекулу, CD3, меченный сульфo-меткой (комплекс с Ru), и немеченый CD137. Если подлежащая тестированию антигенсвязывающая молекула обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не связывается одновременно с CD3 и CD137, то люминесцентный сигнал сульфo-метки обнаруживается в отсутствии немеченого CD137 при добавлении смеси подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулы и меченого CD3 на планшет с иммобилизованным стрептавидином с последующим испусканием света. В противоположность этому, люминесцентный сигнал уменьшается в присутствии немеченого CD137. Указанное уменьшение люминесцентного сигнала можно оценивать количественно, определяя относительную связывающую активность. Указанный анализ можно аналогично осуществлять с использованием меченого CD137 и немеченого CD3.

В случае применения метода ALPHA Screen подлежащая тестированию антигенсвязывающая молекула взаимодействует с CD3 в отсутствие конкурирующего CD137 с образованием сигналов с длиной волны от 520 до 620 нм. Немеченый CD137 конкурирует с CD3 за взаимодействие с подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулой. Уменьшение флуоресценции, являющееся результатом конкуренции, можно оценивать количественно, определяя тем самым относительную связывающую активность.

Биотинилирование полипептидов с использованием сульфo-NHS-биотина или т.п. известно в данной области. CD3 можно метить с помощью GST с использованием соответствующим образом адаптированного метода, который включает, например: слияние полинуклеотида, кодирующего CD3, в рамке считывания с полинуклеотидом, кодирующим GST; и обеспечение возможности полученному в результате слитому гену экспрессироваться клетками или т.п., несущими векторы, которые могут экспрессироваться в них, с последующей очисткой с использованием колонки с глутатионом. Полученные сигналы предпочтительно анализируют, например, с помощью программного обеспечения GRAPH PAD PRISM (фирма GraphPad Software, Inc., Сан-Диего),

адаптированного к односайтовой модели конкуренции на основе нелинейного регрессионного анализа. Указанный анализ можно аналогично осуществлять с использованием меченого CD137 и немеченого CD3.

Альтернативно этому, можно применять метод на основе флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET). FRET представляет собой явление, при котором энергия возбуждения переносится посредством электронного резонанса непосредственно между двумя флуоресцентными молекулами, локализованными вблизи друг от друга. Когда FRET имеет место, то энергия возбуждения донора (флуоресцентная молекула, находящаяся в возбужденном состоянии) переносится на акцептор (другая флуоресцентная молекула, локализованная вблизи донора), в результате флуоресценция, испускаемая донором, исчезает (если быть точным, то укорачивается продолжительность флуоресценции), и вместо этого флуоресценция испускается акцептором. С помощью указанного явления можно анализировать, происходит или не происходит одновременное связывание с CD3 и CD137. Например, когда CD3, несущий донор флуоресценции, и CD137, несущий акцептор флуоресценции, одновременно связываются с подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулой, то флуоресценция донора исчезает, в то время как флуоресценция испускается акцептором. При этом происходит изменение длины волны флуоресценции. Это подтверждает, что указанное антитело связывается одновременно с CD3 и CD137. С другой стороны, если смесь CD3, CD137 и подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулы не изменяет длину волны флуоресценции флуоресцентного донора, связанного с CD3, то указанная подлежащая тестированию антигенсвязывающая молекула может рассматриваться как содержащая антигенсвязывающий домен, который обладает способностью связываться с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137 одновременно.

Например, меченой биотином подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекуле дают связываться со стрептавидином на грануле-доноре, а CD3, меченному глутатион-S-трансферазой (GST), дают связываться с гранулой-акцептором. Подлежащая тестированию антигенсвязывающая молекула взаимодействует с CD3 в отсутствии конкурирующего второго антигена, генерируя сигналы с длиной волны от 520 до 620 нм. Немеченый

второй антиген конкурирует с CD3 за взаимодействие с подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулой. Уменьшение флуоресценции, являющееся результатом конкуренции, можно оценивать количественно, определяя тем самым относительную связывающую активность.

- 5 Биотинилирование полипепидов с использованием сульфо-NHS-биотина или т.п. известно в данной области. CD3 можно метить с помощью GST с использованием соответствующим образом адаптированного метода, который включает, например: слияние полинуклеотида, кодирующего CD3, в рамке считывания с полинуклеотидом, кодирующим GST; и обеспечение возможности
- 10 полученному в результате слитому гену экспрессироваться клетками или т.п., несущими векторы, которые могут экспрессироваться в них, с последующей очисткой с использованием колонки с глутатионом. Полученные сигналы предпочтительно анализируют, например, с помощью программного обеспечения GRAPHPAD PRISM (фирма GraphPad Software, Inc., Сан-Диего),
- 15 адаптированного к односайтовой модели конкуренции на основе нелинейного регрессионного анализа.

Мечение не ограничено мечением с помощью GST и его можно осуществлять с использованием любой метки, включая (но не ограничиваясь только ими) гистидиновую метку, MBP, CBP, Flag-метку, HA-метку, V5-метку

20 или с-тус-метку. Связывание подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулы с гранулой-донором не ограничено связыванием на основе реакции биотин-стрептавидин. В частности, когда подлежащая тестированию антигенсвязывающая молекула содержит Fc, то пригодный метод включает обеспечение возможности подлежащей тестированию антигенсвязывающей

25 молекуле связываться через распознающий Fc белок, такой как белок A или белок G, на грануле-доноре.

Кроме того, случай, в котором переменная область обладает способностью одновременно связываться с CD3 и CD137, когда CD3 и CD137 не экспрессируются на клеточных мембранах, как в случае растворимых белков,

30 или они оба присутствуют в одной и той же клетке, но не могут одновременно связываться с CD3 и CD137, каждый из которых экспрессируется на различных клетках, можно оценивать также с помощью метода, известного в данной области.

В частности, подлежащую тестированию антигенсвязывающую молекулу, для которой подтверждена с помощью ECL-ELISA способность одновременно связываться с CD3 и CD137, смешивают также с клеткой, которая экспрессирует CD3, и клеткой, которая экспрессирует CD137. Можно продемонстрировать, что

5 подлежащая тестированию антигенсвязывающая молекула не способна связываться одновременно с CD3 и CD137, которые экспрессируются на разных клетках, если антигенсвязывающая молекула и указанные клетки не связываются одновременно друг с другом. Указанный анализ можно проводить, например, с помощью клеточного ECL-ELISA. Клетку, экспрессирующую CD3,

10 предварительно иммобилизуют на планшете. После связывания с ней подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулы в планшет добавляют клетку, экспрессирующую CD137. Другой антиген, который экспрессируется только на клетке, экспрессирующей CD137, выявляют с помощью меченного сульфо-меткой антитела к этому антигену. Сигнал появляется, когда

15 антигенсвязывающая молекула связывается одновременно с двумя антигенами соответственно, которые экспрессируются на двух клетках. Сигнал не появляется, когда антигенсвязывающая молекула не связывается одновременно с этими антигенами.

В альтернативном варианте указанный анализ можно осуществлять с

20 помощью ALPHAScreen-метода. Подлежащую тестированию антигенсвязывающую молекулу смешивают с клеткой, которая экспрессирует CD3, связанный с гранулой-донором, и клеткой, которая экспрессирует CD137, связанный с гранулой-акцептором. Сигнал появляется, когда антигенсвязывающая молекула связывается одновременно с двумя антигенами,

25 которые экспрессируются соответственно на двух клетках. Сигнал не появляется, когда антигенсвязывающая молекула не связывается одновременно с этими антигенами.

В альтернативном варианте указанный анализ можно осуществлять методом оценки взаимодействия с помощью системы Octet. Сначала клетке,

30 которая экспрессирует CD3, меченный пептидной меткой, дают связываться с биосенсором, который распознает пептидную метку. Клетку, которая экспрессирует CD137, и подлежащую тестированию антигенсвязывающую молекулу помещают в лунки и анализируют взаимодействие. Большой сдвиг

длины волны, вызванный связыванием с биосенсором подлежащей
тестированию антигенсвязывающей молекулы и клетки, которая экспрессирует
CD137, имеет место, когда антигенсвязывающая молекула связывается
одновременно с двумя антигенами, которые экспрессируются на двух клетках
5 соответственно. Небольшой сдвиг длины волны, вызванный связыванием с
биосенсором только подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулы,
имеет место, когда антигенсвязывающая молекула не связывается одновременно
с этими антигенами.

Вместо указанных методов, основанных на оценке связывающей
10 активности, можно осуществлять анализ, основанный на оценке биологической
активности. Например, клетку, экспрессирующую CD3, и клетку,
экспрессирующую CD137, смешивают с подлежащей тестированию
антигенсвязывающей молекулой и культивируют. Два антигена, которые
экспрессируются на двух клетках соответственно, совместно активируются с
15 помощью подлежащей тестированию антигенсвязывающей молекулы, когда
антигенсвязывающая молекула связывается одновременно с этими двумя
антигенами. При этом можно определять изменение сигнала активации,
например, повышение соответствующих уровней фосфорилирования в прямом
направлении относительно антигенов. В альтернативном варианте результатом
20 активации может являться производство цитокинов. При этом можно оценивать
количество образовавшихся цитокинов, для решения вопроса о том, происходит
или нет одновременное связывание с двумя клетками. В альтернативном
варианте в результате активации индуцируется цитотоксичность в отношении
клетки, экспрессирующей CD137. В альтернативном варианте в результате
25 активации индуцируется экспрессия репортерного гена с помощью промотора,
который активируется в прямом направлении в пути трансдукции сигнала CD137
или CD3. При этом можно измерять цитотоксичность или уровень
образовавшихся репортерных белков, для решения вопроса о том, происходит
или нет одновременное связывание с двумя клетками.

30 По меньшей мере одна дисульфидная связь

Согласно одному из объектов настоящего изобретения каждый из первого
антигенсвязывающего фрагмента и второго антигенсвязывающего фрагмента
содержит по меньшей мере один остаток цистеина (в результате мутации,

замены или инсерции), предпочтительно в СН1-участке, и указанный по меньшей мере один остаток цистеина обладает способностью образовывать по меньшей мере одну дисульфидную связь между первым антигенсвязывающим фрагментом и вторым антигенсвязывающим фрагментом. В конкретных вариантах осуществления изобретения остаток цистеина присутствует в СН1-участке константной области тяжелой цепи антитела, и, например, он присутствует в положении, выбранном из группы, которая состоит из положений 119, 122, 123, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 139, 140, 148, 150, 155, 156, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 165, 167, 174, 176, 177, 178, 190, 191, 192, 194, 195, 197, 213 и 214 согласно EU-нумерации, в СН1-участке. В одном из вариантов осуществления изобретения каждый из первого антигенсвязывающего фрагмента и второго антигенсвязывающего фрагмента содержит один остаток цистеина (в результате мутации, замены или инсерции) в положении 191 согласно EU-нумерации в СН1-участке, который обладает способностью образовывать одну дисульфидную связь между СН1-участком первого антигенсвязывающего фрагмента и СН1-участком второго антигенсвязывающего фрагмента.

В одном из вариантов вышеуказанных объектов изобретения «по меньшей мере одна связь», предназначенная для образования сцепления первого антигенсвязывающего фрагмента и второго антигенсвязывающего фрагмента, которые описаны выше, может удерживать два антигенсвязывающих фрагмента (т.е. первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, которые описаны выше) в пространственно близких положениях. Благодаря сцеплению первого антигенсвязывающего фрагмента и второго антигенсвязывающего фрагмента с помощью дисульфидной(ых) связи(ей), антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, может удерживать два антигенсвязывающих фрагмента в более близких положениях по сравнению с контрольной антигенсвязывающей молекулой, которая отличается от антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, только тем, что контрольная антигенсвязывающая молекула не имеет дополнительную(ые) связь(и), интродуцированную(ые) между двумя антигенсвязывающими фрагментами. В некоторых вариантах осуществления изобретения понятие «в пространственно близких положениях» или «в более близких положениях» включает тот факт, что первый антигенсвязывающий

домен и второй антигенсвязывающий домен, описанные выше, удерживаются на более коротком расстоянии и/или обладают пониженной гибкостью.

В результате два антигенсвязывающих фрагмента (т.е. первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, описанные выше) антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, связываются с антигенами, которые экспрессируются на одной и той же индивидуальной клетке. Иными словами, соответствующие два антигенсвязывающих фрагмента (т.е. первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, описанные выше) антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, не связываются с антигенами, которые экспрессируются на различных клетках, что могло бы приводить к перекрестному сшиванию различных клеток. В настоящей заявке указанную форму связывания антигена антигенсвязывающей молекулой, предлагаемой в настоящем изобретении, можно обозначать как «*цис*-связывание», в то время как форму связывания антигена антигенсвязывающей молекулой, при которой соответствующие два антигенсвязывающих фрагмента антигенсвязывающей молекулы связываются с антигенами, которые экспрессируются на различных клетках, что приводит к перекрестному сшиванию различных клеток, можно обозначать как «*транс*-связывание». В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, с антигенами, которые экспрессируются на одной и той же индивидуальной клетке, главным образом имеет форму «*цис*-связывания».

В одном из вариантов вышеуказанных объектов изобретения благодаря дисульфидному сцеплению первого антигенсвязывающего фрагмента и второго антигенсвязывающего фрагмента с помощью дисульфидной(ых) связи(ей), описанной(ых) выше, антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, может снижать и/или предупреждать нежелательное перекрестное сшивание и активацию иммунных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток, DC-клеток или т.п.). Это означает, что в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, связывается с любой сигнальной молекулой, которая экспрессируется на

иммунной клетке, такой как Т-клетка (например, первый антиген), и второй антигенсвязывающий домен антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, связывается также с любой сигнальной молекулой, которая экспрессируется на иммунной клетке, такой как Т-клетка (например, первый антиген или второй антиген, отличный от первого антигена). Таким образом, первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, может связываться с любой из первой или второй сигнальных молекул, экспрессируемых на одной и той же индивидуальной иммунной клетке, такой как Т-клетка (т.е. в форме *цис*-связывания), или на разных иммунных клетках, таких как Т-клетки (т.е. в форме *транс*-связывания). Когда первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен связываются с сигнальной молекулой, экспрессируемой на различных иммунных клетках, таких как Т-клетки, в форме *транс*-связывания, то указанные различные иммунные клетки, такие как Т-клетки, перекрестно сшиваются, и в некоторых ситуациях указанное перекрестное сшивание иммунных клеток, таких как Т-клетки, может приводить к нежелательной активации иммунных клеток, таких как Т-клетки.

С другой стороны, существует другой вариант антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, согласно которому в антигенсвязывающей молекуле, содержащей первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, которые сцеплены друг с другом по меньшей мере через одну дисульфидную связь в СН1-участке (положение 191 согласно ЕУ-нумерации), и первый антигенсвязывающий фрагмент, и второй антигенсвязывающий фрагмент, оба могут связываться с сигнальными молекулами, экспрессируемыми на одних и тех же индивидуальных иммунных клетках, таких как Т-клетка, в форме «*цис*-связывания», в результате чего перекрестное сшивание различных иммунных клеток, таких как Т-клетки, через антигенсвязывающую молекулу можно снижать во избежание нежелательной активации иммунных клеток.

В настоящем описании указанный выше признак, т.е. наличие по меньшей мере одной дисульфидной связи в СН1-участке (например, в положении 191 согласно ЕУ-нумерации), связывающая первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, можно обозначать с помощью

сокращенного понятия «LINC». С использованием этого сокращения в некоторых вариантах осуществления изобретения описанную выше антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в настоящем изобретении, которая имеет по меньшей мере одну дисульфидную связь, можно обозначать, например, как «LINC-формат», «Dual/LINC» или «DLL3-Dual/LINC» или т.п. Аналогично этому, антигенсвязывающие молекулы, в которых первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, которые не сцеплены/еще не сцеплены друг с другом по меньшей мере через одну дисульфидную связь в CH1-участке (положение 191 согласно EU-нумерации), можно обозначать с помощью сокращенного понятия «UnLINC».

Молекула Fab

Понятие «молекула Fab» относится к белку, состоящему из VH и CH1-домена тяжелой цепи («тяжелая цепь Fab») и VL и CL-домена легкой цепи («легкая цепь Fab») иммуноглобулина.

Слитые

Под понятием «слитые» подразумевается, что компоненты (например, молекула Fab и субъединица Fc-домена) сцеплены пептидными связями либо непосредственно, либо через один или несколько пептидных линкеров.

«Кроссовер»-Fab

Под понятием молекула «кроссовер»-Fab (которую обозначают также как «Crossfab») подразумевают молекулу Fab, в которой либо переменные области, либо константные области тяжелой и легкой цепей Fab обменены, т.е. молекула кроссовер-Fab содержит пептидную цепь, которая состоит из переменной области легкой цепи и константной области тяжелой цепи, и пептидную цепь, которая состоит из переменной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи. Для ясности изложения в молекуле кроссовер-Fab, в которой переменные области легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab обменены, пептидную цепь, которая содержит константную область тяжелой цепи в контексте настоящего описания обозначают как «тяжелая цепь» молекулы кроссовер-Fab. И наоборот, в молекуле кроссовер-Fab, в которой константные области легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab обменены, пептидную цепь, которая содержит переменную область тяжелой цепи в контексте настоящего описания обозначают как «тяжелая цепь» молекулы кроссовер-Fab.

«Канонический» Fab

В отличие от этого, под молекулой «канонического» Fab подразумевают молекулу Fab в ее встречающемся в естественных условиях формате, т.е. содержащую тяжелую цепь, которая состоит из переменной и константной областей тяжелой цепи (VH-CH1), и легкую цепь, которая состоит из переменной и константной областей легкой цепи (VL-CL). Понятие «молекула иммуноглобулина» относится к белку, который имеет структуру встречающегося в естественных условиях антитела. Например, иммуноглобулины IgG-класса представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, связанных дисульфидными мостиками. В направлении от N-конца к C-концу каждая тяжелая цепь имеет переменную область (VH), которую называют также переменным тяжелым доменом или переменным доменом тяжелой цепи, за которой следует три константных домена (CH1, CH2 и CH3), которые называют также константной областью тяжелой цепи. Аналогично этому, в направлении от N-конца к C-концу каждая легкая цепь имеет переменную область (VL), которую называют также переменным легким доменом или переменным доменом легкой цепи, за которой следует константный домен легкой цепи (CL), который называют также константной областью легкой цепи. Тяжелая цепь иммуноглобулина может принадлежать к одному из пяти типов, которые обозначают как альфа (IgA), дельта (IgD), эпсилон (IgE), гамма (IgG) или мю (IgM), некоторые из которых можно дополнительно подразделять на подтипы, например, гамма1 (IgG1), гамма2 (IgG2), гамма3 (IgG3), гамма4 (IgG4), альфа1 (IgA1) и альфа2 (IgA2). Легкая цепь иммуноглобулина может принадлежать к одному из двух типов, которые обозначают как каппа и лямбда на основе аминокислотной последовательности ее константного домена. Иммуноглобулин по существу состоит из двух молекул Fab и Fc-домена, которые сцеплены через шарнирную область иммуноглобулина.

Аффинность

Понятие «аффинность» относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между одним связывающим сайтом молекулы (например, антигенсвязывающей молекулы или антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). В контексте настоящего описания, если не указано иное,

«аффинность связывания» относится к присущей молекуле аффинности связывания, отражающей взаимодействие по типу 1:1 между компонентами связывающейся пары (например, антигенсвязывающей молекулой и антигеном или антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y, как правило, можно характеризовать с помощью константы диссоциации (KD), которая представляет собой отношение констант скоростей реакции диссоциации и ассоциации (k_{off} и k_{on} соответственно). Таким образом, эквивалентные аффинности могут соответствовать различным константам скорости, если отношение констант остается одинаковым. Аффинность можно оценивать с помощью общепринятых методов, известных в данной области, включая те, которые представлены в настоящем описании. Конкретный метод измерения аффинности основан на явлении поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Методы определения аффинности

В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула или антитело, представленная/представленное в настоящем описании, имеют константу диссоциации (KD), характеризующую связывание с антигеном, составляющую 1мкМ или менее, 120нМ или менее, 100нМ или менее, 80нМ или менее, 70нМ или менее, 50нМ или менее, 40нМ или менее, 30нМ или менее, 20нМ или менее, 10нМ или менее, 2нМ или менее, 1нМ или менее, 0,1нМ или менее, 0,01нМ или менее или 0,001нМ или менее (например, 10^{-8} М или менее, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). В конкретных вариантах осуществления изобретения величина KD, характеризующая связывание антитела/антигенсвязывающей молекулы с CD3, CD137 или DLL3 находится в диапазоне 1-40, 1-50, 1-70, 1-80, 30-50, 30-70, 30-80, 40-70, 40-80 или 60-80нМ.

В одном из вариантов осуществления величину KD измеряют с помощью анализа связывания несущего радиоактивную метку антигена (РИА). В одном из вариантов осуществления изобретения РИА осуществляют с использованием Fab-версии представляющего интерес антитела и его антигена. Например, измеряют в растворе аффинность связывания Fab с антигеном путем уравнивания Fab минимальной концентрацией ^{125}I -меченного антигена в присутствии полученных титрованием разведений немеченого антигена, осуществляя затем захват связанного антигена на сенсibilизированном

антителом к Fab планшете (см., например, Chen и др., J. Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881). Для обеспечения условий, необходимых для проведения анализа, многолуночные планшеты MICROTITER[®] (фирма Thermo Scientific)

сенсibiliзируют в течение ночи захватывающим антителом к Fab (фирма

- 5 Carpel Labs) в концентрации 5 мкг/мл в 50мМ карбонате натрия (рН 9,6) и затем блокируют с помощью 2% (мас./об.) бычьего сывороточного альбумина в 3ФР в течение 2-5 ч при комнатной температуре (примерно 23°C). В неадсорбирующем планшете (фирма Nunc, № 269620) смешивают взятый в концентрации 100 или 26пМ меченный с помощью ¹²⁵I антиген с серийными разведениями
- 10 представляющего интерес Fab (например, пригодного для оценки антитела к VEGF, Fab-12, см. Presta и др., Cancer Res. 57, 1997, сс. 4593-4599). Затем представляющий интерес Fab инкубируют в течение ночи; однако инкубацию можно осуществлять в течение более продолжительного периода времени (например, в течение примерно 65 ч) для того, чтобы гарантировать достижение
- 15 равновесия. После этого смеси переносят в подготовленный для захвата планшет и инкубируют при комнатной температуре (например, в течение 1 ч). Затем раствор удаляют и планшет промывают восемь раз 0,1% полисорбатом 20 (TWEEN-20[®]) в 3ФР. После просушки планшетов в них добавляют по 150
- 20 мкл/лунку сцинтилляционной жидкости ((MICROSCINT-20TM; фирма Packard) и осуществляют считывание планшетов с помощью гамма-счетчика TOPCOUNTTM (фирма Packard) в течение 10 мин. Для осуществления анализа связывания в условиях конкуренции выбирают концентрации каждого Fab, обеспечивающие уровень связывания, составляющий менее или равный 20% от максимального.

В другом варианте осуществления изобретения Kd измеряют методом

25 поверхностного плазмонного резонанса с помощью BIACORE[®]-анализа.

Например, анализ осуществляют с помощью устройства BIACORE[®]-2000 или BIACORE[®]-3000 (фирма GE Healthcare Inc., Пискатавей, шт. Нью-Джерси) при 25°C с использованием антигена, иммобилизованного на CM5-чипах с уровнем иммобилизации, соответствующим ~10 единицам ответа (RU). В одном из

30 вариантов осуществления изобретения биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, фирма BIACORE Inc.) активируют с помощью гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида

(EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антиген разводят 10мМ ацетатом натрия, pH 4,8 до концентрации 5 мкг/мл (~ 0,2мкМ) перед инъекцией со скоростью потока 5 мкл/мин для достижения уровня иммобилизации, соответствующего примерно 10 единицам ответа (RU) сшитого белка. После инъекции антигена инъецируют 1М этаноламин для блокады непрореагировавших групп. Для кинетических измерений инъецируют двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 до 500нМ) в ЗФР, дополненном 0,05% полисорбата 20 (TWEEN-20TM) в качестве поверхностно-активного вещества (ЗФРТ), при 25°C со скоростью потока примерно 25 мкл/мин. Скорость реакции ассоциации (k_{on}) и реакции диссоциации (k_{off}) рассчитывают с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1 (программное обеспечение Evaluation версия 3.2, BIACORE®) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия реакции диссоциации (K_d) рассчитывают как отношение k_{off}/k_{on} (см., например, Chen и др., J Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881). Если скорость реакции ассоциации превышает $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ при оценке с помощью описанного выше метода поверхностного плазмонного резонанса, то скорость реакции ассоциации можно определять с помощью метода гашения флуоресценции, который позволяет измерять повышение или снижение интенсивности излучения флуоресценции (длина волны возбуждения 295 нм; длина волны испускания 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C применяемого в концентрации 20нМ антитела к антигену (Fab-формат) в ЗФР, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, осуществляя измерения с помощью спектрометра, такого как спектрофотометр, снабженный блоком для остановки потока (фирма Aviv Instruments), или спектрофотометр SLM-AMINCOTM серии 8000 (фирма ThermoSpectronic), при перемешивании содержимого кюветы.

Используя описанные выше методы измерения аффинности антигенсвязывающей молекулы или антитела, специалисты в данной области могут осуществлять измерение аффинности других антигенсвязывающих молекул или антител в отношении различных типов антигенов.

Антитело

В контексте настоящего описания понятие «антитело» используется в его наиболее широком смысле, и оно относится к различным структурам антител,

включая (но не ограничиваясь только ими) моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они обладают требуемой антигенсвязывающей активностью.

5 Фрагмент антитела

Понятие «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают (но не ограничиваясь только ими) молекулы Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; димерные антитела (диабоды); линейные антитела; 10 одноцепочечные молекулы антител (например, scFv) и однодоменные антитела (dAb). Обзор некоторых фрагментов антител см. у Hudson и др., Nat Med 9, 2003, сс. 129-134. Обзор scFv-фрагментов см, например, у Pluckthun, в: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, т. 113, под ред. Rosenberg и Moore (изд- 15 во Springer-Verlag, New York), 1994, сс. 269-315; см. также WO 93/16185; и патенты США №№ 5571894 и 5587458. Обсуждение, касающееся Fab- и F(ab')₂-фрагментов, которые содержат остатки эпитопа, связывающегося с рецептором спасения, и обладают удлинённым временем полужизни *in vivo*, см. в патенте США № 5869046.

20 Димерные антитела представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими центрами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими (см., например, EP 0404097; WO 1993/01161; Hudson и др., Nat. Med. 9, 2003, сс. 129-134; и Holliger и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 6444-6448). Тримерные и тетрамерные антитела описаны также у 25 Hudson и др., Nat. Med. 9, 2003, сс. 129-134.

Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь вариабельный домен тяжелой цепи или его часть, или весь вариабельный домен легкой цепи антитела или его часть. В конкретных вариантах осуществления изобретения однодоменное антитело представляет 30 собой человеческое однодоменное антитело (фирма Domantis, Inc., Уолтхэм, шт. Массачусетс; см., например, патент США № 6248516 B1).

Фрагменты антител можно создавать различными методиками, включая (но не ограничиваясь только ими) протеолитическое расщепление интактного

антитела, а также получать с помощью рекомбинантных клеток-хозяев (например, *E. coli* или фаг), указанных в настоящем описании.

Класс антитела

Понятие «класс» антитела относится к типу константного домена или константной области, который/которая входит в его тяжелую цепь. Известно пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и некоторые из них можно подразделять дополнительно на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначают как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю соответственно.

Если не указано иное, то аминокислотные остатки в константной области легкой цепи нумеруют согласно Kabat и др., а нумерация аминокислотных остатков в константной области тяжелой цепи соответствует системе нумерации EU, которую обозначают также как EU-индекс, описанной у Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Каркасный участок

Понятие «каркасный участок» или «FR», обозначает остатки варибельного домена, отличные от остатков гиперварибельного участка (HVR). FR варибельного домена, как правило, состоит из четырех FR-доменов: FR1, FR2, FR3 и FR4. Таким образом, последовательности HVR и FR, как правило, имеют следующее расположение в VH (или VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Человеческий консенсусный каркасный участок

«Человеческий консенсусный каркасный участок» представляет собой каркасный участок, в который входят наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки в выбранных последовательностях каркасных участков VL или VH человеческого иммуноглобулина. Как правило, выбор последовательностей VL или VH человеческого иммуноглобулина осуществляют из подгруппы последовательностей варибельных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу, описанную у Kabat и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., публикация NIH 91-3242, Bethesda MD, т.т. 1-3, 1991. В одном из вариантов осуществления

изобретения касательно VL подгруппа представляет собой подгруппу каппа I согласно Kabat и др., выше. В одном из вариантов осуществления изобретения касательно VH подгруппа представляет собой подгруппу III согласно Kabat и др., выше.

5 Химерное антитело

Понятие «химерное» антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из конкретного источника или вида, а остальная часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из другого источника или вида. Аналогично этому, понятие «вариабельный домен химерного антитела» относится к вариабельной области антитела, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из конкретного источника или вида, а остальная часть тяжелой и/или легкой цепи имеет происхождение из другого источника или вида.

10 Гуманизированное антитело

15 Понятие «гуманизированное» антитело относится к химерному антителу, которое содержит аминокислотные остатки из нечеловеческих HVR и аминокислотные остатки из человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированное антитело может содержать практически все из по меньшей мере одного и, как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют участкам нечеловеческого антитела, а все или практически все FR соответствуют участкам человеческого антитела. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, происходящей из человеческого антитела. Понятие «гуманизированная форма» антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое подвергли гуманизации. «Гуманизированная вариабельная область антитела» относится к вариабельной области гуманизированного антитела.

20 Человеческое антитело

25 «Человеческое антитело» представляет собой антитело, имеющее аминокислотную последовательность, которая соответствует последовательности антитела, продуцируемого в организме человека или в человеческой клетке, или имеющее происхождение из нечеловеческого источника, в котором использован спектр человеческих антител или другие

кодирующие человеческое антитело последовательности. Из указанного определения человеческого антитела специально исключено гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

«Человеческая переменная область антитела» относится к переменной области человеческого антитела.

Полинуклеотид (нуклеиновая кислота)

Понятие «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота», которое применяют взаимозаменяемо в контексте настоящего описания, относится к полимерам нуклеотидов любой длины и включает ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в полимер с помощью ДНК- или РНК-полимеразы или с помощью реакции синтеза. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Последовательность нуклеотидов может прерываться компонентами, которые не представляют собой нуклеотиды. Полинуклеотид может содержать модификацию(и), осуществленную(ые) после синтеза, такую как конъюгация с меткой. Другие типы модификаций включают, например, «кэпы», замену одного или нескольких встречающихся в естественных условиях нуклеотидов на аналоги, межнуклеотидные модификации, такие, например, как модификации, созданные с помощью незаряженных связей (например, метилфосфонаты, сложные фосфотиоэфиры, фосфорамидаты, карбаматы и т.д.) и с помощью заряженных связей (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т.д.), модификации, содержащие «подвешенные» остатки, такие, например, как белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.д.), модификации, созданные с помощью интеркаляторов (например, акридин, псорален и т.д.), модификации, содержащие хелаторы (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, металлы-окислители и т.д.), модификации, содержащие алкилаторы, модификации с модифицированными связями (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.д.), а также немодифицированные формы полинуклеотида(ов). Кроме того, любую из гидроксильных групп, обычно присутствующих в сахарах, можно заменять, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищать с помощью стандартных защитных

групп или активировать для получения дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или можно конъюгировать с твердыми или полутвердыми подложками. 5'- и 3'- концевую ОН-группу можно фосфорилировать или замещать аминами или фрагментами органических кэпирующих групп, состоящими из 1-20 атомов углерода. Другие гидроксилы можно также дериватизировать с получением стандартных защитных групп. Полинуклеотиды могут содержать также формы аналогов сахаров рибозы или дезоксирибозы, которые хорошо известны в данной области, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидо-рибозу, карбоциклические аналоги сахаров, альфа-аномерные сахара, эпимеры сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные формы сахаров, фуранозные формы сахаров, седогептулозы, ациклические аналоги и основные нуклеозидные аналоги, такие как метилрибозид. Одна или несколько фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными связывающими группами. Указанные альтернативные связывающие группы включают (но не ограничиваясь только ими) варианты, в которых фосфат заменен на P(O)S («тиоат»), P(S)S («дитиоат»), (O)NR₂ («амидат»), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ («формацеталь»), в которых R или R' каждый независимо друг от друга обозначает H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), необязательно содержащий эфирную (-O-)-связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не является необходимым, чтобы все связи в полинуклеотиде были идентичными. Представленное выше описание относится ко всем полинуклеотидам, указанным в настоящем описании, включая РНК и ДНК.

Выделенная (нуклеиновая кислота)

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой нуклеиновую кислоту, которая отделена от компонента ее естественного окружения. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты включает также молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетке, которая в норме включает молекулу нуклеиновой кислоты, но в которой молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы или в которой ее локализация на хромосоме отличается от ее встречающейся в естественных условиях локализации на хромосоме.

Вектор

Понятие «вектор» в контексте настоящего описания относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая обладает способностью к размножению другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Понятие включает вектор в виде

5 самореплицирующейся структуры нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он интродуцирован. Некоторые векторы обладают способностью контролировать экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Указанные векторы в контексте настоящего описания обозначают как «экспрессионные векторы». Векторы

10 можно интродуцировать в клетки-хозяева с использованием вируса или электропорации. Однако интродукция векторов не ограничена методом *in vitro*. Например, векторы можно интродуцировать также в организм непосредственно с помощью метода *in vivo*.

В других объектах настоящего изобретения векторы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающий фрагмент,

15 обладающий способностью связываться с CD3 и CD137, но не одновременно, антигенсвязывающий фрагмент, обладающий способностью связываться с DLL3, антигенсвязывающие молекулы или антитела, представленные в настоящем описании, можно интродуцировать индивидуумам для экспрессии

20 антигенсвязывающих фрагментов, антигенсвязывающих молекул или антител, представленных в настоящем описании, непосредственно в организме индивидуума. Примером векторов, которые можно использовать являются (но не ограничиваясь только им) аденовирус. Можно также вводить молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающие фрагменты,

25 антигенсвязывающие молекулы или антитела, представленные в настоящем описании, индивидууму непосредственно или вводить молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающие фрагменты, антигенсвязывающие молекулы или антитела, представленные в настоящем описании, индивидууму путем электропорации или вводить клетки, содержащие

30 молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует антигенсвязывающие фрагменты, антигенсвязывающие молекулы или антитела, представленные в настоящем описании, которые могут экспрессироваться или секретироваться в организме индивидуума, для постоянной экспрессии и секреции

антигенсвязывающих фрагментов, антигенсвязывающих молекул или антител, представленных в настоящем описании, в организме индивидуума.

Клетка-хозяин

Понятия «клетка-хозяин», «линия клеток-хозяев» и «культура клеток-хозяев» используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство указанных клеток. К клеткам-хозяевам относятся «трансформанты» и «трансформированные клетки», которые включают первично трансформированную клетку и полученное из нее потомство безотносительно к количеству пересевов. Потомство может не быть полностью идентичным по составу нуклеиновых кислот родительской клетке, а может содержать мутации. Понятие включает мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, которая обнаружена в результате скрининга или отбора у исходной трансформированной клетки.

Специфичность

«Специфичность» означает, что молекула, которая связывается специфически с одним или несколькими партнерами по связыванию, не обладает каким-либо значительным связыванием с молекулами, отличными от партнеров. Кроме того, понятие «специфичность» используют также, когда антигенсвязывающий центр обладает специфичностью в отношении конкретного эпитопа из множества эпитопов, присутствующих в антигене. Если антигенсвязывающая молекула связывается специфически с антигеном, то ее обозначают также как «антигенсвязывающая молекула, которая обладает/характеризуется специфичностью к/в отношении антигена». Когда эпитоп, с которым связывается антигенсвязывающий центр, присутствует в нескольких различных антигенах, то антигенсвязывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий центр, может связываться с различными антигенами, имеющими эпитоп.

Фрагмент антитела

Понятие «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, связывающуюся с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антитела включают (но не ограничиваясь только ими) Fv,

Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; димерные антитела (диабоди); линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Понятия «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «цельное антитело» в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, практически сходную с нативной структурой антитела, или имеющего тяжелые цепи, которые содержат представленную в настоящем описании Fc-область.

Вариабельный фрагмент (Fv)

В контексте настоящего описания понятие «вариабельный фрагмент (Fv)» относится к минимальному компоненту антигенсвязывающего центра, имеющему происхождение из антитела, который состоит из пары, включающей вариабельную область легкой цепи антитела (VL) и вариабельную область тяжелой цепи антитела (VH). В 1988 г. Skerra и Pluckthun обнаружили, что гомогенные и активные антитела можно получать из периплазматической фракции *E. coli* путем инсерции гена антитела в прямом направлении относительно бактериальной сигнальной последовательности и индукции экспрессии гена в *E. coli* (Science 240(4855), 1988, сс. 1038-1041). В Fv, полученном из периплазматической фракции, ассоциация VH с VL происходила таким образом, что имело место связывание с антигеном.

scFv, одноцепочечное антитело и sc(Fv)₂

В контексте настоящего описания понятия «scFv», «одноцепочечное антитело» и «sc(Fv)₂» все относятся к фрагменту антитела, состоящему из одной полипептидной цепи, которая содержит вариабельные области, имеющие происхождение из тяжелой и легкой цепей, но не содержит константную область. В целом, одноцепочечное антитело содержит также полипептидный линкер между VH – и VL-доменами, который позволяет образовывать требуемую структуру, которая, как считается, должна обеспечивать связывание с антигеном. Подробности, касающиеся одноцепочечного антитела, обсуждены у Pluckthun в: «The Pharmacology of Monoclonal Antibodies», т. 113, под ред. Rosenberg и Moore, изд-во Springer-Verlag, New York, 1994, сс. 269-315 (см. также публикацию международной заявки на патент WO 1988/001649; патенты США №№ 4946778 и 5260203). В конкретном варианте осуществления

изобретения одноцепочечное антитело может быть биспецифическим и/или гуманизированным.

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

sc(Fv)₂ представляет собой одноцепочечное антитело, в котором четыре переменные области двух VL и двух VH сцеплены с помощью линкеров, таких как пептидные линкеры, с образованием одной цепи (J Immunol. Methods 231(1-2), 1999, сс. 177-189). Две VH и две VL могут иметь происхождение из различных моноклональных антител. Указанная молекула sc(Fv)₂ предпочтительно включает, например, биспецифическую молекулу sc(Fv)₂, распознающую два эпитопа, которые присутствуют в одном антигене, что описано в Journal of Immunology 152(11), 1994, сс. 5368-5374. sc(Fv)₂ можно получать методами, известными специалистам в данной области. Например, sc(Fv)₂ можно получать путем сцепления scFv с помощью линкера, такого как пептидный линкер.

В контексте настоящего описания sc(Fv)₂ включает два VH-компонента и два VL-компонента, которые упорядочены следующим образом: VH, VL, VH и VL ([VH]-линкер-[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VL]), начиная с N-конца одноцепочечного полипептида. Порядок расположения двух VH-компонентов и двух VL-компонентов не ограничен указанной выше формой, и они могут располагаться любым образом. Примеры порядка расположения проиллюстрированы ниже.

[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VH]-линкер-[VL],
[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VL]-линкер-[VH],
[VH]-линкер-[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VL],
[VL]-линкер-[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VH],
[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VH].

Молекулярная форма sc(Fv)₂ описана также подробно в WO 2006/132352.

На основе указанного описания специалисты в данной области легко могут получать молекулу $sc(Fv)_2$, требуемую для создания полипептидных комплексов, указанных в настоящем описании.

Кроме того, антигенсвязывающие молекулы или антитела, указанные в настоящем описании, можно конъюгировать с носителем-полимером, таким как ПЭГ, или органическим соединением, таким как противораковый агент. Альтернативно этому, в антигенсвязывающие молекулы или антитела предпочтительно встраивают дополнительную последовательность сахарной цепи так, чтобы сахарная цепь оказывала требуемое действие.

Линкеры, которые можно применять для соединения переменных областей антитела, представляют собой произвольные пептидные линкеры, которые можно интродуцировать посредством генетической инженерии, синтетические линкеры и линкеры, описанные, например, в Protein Engineering, 9(3), 1996, сс. 299-305. Однако в настоящем описании предпочтительными являются пептидные линкеры. Длина пептидных линкеров не ограничена конкретной длиной, и специалисты в данной области могут выбирать ее соответственно в зависимости от поставленной цели. Длина предпочтительно составляет пять аминокислот или более (без конкретного ограничения, верхний предел, как правило, составляет 30 аминокислот или менее, предпочтительно 20 аминокислот или менее) и наиболее предпочтительно 15 аминокислот. Когда $sc(Fv)_2$ содержит три пептидных линкера, то длина их всех может быть одинаковой или различной.

Например, указанные пептидные линкеры включают:

Ser,

Gly-Ser,

Gly-Gly-Ser,

Ser-Gly-Gly,

Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 91),

Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 92),

Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 93),

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 94),

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 95),

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 96),

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 97),
Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 98),
(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 93))_n и
(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 94))_n,

5 где *n* обозначает целое число 1 или более. Длину или последовательности пептидных линкеров могут выбирать соответственно специалисты в данной области в зависимости от поставленной цели.

Синтетические линкеры (химические перекрестносшивающие агенты), как правило, применяют для перекрестного сшивания пептидов, и их примеры
10 включают:

N-гидроксисукцинимид (NHS),
дисукцинимидилсуберат (DSS),
бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS3),
дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP),
15 дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP),
этиленгликольбис(сукцинимидилсукцинат) (EGS),
этиленгликольбис(сульфосукцинимидилсукцинат) (сульфо-EGS),
дисукцинимидилтартрат (DST), дисульфосукцинимидилтартрат (сульфо-
DST),

20 бис[2-(сукцинимидоксикарбонилокси)этил] (BSOCOES) и
бис[2-(сульфосукцинимидоксикарбонилокси)этил]сульфон (сульфо-
BSOCOES). Указанные перекрестносшивающие агенты поступают в
продажу.

В целом, для соединения вместе четырех переменных областей антитела
25 требуются три линкера. Применяемые линкеры могут быть одного типа или
разных типов.

Fab, F(ab')₂ и Fab'

«Fab» состоит из одной легкой цепи и CH1-домена и переменной области
из одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать
30 дисульфидные связи с другой молекулой тяжелой цепи.

«F(ab')₂» или «Fab» получают обработкой иммуноглобулина
(моноклонального антитела) протеазой, такой как пепсин и папаин, и понятие
относится к фрагменту антитела, созданному путем расщепления

иммуноглобулина (моноклонального антитела) вблизи дисульфидных связей, присутствующих между шарнирными областями в каждой из двух Н-цепей. Например, папаин расщепляет IgG в обратном направлении относительно дисульфидных связей, присутствующих между шарнирными областями в каждой из двух Н-цепей, с образованием двух гомологичных фрагментов антител, в которых L-цепь, содержащая VL (вариабельную область L-цепи) и CL (константную область L-цепи), сцеплена с фрагментом Н-цепи, содержащим VH (вариабельную область Н-цепи) и СН-гамма 1 (участок гамма 1 в константной области Н-цепи) через дисульфидную связь в их С-концевых областях. Каждый из указанных двух гомологичных фрагментов антитела обозначают как Fab'.

«F(ab')₂» состоит из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, содержащих константную область СН1-домена и часть СН2-доменов, в результате чего между двумя тяжелыми цепями образуются дисульфидные связи. F(ab')₂, указанный в настоящем описании, предпочтительно можно получать следующим методом. Цельное моноклональное антитело или подобную молекулу, содержащую требуемый антигенсвязывающий центр, частично расщепляют протеазой, такой как пепсин; и Fc-фрагменты удаляют путем адсорбции на колонке с белком А. Протеаза не ограничена конкретной протеазой, если она обладает способностью расщеплять цельное антитело избирательным образом с образованием F(ab')₂ в соответствующих требуемых условиях ферментативной реакции, таких как рН. Указанные протеазы включают, например, пепсин и фицин.

Однодоменное антитело

В настоящем описании понятие «однодоменное антитело» не ограничено конкретной структурой, если домен сам может проявлять антигенсвязывающую активность. Известно, что каноническое антитело, примером которого является антитело IgG-типа, проявляет антигенсвязывающую активность в состоянии, в котором вариабельная область формируется путем спаривания VH и VL, в то время как однодоменное антитело обладает способностью проявлять антигенсвязывающую активность посредством только его собственной доменной структуры без спаривания с другим доменом. Однодоменные антитела, как правило, имеют относительно низкую молекулярную массу и находятся в форме мономера.

Примеры однодоменного антитела включают (но не ограничиваясь только ими) антигенсвязывающие молекулы, в которых в естественных условиях отсутствуют легкие цепи, такие как V_HH животных семейства верблюдовых (*Camelidae*) и V_{NAR} акул, и фрагменты антител, которые содержат цельный V_H-домен антитела или его часть или цельный V_L-домен антитела или его часть.

Примеры однодоменного антитела, которое представляет собой фрагмент антитела, содержащий цельный V_H/V_L-домен или его часть, включают (но не ограничиваясь только ими) искусственно полученные однодоменные антитела, имеющие происхождение из V_H человеческого антитела или V_L человеческого антитела, которые описаны, например, в патенте США № 6248516 B1 и т.д. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения одно однодоменное антитело имеет три CDR (CDR1, CDR2 и CDR3).

Однодоменные антитела можно получать из животного, которое обладает способностью продуцировать однодоменное антитело, или путем иммунизации животного, которое обладает способностью продуцировать однодоменное антитело. Примеры животных, которые обладают способностью продуцировать однодоменное антитело, включают (но не ограничиваясь только ими) животных семейства верблюдовых и трансгенных животных, несущих ген, способный продуцировать однодоменное антитело. К животным семейства верблюдовых относятся верблюды, ламы, альпаки, дромедары, гуанако и др. Примеры трансгенных животных, несущих ген, способный продуцировать однодоменное антитело, включают (но не ограничиваясь только ими) трансгенных животных, которые описаны в международной публикации WO 2015/143414 или публикации патента США 2011/0123527 A1. Гуманизированные однодоменные антитела можно получать также путем замены последовательностей каркасных участков однодоменного антитела, полученных из животного, на последовательности человеческой зародышей линии или сходные последовательности. Гуманизированное однодоменное антитело (например, гуманизированное V_HH) является одним из вариантов однодоменного антитела, предлагаемого в настоящем изобретении.

Альтернативно этому, однодоменные антитела можно получать из полипептидных библиотек, содержащих однодоменные антитела, с помощью ELISA, пэннинга или т.п. Примеры полипептидных библиотек, содержащих

однодоменные антитела, включают (но не ограничиваясь только ими) библиотеки наивных антител, полученные из различных животных или людей (см., например, *Methods in Molecular Biology* 911, 2012, сс. 65-78 и *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1764, 8, 2006, сс. 1307-1319),

- 5 библиотеки антител, полученных путем иммунизации различных животных (см., например, *Journal of Applied Microbiology* 117, 2, 2014, сс. 528-536), и библиотеки синтетических антител, полученных из генов антител различных животных или людей (см., например, *Journal of Biomolecular Screening* 21,1, 2016, сс. 35-43, *Journal of Biological Chemistry* 291, 24, 2016, сс. 12641-12657) и
10 AIDS 30, 11, 2016, сс. 691-1701).

Fc-область

- Понятие «Fc-область» или «Fc-домен» относится к области, которая содержит фрагмент, состоящий из шарнирной области или ее части и CH2- и CH3-доменов молекулы антитела. Fc-область IgG-класса означает (но не
15 ограничиваясь только ею) область, простирающуюся, например, от цистеина 226 (EU-нумерация (которую обозначают в настоящем описании как EU-индекс) до С-конца, или пролина 230 (EU-нумерация) до С-конца. Fc-область предпочтительно можно получать путем частичного расщепления, например, моноклонального антитела в виде IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, с помощью
20 протеолитического фермента, такого как пепсин, с последующим повторным элюированием фракции, адсорбированной на колонке с белком А или колонке с белком G. Указанный протеолитический фермент не ограничен конкретным ферментом, если он обладает способностью расщеплять цельное антитело до укороченной формы Fab или F(ab')₂ при соответствующих заданных условиях
25 реакции для фермента (например, pH). Их примеры включают пепсин и папаин.

- Fc-область, полученную, например, из встречающегося в естественных условиях IgG, можно применять в качестве «Fc-области», предлагаемой в настоящем изобретении. В этом контексте встречающийся в естественных условиях IgG означает полипептид, который содержит аминокислотную
30 последовательность, идентичную последовательности IgG, встречающегося в природе, и принадлежит к классу антитела, который практически кодируется геном иммуноглобулина гамма. Встречающийся в естественных условиях человеческий IgG означает, например, встречающийся в естественных условиях

человеческий IgG1, встречающийся в естественных условиях человеческий IgG2, встречающийся в естественных условиях человеческий IgG3 или встречающийся в естественных условиях человеческий IgG4. Встречающийся в естественных условиях человеческий IgG включает также варианты или т.п., спонтанно образовавшиеся из него. Описано множество последовательностей аллотипов, основанных на полиморфизме генов, в качестве константных областей антител, таких как человеческий IgG1, человеческий IgG2, человеческий IgG3 и человеческий IgG4, в Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No. 91-3242, любые из которых можно применять в настоящем изобретении. В частности, в случае человеческого IgG1 аминокислотная последовательность в положениях 356-358 (EU-нумерация) может представлять собой DEL или EEM.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы состоит из пары полипептидных цепей, содержащих домены тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина. Например, Fc-домен молекулы иммуноглобулина G (IgG) представляет собой димер, каждая субъединица которого содержит CH2 и CH3 константных доменов IgG. Две субъединицы Fc-домена обладают способностью к стабильной ассоциации друг с другом. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, содержит не более одного Fc-домена.

В одном из указанных в настоящем описании вариантов осуществления изобретения Fc-домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы представляет собой Fc-домен IgG. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1. Еще в одном конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-область человеческого IgG1.

В конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы состоит из первой и второй субъединиц Fc-области, которые обладают способностью к стабильной ассоциации, и Fc-домен характеризуется пониженной аффинностью связывания с человеческим рецептором Fc-гамма по сравнению с Fc-доменом нативного человеческого IgG1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, указанной в настоящем описании, содержит модификацию, способствующую ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная модификация представляет собой так называемую модификацию «knob-into-hole» («выступ-во-впадину»), включающую модификацию, приводящую к образованию «выступа», в одной из двух субъединиц Fc-домена, и модификацию, приводящую к образованию «впадины», в другой одной из двух субъединиц Fc-домена, что более подробно будет описано ниже.

В конкретном варианте осуществления изобретения в Fc-домене, который состоит из первой и второй субъединиц Fc-области, которые обладают способностью к стабильной ассоциации, и характеризуется пониженной аффинностью связывания с человеческим рецептором Fc-гамма по сравнению с Fc-доменом нативного человеческого IgG1, первая субъединица Fc-области выбрана из группы, которая состоит из:

- (a1) полипептида Fc-области, содержащего мутации L234A, L235A;
- (a2) полипептида Fc-области, содержащего мутации L234A, L235A, N297A;
- (a3) полипептида Fc-области, содержащего мутации L234A, L235A, N297A, S354C, T366W; и

вторая субъединица Fc-области выбрана из группы, которая состоит из:

- (a4) полипептида Fc-области, содержащего мутации L234A, L235A;
- (a5) полипептида Fc-области, содержащего мутации L234A, L235A, N297A;

и

(a6) полипептида Fc-области, содержащего мутации L234A, L235A, N297A, Y349C, T366S, L368A, Y407V (положения аминокислот пронумерованы с использованием нумерации с помощью EU-индекса).

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, указанной в настоящем описании, характеризуется повышенной FcRn-связывающей активностью в условиях кислого pH (например, pH 5,8) по сравнению с активностью Fc-области нативного IgG. Указанный Fc-домен содержит, например, Ala в положении 434; Glu, Arg, Ser или Lys в положении 438; и Glu, Asp или Gln в положении 440

согласно EU-нумерации. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен содержит Ala в положении 434; Arg или Lys в положении 438; и Glu или Asp в положении 440 согласно EU-нумерации. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен содержит также Ile или Leu в положении 428; и/или Ile, Leu, Val, Thr или Phe в положении 436 согласно EU-нумерации. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен содержит комбинацию аминокислотных замен, выбранных из группы, которая состоит из

- (a) N434A/Q438R/S440E;
- (б) N434A/Q438R/S440D;
- 10 (в) N434A/Q438K/S440E;
- (г) N434A/Q438K/S440D;
- (д) N434A/Y436T/Q438R/S440E;
- (е) N434A/Y436T/Q438R/S440D;
- (ж) N434A/Y436T/Q438K/S440E;
- 15 (з) N434A/Y436T/Q438K/S440D;
- (и) N434A/Y436V/Q438R/S440E;
- (к) N434A/Y436V/Q438R/S440D;
- (л) N434A/Y436V/Q438K/S440E;
- (м) N434A/Y436V/Q438K/S440D;
- 20 (н) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440E;
- (о) N434A/R435H/F436T/Q438R/S440D;
- (п) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440E;
- (р) N434A/R435H/F436T/Q438K/S440D;
- (с) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440E;
- 25 (т) N434A/R435H/F436V/Q438R/S440D;
- (у) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440E;
- (ф) N434A/R435H/F436V/Q438K/S440D;
- (х) M428L/N434A/Q438R/S440E;
- (ц) M428L/N434A/Q438R/S440D;
- 30 (ч) M428L/N434A/Q438K/S440E;
- (ш) M428L/N434A/Q438K/S440D;
- (щ) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E;
- (э) M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440D;

(aa) M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440E;
(аб) M428L/N434A/Y436T/Q438K/S440D;
(ав) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440E;
(аг) M428L/N434A/Y436V/Q438R/S440D;
5 (ад) M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440E;
(ае) M428L/N434A/Y436V/Q438K/S440D;
(аж) L235R/G236R/S239K/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E; и
(аз) L235R/G236R/A327G/A330S/P331S/M428L/N434A/Y436T/Q438R/S440E

согласно EU-нумерации.

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен
мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит комбинацию
аминокислотных замен M428L/N434A/Q438R/S440E. В некоторых вариантах
осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG,
предпочтительно Fc-домен человеческого IgG, более предпочтительно Fc-домен
15 человеческого IgG1. В конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-
домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит любую
из следующих комбинаций: (а) первую субъединицу Fc, которая содержит
аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100, и
вторую субъединицу Fc, которая содержит аминокислотную
20 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 111; и (б) первую
субъединицу Fc, которая содержит аминокислотную последовательность,
представленную в SEQ ID NO: 99, и вторую субъединицу Fc, которая содержит
аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 109.

25 Fc-область с пониженной связывающей активностью в отношении Fc-гамма
рецептора

В настоящем описании «пониженная связывающая активность в отношении
Fc-гамма рецептора» означает, например, что с использованием описанного
выше метода анализа установлено, что активность в качестве конкурента
тестируемой антигенсвязывающей молекулы или тестируемого антитела
30 составляет 50% или менее, предпочтительно 45% или менее, 40% или менее,
35% или менее, 30% или менее, 20% или менее, или 15% или менее, и наиболее
предпочтительно 10% или менее, 9% или менее, 8% или менее, 7% или менее,
6% или менее, 5% или менее, 4% или менее, 3% или менее, 2% или менее, или

1% или менее от активности применяемой/применяемого в качестве конкурента контрольной антигенсвязывающей молекулы или контрольного антитела.

Антигенсвязывающие молекулы или антитела, содержащие Fc-домен моноклонального антитела IgG1-, IgG2-, IgG3- или IgG4-изотипа, можно
5 применять соответственно в качестве контрольных антигенсвязывающих молекул или антител. Структуры Fc-домена представлены в SEQ ID NO: 85 (остаток А добавлен к N-концу последовательности, представленной в RefSeq под регистрационным номером AAC82527.1), SEQ ID NO: 86 (остаток А добавлен к N-концу последовательности, представленной в RefSeq под
10 регистрационным номером AAB59393.1), и SEQ ID NO: 87 (остаток А добавлен к N-концу последовательности, представленной в RefSeq под регистрационным номером CAA27268.1), и SEQ ID NO: 88 остаток А добавлен к N-концу последовательности, представленной в RefSeq под регистрационным номером AAB59394.1). Кроме того, когда в качестве тестируемой субстанции применяют
15 антигенсвязывающую молекулу или антитело, содержащую/содержащее мутантный Fc-домен антитела конкретного изотипа, то влияние мутации в мутанте на связывающую активность в отношении Fc-гамма рецептора оценивают с использованием в качестве контроля антигенсвязывающей молекулы или антитела, содержащей/содержащего Fc-домен такого же изотипа.
20 Как описано выше, таким путем получали антигенсвязывающие молекулы или антитела, содержащие мутантный Fc-домен, у которого связывающая активность в отношении Fc-гамма рецептора рассматривалась как пониженная.

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

В частности, предпочтительными являются антигенсвязывающие молекулы или антитела, которые содержат Fc-домен с мутацией (такой как замена) по
30 меньшей мере одной аминокислоты, выбранной из аминокислот в следующих положениях: 220, 226, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 325, 327, 328, 329, 330, 331 или 332 (EU-нумерация), среди аминокислот, формирующих Fc-домен антитела

конкретного изотипа. Изотип антитела, из которого имеет происхождение Fc-домен, не ограничен конкретным изотипом, и можно применять соответствующий Fc-домен, имеющий происхождение из моноклонального антитела IgG1-, IgG2-, IgG3- или IgG4-изотипа. Предпочтительно применять Fc-домены из антител IgG1-изотипа.

Предпочтительными являются антигенсвязывающие молекулы или антитела, которые, например, содержат Fc-домен, имеющий любую одну из замен, представленных ниже, положения которых обозначены согласно EU-нумерации (каждый номер соответствует положению аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и обозначенная однобуквенным символом аминокислота перед номером обозначает аминокислотный остаток до замены, а обозначенная однобуквенным символом аминокислота после номера обозначает аминокислотный остаток после замены) среди аминокислот, формирующих Fc-домен антитела IgG1-изотипа:

- (a) L234F, L235E, P331S;
- (б) C226S, C229S, P238S;
- (в) C226S, C229S; или
- (г) C226S, C229S, E233P, L234V, L235A;

а также антигенсвязывающие молекулы или антитела, которые содержат Fc-домен, имеющий делецию в аминокислотной последовательности в положениях 231-238.

Кроме того, предпочтительными являются также антигенсвязывающие молекулы или антитела, которые содержат Fc-домен, имеющий любую одну из замен, представленных ниже, положения которых обозначены согласно EU-нумерации, среди аминокислот, формирующих Fc-домен антитела IgG2-изотипа:

- (д) H268Q, V309L, A330S и P331S;
- (е) V234A;
- (ж) G237A;
- (з) V234A и G237A;
- (и) A235E и G237A; или
- (к) V234A, A235E и G237A.

Каждый номер соответствует положению аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и обозначенная однобуквенным символом

аминокислота перед номером обозначает аминокислотный остаток до замены, а обозначенная однобуквенным символом аминокислота после номера обозначает аминокислотный остаток после замены.

Кроме того, предпочтительными являются также антигенсвязывающие молекулы или антитела, которые содержат Fc-домен, имеющий любую одну из замен, представленных ниже, положения которых обозначены согласно EU-нумерации, среди аминокислот, формирующих Fc-домен антитела IgG3-изотипа:

(л) F241A;

(м) D265A; или

(н) V264A.

Каждый номер соответствует положению аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и обозначенная однобуквенным символом аминокислота перед номером обозначает аминокислотный остаток до замены, а обозначенная однобуквенным символом аминокислота после номера обозначает аминокислотный остаток после замены.

Кроме того, предпочтительными являются также антигенсвязывающие молекулы или антитела, которые содержат Fc-домен, имеющий любую одну из замен, представленных ниже, положения которых обозначены согласно EU-нумерации, среди аминокислот, формирующих Fc-домен антитела IgG4-изотипа:

(о) L235A, G237A и E318A;

(п) L235E; или

(р) F234A и L235A.

Каждый номер соответствует положению аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и обозначенная однобуквенным символом аминокислота перед номером обозначает аминокислотный остаток до замены, а обозначенная однобуквенным символом аминокислота после номера обозначает аминокислотный остаток после замены.

Другими предпочтительными являются также, например, антигенсвязывающие молекулы или антитела, которые содержат Fc-домен, в котором любая аминокислота в положении 233, 234, 235, 236, 237, 327, 330 или 331 (EU-нумерация) среди аминокислот, формирующих Fc-домен антитела IgG1-изотипа, заменена аминокислотой, которая соответствует положению согласно EU-нумерации в соответствующем IgG2 или IgG4.

Предпочтительными являются также, например, антигенсвязывающие молекулы или антитела, которые содержат Fc-домен, в котором любая одна или несколько аминокислот в положениях 234, 235 и 297 (EU-нумерация) среди аминокислот, формирующих Fc-домен антитела IgG1-изотипа, заменена(ы) на другие аминокислоты. Тип аминокислоты после замены не ограничен конкретным типом; однако антигенсвязывающие молекулы или антитела, содержащие Fc-домен, в котором любая одна или несколько аминокислот в положениях 234, 235 и 297 заменена(ы) на аланин, являются наиболее предпочтительными.

Предпочтительными являются также, например, антигенсвязывающие молекулы или антитела, которые содержат Fc-домен, в котором аминокислота в положении 265 (EU-нумерация) среди аминокислот, формирующих Fc-домен антитела IgG1-изотипа, заменена на другую аминокислоту. Тип аминокислоты после замены не ограничен конкретным типом; однако антигенсвязывающие молекулы или антитела, содержащие Fc-домен, в котором аминокислота в положении 265 заменена на аланин, являются наиболее предпочтительными.

Fc-рецептор

Понятие «Fc-рецептор» или «FcR» относится к рецептору, который связывается с Fc-областью антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения FcR представляет собой нативный человеческий FcR. В некоторых вариантах осуществления изобретения FcR представляет собой рецептор, который связывается с антителом IgG-типа (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов Fc-гамма RI, Fc-гамма RII и Fc-гамма RIII, включая аллельные варианты и полученные в результате альтернативного сплайсинга формы этих рецепторов. Рецепторы Fc-гамма RII включают Fc-гамма RIIA («активирующий рецептор») и Fc-гамма RIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, отличающиеся прежде всего их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор Fc-гамма RIIA содержит в своем цитоплазматическом домене активирующие мотивы на основе тирозина иммунорецептора (ITAM). Ингибирующий рецептор Fc-гамма RIIB содержит в своем цитоплазматическом домене ингибирующий мотив на основе рецептора тирозина иммунорецептора (ITIM) (см., например, Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15, 1997, сс. 203-234). Обзор сведений о FcR

представлен, например, у Ravetch и Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9, 1991, сс. 457-492; Capel и др., Immunomethods 4, 1994, сс. 25-34 и de Haas и др., J. Lab. Clin. Med. 126, 1995, сс. 330-341. Под понятие «FcR», указанное в настоящем описании, подпадают и другие FcR, включая те, которые будут

5 идентифицированы в будущем.

Понятие «Fc-рецептор» или «FcR» включает также неонатальный рецептор, FcRn, который ответствен за перенос материнских IgG эмбриону (Guyer и др., J. Immunol. 117, 1976, с. 587 и Kim и др., J. Immunol. 24, 1994, с. 249) и регулирует гомеостаз иммуноглобулинов. Известны методы измерения связывания с FcRn (см., например, Ghetie и Ward., Immunol. Today 18(12), 1997, сс.592-598; Ghetie и др., Nature Biotechnology 15(7), 1997, сс. 637-640; Hinton и др., J. Biol. Chem. 279(8), 2004, сс. 6213-6216; WO 2004/92219 (Hinton и др.).

Связывание с человеческим FcRn *in vivo* и время полужизни в плазме человеческого FcRn, отличающегося высокой аффинностью связывания с полипептидами, можно оценивать, например, в трансгенных мышах или в трансфектированных человеческих клеточных линиях, экспрессирующих человеческий FcRn, или в приматах, которым вводят полипептиды с вариантом Fc-области. В WO 2000/42072 (на имя Presta) описаны варианты антител с повышенной или пониженной способностью связываться с FcR (см., например, также у Shields и др., J. Biol. Chem. 9(2), 2001, сс. 6591-6604).

Fc-гамма рецептор

Fc-гамма рецептор представляет собой рецептор, обладающий способностью связываться с Fc-доменом моноклональных антител изотипа IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и включают всех членов, принадлежащих к семейству белков, кодируемых в основном генами Fc-гамма рецептора. У человека это семейство включает Fc-гамма RI (CD64), в том числе изоформы Fc-гамма RIa, Fc-гамма RIb и Fc-гамма RIc; Fc-гамма RII (CD32), в том числе изоформы Fc-гамма RIIa (включая аллотипы H131 (тип H) и R131 (тип R)), Fc-гамма IIb (в том числе Fc-гамма RIIb-1 и Fc-гамма RIIb-2), и Fc-гамма RIIC; и Fc-гамма RIII (CD16), в том числе изоформы Fc-гамма RIIIa (включая аллотипы V158 и F158), и Fc-гамма RIIIb (включая аллотипы Fc-гамма RIIIb-NA1 и Fc-гамма RIIIb-NA2), и любые человеческие Fc-гамма R, изоформы Fc-гамма R и их аллотипы, которые пока еще не открыты. Однако Fc-гамма рецептор не ограничен указанными

примерами. Fc-гамма рецептор включает (но не ограничиваясь только им) рецепторы, имеющие происхождение из организма человека, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Fc-гамма рецептор может иметь происхождение из любых организмов. Мышиный Fc-гамма рецептор включает (но не ограничиваясь только им) Fc-гамма RI (CD64), Fc-гамма RII (CD32), Fc-гамма RIII (CD16) и Fc-гамма RIII-2 (CD16-2), а также не открытые пока мышинные Fc-гамма рецепторы, изоформы Fc-гамма рецептора и их аллотипы. Указанные предпочтительные Fc-гамма рецепторы включают, например, человеческие Fc-гамма RI (CD64), Fc-гамма RIIA (CD32), Fc-гамма RIIB (CD32), Fc-гамма RIIA (CD16) и/или Fc-гамма RIIB (CD16). Полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RI представлены в RefSeq под регистрационным номером NM_000566.3 и в RefSeq под регистрационным номером NP_000557.1 соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RIIA представлены в RefSeq под регистрационным номером BC020823.1 и в RefSeq под регистрационным номером AAN20823.1 соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RIIB представлены в RefSeq под регистрационным номером BC146678.1 и в RefSeq под регистрационным номером AAI46679.1 соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RIIA представлены в RefSeq под регистрационным номером BC033678.1 и в RefSeq под регистрационным номером AAN33678.1 соответственно; и полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность Fc-гамма RIIB представлены в RefSeq под регистрационным номером BC128562.1 и в RefSeq под регистрационным номером AAI28563.1 соответственно. Обладает ли Fc-гамма рецептор связывающей активностью в отношении Fc-домена моноклонального антитела изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, можно оценивать с помощью ALPHA-скрининга (на основе гомогенного анализа усиленной за счет эффекта близости люминесценции), метода BIACORE на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и других методов (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс. 4005-4010), в дополнение к описанным выше форматам FACS и ELISA.

При этом, понятие «Fc-лиганд» или «эффекторный лиганд» относится к молекуле и предпочтительно к полипептиду, которая/который связывается с Fc-

доменом антитела, формируя комплекс Fc/Fc-лиганд. Молекула может иметь происхождение из любых организмов. Связывание Fc-лиганда с Fc предпочтительно индуцирует одну или несколько эффекторных функций.

Указанные Fc-лиганды включают (но не ограничиваясь только ими) Fc-

5 рецепторы, Fc-гамма рецептор, Fc-альфа рецептор, Fc-бета рецептор, FcRn, C1q и C3, маннан-связывающий лектин, рецептор маннозы, белок A *Staphylococcus*, белок G *Staphylococcus* и вирусные Fc-гамма рецепторы. Fc-лиганды включают также гомологи Fc-рецептора (FcRH) (Davis и др., Immunological Reviews 190, 2002, сс. 123-136), которые относятся к семейству Fc-рецепторов, гомологичных
10 Fc-гамма рецептору. Fc-лиганды включают также пока не идентифицированные молекулы, которые связываются с Fc.

Связывающая активность в отношении Fc-гамма рецептора

Нарушенную связывающую активность Fc-домена с любым из следующих Fc-гамма рецепторов: Fc-гамма RI, Fc-гамма RIIA, Fc-гамма RIIB, Fc-гамма
15 RPIA и/или Fc-гамма RPIIB можно оценивать с помощью описанных выше форматов FACS и ELISA, а также ALPHA-скрининга (на основе гомогенного анализа усиленной за счет эффекта близости люминесценции) и метода BIACORE на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс. 4005-4010).

20 ALPHA-скрининг осуществляют с применением технологии ALPHA, которая основана на описанном ниже принципе, с использованием двух типов гранул, доноров и акцепторов. Люминесцентный сигнал поддается обнаружению только тогда, когда молекулы, связанные с гранулами-донорами, биологически взаимодействуют с молекулами, связанными с гранулами-акцепторами, и когда
25 обе гранулы находятся в непосредственной близости друг от друга. Возбужденный лазерным пучком фотосенсибилизатор в гранулах-донорах превращает кислород, окружающий гранулу, в возбужденный синглетный кислород. Когда синглетный кислород диффундирует из гранул-доноров и достигает гранул-акцепторов, локализованных в непосредственной близости, то
30 в гранулах индуцируется хемилюминесцентная реакция. Эта реакция в итоге приводит к испусканию света. Если молекулы, связанные с гранулами-донорами, не взаимодействуют с молекулами, связанными с гранулами-акцепторами, то

хемилюминесцентная реакция не происходит, поскольку синглетный кислород, который продуцируется гранулами-донорами, не достигает гранул-акцепторов.

Например, осуществляют иммобилизацию меченой/меченного биотином антигенсвязывающей молекулы или антитела на гранулах-донорах и

5 иммобилизацию Fc-рецептора, меченного глутатион-S-трансферазой (GST), на гранулах-акцепторах. В отсутствие антигенсвязывающей молекулы или антитела, содержащей/содержащего конкурирующий мутантный Fc-домен, Fc-гамма рецептор взаимодействует с антигенсвязывающей молекулой или антителом, содержащей/содержащим Fc-домен дикого типа, индуцируя в

10 результате сигналы с длиной волны 520-620 нм. Антигенсвязывающая молекула или антитело, которая/которое имеет немеченый мутантный Fc-домен, конкурирует с антигенсвязывающей молекулой или антителом, содержащей/содержащим Fc-домен дикого типа, за связывание с Fc-гамма рецептором. Относительную аффинность связывания можно оценивать,

15 определяя количественно снижение флуоресценции в результате конкуренции. Методы биотинилирования антигенсвязывающих молекул или антител, таких как указанные антитела, с помощью сульфо-NHS-биотина или подобных агентов являются хорошо известными. Пригодные методы добавления GST-метки к Fc-гамма рецептору включают методы, в которых используют слияние

20 полипептидов, кодирующих Fc-гамма рецептор и GST в рамке считывания, экспрессию слитого гена с использованием клеток, в которые интродуцирован вектор, несущий ген, и последующую очистку с помощью содержащей глутатион колонки. Индуцированный сигнал предпочтительно можно анализировать, например, посредством подгонки к односайтовой модели

25 конкуренции на основе нелинейного регрессионного анализа с использованием такого программного обеспечения, как GRAPHPAD PRISM (фирма GraphPad; Сан-Диего).

Одну из субстанций, предназначенных для исследования взаимодействия, иммобилизуют в качестве лиганда на тонком слое золота на сенсорном чипе.

30 При освещении светом с задней поверхности сенсорного чипа таким образом, чтобы имело место полное отражение на границе раздела между тонким слоем золота и стеклом, интенсивность отраженного света частично снижается в конкретной области (SPR-сигнал). Другую субстанцию, предназначенную для

исследования взаимодействия, инъецируют в качестве аналита на поверхность сенсорного чипа. Когда лиганд связывается с аналитом, масса иммобилизованной молекулы-лиганда возрастает. Это приводит к изменению показателя преломления растворителя на поверхности сенсорного чипа.

- 5 Изменения показателя преломления приводят к сдвигу положения SPR-сигнала (и наоборот, положение сигнала возвращается в исходное, если происходит диссоциация указанного связывания). С помощью BIACORE®-системы уровень описанного выше сдвига (т.е. изменение массы в зависимости на поверхности чипа) откладывают по вертикальной оси, и таким образом получают изменение массы с течением времени в качестве выходных данных (в виде сенсограммы).
10 Кинетические параметры (константа скорости реакции ассоциации (k_a) и константа скорости реакции диссоциации (k_d)), определяют из представленных в виде кривых сенсограмм, и определяют аффинность (KD) как отношение указанных констант. BIACORE®-метод предпочтительно применяют в качестве
15 метода для анализа ингибирования. Примеры такого метода для анализа ингибирования описаны в Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс. 4005-4010.

Получение и очистка мультиспецифических антител

- Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, указанные в настоящем описании, содержат два типа антигенсвязывающих фрагментов,
20 которые имеют различные связывающие специфичности (например, «первый антигенсвязывающий фрагмент» и «второй антигенсвязывающий фрагмент», оба обладающие способностью связываться с CD3 и CD137, и «третий антигенсвязывающий фрагмент», обладающий способностью связываться с другим антигеном), каждый из которых в конечном итоге слит с одной или
25 другой из двух субъединиц Fc-домена, в результате две субъединицы Fc-домена, как правило, содержатся в двух неидентичных полипептидных цепях.
Рекомбинантная совместная экспрессии этих полипептидов и последующая димеризация приводит к нескольким возможным комбинациям двух полипептидов. Таким образом, для повышения выхода и чистоты
30 мультиспецифических антигенсвязывающих молекул при их рекомбинантном получении, целесообразно интродуцировать в Fc-домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы модификацию, способствующую ассоциации требуемых полипептидов

Таким образом, в конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-домен мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы, указанной в настоящем описании, содержит модификацию, способствующую ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена. Сайт наиболее обширного белок-белкового взаимодействия между двумя субъединицами Fc-домена человеческого IgG находится в СНЗ-домене Fc-домена. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация находится в СНЗ-домене Fc-домена.

В конкретном варианте осуществления изобретения указанная модификация представляет собой так называемую модификацию «knob-into-hole», включающую модификацию, приводящую к образованию «выступа», в одной из двух субъединиц Fc-домена, и модификацию, приводящую к образованию «впадины», в другой одной из двух субъединиц Fc-домена.

Технология «knob-into-holes» (взаимодействие по типу «выступ-во-впадину») описана, например, в US № 5731168; US № 7695936; у Ridgway и др., Prot Eng 9, 1996, сс. 617-621 и Carter, J Immunol Meth 248, 2001, сс.7-15. Как правило, метод включает интродукцию выпуклости («выступ») на границу раздела первого полипептида и соответствующей полости («впадина») в границе раздела второго полипептида, так, чтобы выпуклость могла помещаться в полость, способствуя образованию гетеродимера и препятствуя образованию гомодимера. Выпуклости создают путем замены небольших боковых цепей аминокислот на границе раздела первого полипептида на более крупные боковые цепи (например, тирозин или триптофан). Компенсаторные полости идентичного или сходного размера с выпуклостями создают на границе раздела второго полипептида путем замены больших боковых цепей аминокислот меньшими (например, аланин или треонин).

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретения в СНЗ-домене первой субъединицы Fc-домена мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим больший объем боковой цепи, создавая тем самым выпуклость на СНЗ-домене первой субъединицы, которая может помещаться в полость в СНЗ-домене второй субъединицы, и в СНЗ-домене второй субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток заменяют

аминокислотным остатком, имеющим меньший объем боковой цепи, создавая тем самым полость в СН3-домене второй субъединицы, в которую может помещаться выпуклость на СН3-домене первой субъединицы.

Выпуклость и полость можно создавать путем изменения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, например, с помощью сайтнаправленного мутагенеза или пептидного синтеза.

В конкретном варианте осуществления изобретения в СН3-домене первой субъединицы Fc-домена остаток треонина в положении 366 заменяют на остаток триптофана (T366W), а в СН3-домене второй субъединицы Fc-домена остаток тирозина в положении 407 заменяют на остаток валина (Y407V). В одном из вариантов осуществления изобретения во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток треонина в положении 366 заменяют на остаток серина (T366S) и остаток лейцина в положении 368 заменяют на остаток аланина (L368A).

Еще в одном варианте осуществления изобретения в первой субъединице Fc-домена дополнительно остаток серина в положении 354 заменяют на остаток цистеина (S354C), а во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток тирозина в положении 349 заменяют на остаток цистеина (Y349C). Интродукция указанных двух остатков цистеина приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя субъединицами Fc-домена, дополнительно стабилизируя димер (Carter, J Immunol Methods 248, 2001, сс. 7-15).

В других вариантах осуществления изобретения к мультиспецифическим антигенсвязывающим молекулам, представленным в настоящем описании, можно применять другие методики, способствующие ассоциации Н-цепей и L- и Н-цепей, имеющих требуемые комбинации.

Например, методики подавления нежелательной ассоциации Н-цепей путем интродукции электростатического отталкивания на границу раздела второго константного участка или третьего константного участка Н-цепи антитела (СН2 или СН3) можно применять для ассоциации в мультиспецифическом антителе (WO 2006/106905).

При осуществлении методики подавления нежелательной ассоциации Н-цепей путем интродукции электростатического отталкивания на границу раздела СН2 или СН3 примеры аминокислотных остатков, которые контактируют на

границе раздела другого константного участка Н-цепи, включают области, соответствующие остаткам в положениях 356, 439, 357, 370, 399 и 409 в СНЗ-участке согласно EU-нумерации.

5 Более конкретно, примеры включают антитело, которое содержит два типа СНЗ-участков Н-цепи, в которых одна-три пары аминокислотных остатков в СНЗ-участке первой Н-цепи, выбранных из пар аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (1)-(3), несут один и тот же тип заряда: (1) аминокислотные остатки, содержащиеся в СНЗ-участке Н-цепи в положениях 356 и 439 согласно EU-нумерации; (2) аминокислотные остатки, содержащиеся в
10 СНЗ-участке Н-цепи в положениях 357 и 370 согласно EU-нумерации; и (3) аминокислотные остатки, содержащиеся в СНЗ-участке Н-цепи в положениях 399 и 409 согласно EU-нумерации.

Кроме того, антитело может представлять собой антитело, в котором пары аминокислотных остатков в СНЗ-участке второй Н-цепи, отличном от
15 указанного выше СНЗ-участка первой Н-цепи, выбраны из вышеуказанных пар аминокислотных остатков, указанных в подпунктах (1)-(3), при этом, одна-три пары аминокислотных остатков, которые соответствуют вышеуказанным парам аминокислотных остатков, указанных в подпунктах (1)-(3), несущих один и тот же тип зарядов в указанном выше СНЗ-участке первой Н-цепи, несут заряды,
20 противоположные зарядам соответствующих аминокислотных остатков в указанном выше СНЗ-участке первой Н-цепи.

Каждый из аминокислотных остатков, указанных выше в подпунктах (1)-(3), приближаются друг к другу в процессе ассоциации. Специалисты в данной области могут установить положения, которые соответствуют вышеуказанным
25 аминокислотным остаткам, которые указаны в подпунктах (1)-(3), в требуемом СНЗ-участке Н-цепи или в константной области Н-цепи путем моделирования гомологии и т.п. с использованием поступающего в продажу программного обеспечения, аминокислотные остатки в этих положениях можно соответственно подвергать модификации.

30 В указанных выше антителах «заряженные аминокислотные остатки» предпочтительно выбирают, например, из любой из следующих групп:

- (а) глутаминовая кислота (E) и аспарагиновая кислота (D); и
- (б) лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H).

Касательно указанных выше антител фраза «несут одинаковый заряд» означает, например, что все из двух или большего количества аминокислотных остатков выбраны из аминокислотных остатков, включенных в одну из указанных выше групп (а) и (б). Фраза «несут противоположные заряды»

5 означает, например, что, когда по меньшей мере один из аминокислотных остатков среди двух или большего количества аминокислотных остатков выбран из аминокислотных остатков, включенных в любую из указанных выше групп (а) и (б), то остальные аминокислотные остатки выбраны из аминокислотных остатков, включенных в другую группу.

10 В предпочтительном варианте осуществления изобретения в указанных выше антителах СНЗ-участок первой Н-цепи и СНЗ-участок второй Н-цепи могут быть перекрестно сшиты дисульфидными связями.

В настоящем изобретении аминокислотные остатки, подвергнутые модификации, не ограничены вышеуказанными аминокислотными остатками

15

вариабельных областей антитела или константных областей антитела.

Специалисты в данной области могут идентифицировать аминокислотные остатки, которые образуют границу раздела в мутантных полипептидах или гетеромультимерах путем моделирования гомологии и т.п. с использованием поступающего в продажу программного обеспечения; и аминокислотные остатки

20

в этих положениях можно подвергать модификации с целью регулирования ассоциации.

Кроме того, другие известные методики можно применять также для создания мультиспецифических антител, предлагаемых в настоящем изобретении. Ассоциацию полипептидов, имеющих различные

25

последовательности, можно эффективно индуцировать путем комплементарной ассоциации СНЗ с использованием сконструированного на основе обмена цепей СНЗ-домена, полученного путем замены части одного из СНЗ-участков Н-цепей антитела на соответствующую последовательность, полученную из IgA, и интродукции соответствующей полученной из IgA последовательности в

30

комплементарный участок СНЗ другой Н-цепи (Protein Engineering Design & Selection, 23, 2019, сс. 195-202). Указанную известную методику можно также эффективно применять для создания представляющих интерес мультиспецифических антител.

Кроме того, для создания мультиспецифических антител можно применять методики получения антител с использованием ассоциации CH1 и CL антитела и ассоциации VH и VL антитела, описанные в WO 2011/028952, WO 2014/018572 и в Nat Biotechnol. 32(2), февраль 2014 г., сс. 191-198; методики получения биспецифических антител с использованием в комбинации отдельно полученных моноклональных антител (обмен Fab-плечами), описанные в WO 2008/119353 и WO 2011/131746; методики регуляции ассоциации между CH3-доменами тяжелых цепей антител, описанные в WO 2012/058768 и WO 2013/063702; методики получения биспецифических антител, созданных на основе двух типов легких цепей и одного типа тяжелой цепи, описанные в WO 2012/023053; методики получения мультиспецифических антител с использованием двух линий бактериальных клеток, каждая из которых экспрессирует одну из цепей антитела, содержащего одну H-цепь и одну L-цепь, описанные у Christoph и др., Nature Biotechnology т. 31, 2013, сс. 753-758); и т.п.

Альтернативно этому, даже в том случае, когда не удастся эффективно конструировать представляющее интерес мультиспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, можно получать путем сепарации и очистки представляющего интерес мультиспецифического антитела из полученных антител. Например, ранее описан метод очистки двух типов гомомерных форм и представляющего интерес гетеромерного антитела с помощью ионообменной хроматографии путем придания им различия в изоэлектрических точках посредством интродукции аминокислотных замен в переменные области двух типов H-цепей (WO 2007114325). К настоящему времени в качестве метода очистки гетеромерных антител описаны методы с применением белка А для очистки гетеродимерного антитела, содержащего H-цепь мышинового IgG2a, которая связывается с белком А, и H-цепь крысиного IgG2b, которая не связывается с белком А (WO 98/050431 и WO 95/033844). Кроме того, гетеродимерное антитело само по себе можно эффективно очищать с использованием H-цепей, содержащих замену аминокислотных остатков в положениях согласно EU-нумерации 435 и 436, которые представляют собой сайт связывания IgG-белок А, на Tyr, His или т.п., которые представляют собой аминокислоты, обеспечивающие другую аффинность к белку А, или с использованием H-цепей с различной аффинностью

к белку А для изменения взаимодействия каждой из Н-цепей с белком А, а затем применения колонки с белком А.

Кроме того, Fc-область, которая представляет собой Fc-область с улучшенной С-концевой гетерогенностью, можно применять соответственно в качестве Fc-области, предлагаемой в настоящем изобретении. Более конкретно, в настоящем изобретении предложены Fc-области, полученные путем делеции глицина в положении 446 и лизина в положении 447 согласно EU-нумерации из аминокислотных последовательностей двух полипептидов, образующих Fc-область, имеющую происхождение из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, полученные согласно методу, указанному в настоящем описании, можно очищать с помощью известных в данной области методик, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография, ионообменная хроматография, гель-электрофорез, аффинная хроматография, гель-фильтрация и т.п. Фактические условия, применяемые для очистки конкретного белка, должны зависеть, в том числе, от таких факторов, как чистый заряд, гидрофобность, гидрофильность и др., и должны быть очевидны специалистам в данной области. Для очистки антитела с помощью аффинной хроматографии можно применять лиганд, рецептор или антиген, с которым связывается мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула. Например, для мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, с помощью аффинной хроматографии можно применять матрицу с белком А или белком G. Для выделения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы можно использовать последовательное применение аффинной хроматографии на белке А или G и гель-фильтрации. Чистоту мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы можно определять любым из множества хорошо известных аналитических методов, включая гель-электрофорез, жидкостную хроматографию высокого давления и т.п.

Антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность

Понятие «антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность» или «ADCC» относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), которые присутствуют на некоторых цитотоксических клетках (например, на NK-клетках, нейтрофилах и

макрофагах), обеспечивает способность указанных цитотоксических эффекторных клеток специфически связываться с несущими антиген клетками-мишенями и затем уничтожать клетки-мишени с помощью цитотоксинов.

Первичные клетки, опосредующие ADCC, т.е. NK-клетки, экспрессируют только

5 Fc-гамма RIII, в то время как моноциты экспрессируют Fc-гамма RI, Fc-гамма RII и Fc-гамма RIII. Данные об экспрессии FcR на гематопоэтических клетках обобщены в таблице 3 на с. 464 у Ravetch и Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9, 1991, сс. 457-492. Для оценки ADCC-активности представляющей интерес молекулы можно осуществлять *in vitro* ADCC-анализ, например, описанный в патенте
10 США № 5500362 или 5821337 или в патенте США № 6737056 (на имя Presta). Пригодные для такого анализа эффекторные клетки включают PBMC и NK-клетки. В альтернативном или дополнительном варианте ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, например, на животной модели, например, согласно методу, описанному у Clynes и др., PNAS
15 (USA) 95, 1998, сс. 652-656.

Комплементзависимая цитотоксичность

Понятие «комплементзависимая цитотоксичность» или «CDC» относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Активация классического пути системы комплемента инициируется связыванием первого компонента
20 системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связаны с когнатным для них антигеном. Для оценки активации комплемента можно осуществлять анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro и др., J. Immunol. Methods 202, 1996, с. 163). Полипептидные варианты с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области
25 (полипептиды с вариантом Fc-области) и повышенной или пониженной C1q-связывающей способностью описаны, например, в патенте США № 6194551 B1 и WO 1999/51642 (см. также, например, Idusogie и др., J. Immunol. 164, 2000, сс. 4178-4184).

Зависящая от Т-клетки клеточная цитотоксичность

30 Понятие «зависящая от Т-клетки клеточная цитотоксичность» или «TDCC» относится к форме цитотоксичности, при которой антигенсвязывающая молекула связывается как с антигеном, который экспрессируется на клетке-мишени, так и с другим антигеном, который экспрессируется на Т-клетке, что

приводит к переориентации Т-клетки, приводящей к ее сближению с клеткой-мишенью, в результате индуцируется присущая Т-клетке цитотоксичность в отношении клетки-мишени. Метод оценки зависящей от Т-клетки клеточной цитотоксичности, а именно, *in vitro* TDCC-анализ, указан в настоящем описании в разделе «Измерение зависящей от Т-клетки клеточной цитотоксичности».

Измерение зависящей от Т-клетки клеточной цитотоксичности

В варианте осуществления изобретения, в котором антигенсвязывающая молекула связывается как с DLL3, так и с CD3/CD137, описанные ниже методы предпочтительно используют в качестве метода оценки или выявления зависящей от Т-клетки клеточной цитотоксичности (TDCC), вызываемой контактом антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем описании, с DLL3-экспрессирующими клетками, с которыми связывается антигенсвязывающий центр в антигенсвязывающих молекулах, представленных в настоящем описании. Методы оценки или выявления цитотоксической активности *in vitro* включают методы определения активности цитотоксических Т-клеток или т.п. Обладает ли антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, активностью в отношении индукции опосредуемой Т-клеткой клеточной цитотоксичности, можно определять с помощью известных методов (см., например, Current protocols in Immunology, глава 7. Immunologic studies in humans, под ред. John E. Coligan и др., изд-во John Wiley & Sons, Inc., 1993). При осуществлении анализа цитотоксичности антигенсвязывающую молекулу, которая обладает способностью связываться с антигеном, отличным от DLL3, и который не экспрессируется в клетках, и CD3/CD137, применяют в качестве контрольной антигенсвязывающей молекулы. Контрольную антигенсвязывающую молекулу анализируют аналогичным образом. Затем активность оценивают путем тестирования того, обладает ли антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, более сильной цитотоксической активностью по сравнению с контрольной антигенсвязывающей молекулой.

При этом, противоопухолевую эффективность *in vivo* оценивают или выявляют, например, с помощью следующей процедуры. Клетки, экспрессирующие антиген, с которым связывается антигенсвязывающий центр в антигенсвязывающей молекуле, представленной в настоящем описании,

трансплантируют внутрикожно или подкожно животному кроме человека. Затем в день трансплантации или позднее вводят тестируемую антигенсвязывающую молекулу в вену или брюшную полость каждый день или с интервалом в несколько дней. Измеряют размер опухолей в зависимости от времени. Различие в изменении размера опухолей можно принимать за цитотоксическую 5 активность. Аналогично процедуре, описанной для анализа *in vitro*, вводят контрольную антигенсвязывающую молекулу. Можно считать, что антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, обладает цитотоксической активностью, если размер опухолей меньшей в группе, 10 обработанной антигенсвязывающей молекулой, представленной в настоящем описании, по сравнению с группой, обработанной контрольной антигенсвязывающей молекулой.

МТТ-метод и измерение поглощения меченного изотопом тимидина клетками предпочтительно применяют для оценки и выявления воздействия 15 контакта с антигенсвязывающей молекулой, представленной в настоящем описании, на подавление роста клеток, экспрессирующих антиген, с которым связывается антигенсвязывающий центр в антигенсвязывающей молекуле. При этом, такие же методы, как и методы, описанные выше для оценки или выявления *in vivo* цитотоксической активности, можно предпочтительно 20 применять для оценки или выявления активности в отношении подавления клеточного роста *in vivo*.

TDCC антитела или антигенсвязывающей молекулы, представленного/представленной в описании, можно оценивать с помощью любого приемлемого метода, известного в данной области. Например, TDCC 25 можно измерять с помощью анализа высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH). При осуществлении этого анализа клетки-мишени (например, DLL3-экспрессирующие клетки) инкубируют с Т-клетками (например, РВМС) в присутствии тестируемого/тестируемой антитела или антигенсвязывающей молекулы и активность LDH, которая высвободилась из клеток-мишеней в 30 результате обусловленного Т-клетками цитолиза, измеряют с помощью приемлемого реагента. Как правило, цитотоксическую активность рассчитывают в виде процента активности LDH, возникающей при инкубации с антителом или антигенсвязывающей молекулой, относительно активности LDH в результате

цитоллиза 100% клеток-мишеней (например, лизированных путем обработки Тритоном-X). Если цитотоксическая активность, рассчитанная с помощью описанного выше метода, выше, то считают, что тестируемое/тестируемая антитело или антигенсвязывающая молекула обладает более высокой TDCC.

5 В дополнительном или альтернативном варианте, например, TDCC можно измерять также с помощью анализа ингибирования роста клеток в реальном времени. При осуществлении этого анализа клетки-мишени (например, DLL3-экспрессирующие клетки) инкубируют с Т-клетками (например, PBMC) в присутствии тестируемого антитела или тестируемой антигенсвязывающей молекулы в 96-луночной планшете и осуществляют мониторинг роста клеток-мишеней с помощью методов, известных в данной области, например, используя приемлемый анализатор (например, анализатор клеток в реальном времени (Real-Time Cell Analyzer) xCELLigence). Уровень ингибирования клеточного роста (CGI: %) определяют на основе величины клеточного индекса согласно следующей формуле $CGI (\%) = 100 - (CI_{Ab} \times 100 / CI_{NoAb})$. « CI_{Ab} » обозначает величину клеточного индекса в лунках с антителом или антигенсвязывающей молекулой в конкретный экспериментальный момент времени, а « CI_{NoAb} » обозначает среднюю величину клеточного индекса в лунках без антитела или антигенсвязывающей молекулы. Если CGI-уровень антитела или антигенсвязывающей молекулы является высоким, т.е. представляет собой значительную положительную величину, то можно считать, что антитело или антигенсвязывающая молекула обладает TDCC-активностью.

Согласно одному из объектов изобретения антитело или антигенсвязывающая молекула, представленное/представленная в описании, обладает способностью индуцировать Т-клеточную активацию. Т-клеточную активацию можно оценивать с помощью методов, известных в данной области, например, метода, в котором используют сконструированную линию Т-клеток, экспрессирующую репортерный ген (например, люциферазу), в ответ на их активацию (например, репортерная клеточная линия Jurkat/NFAT-RE (биологический анализ Т-клеточной активации (T Cell Activation Bioassay), фирма Promega)). При осуществлении этого метода клетки-мишени (например, DLL3-экспрессирующие клетки) культивируют с Т-клетками в присутствии тестируемого/тестируемой антитела или антигенсвязывающей молекулы, а затем

уровень активности продукта экспрессии репортерного гена измеряют с помощью соответствующего метода, например, на основе определения показателя Т-клеточной активации. Когда репортерный ген представляет собой ген люциферазы, то можно измерять люминесценцию, возникающую в результате реакции между люциферазой и ее субстратом, в качестве показателя Т-клеточной активации. Если Т-клеточная активация, измеренная с помощью описанного выше метода, является более высокой, то считают, что тестируемое антитело или тестируемая антигенсвязывающая молекула обладает более высокой способностью индуцировать Т-клеточную активацию.

Фармацевтическая композиция

В одном из объектов настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу или антитело, представленную/представленное в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, представленная в описании, индуцирует зависящую от Т-клетки цитотоксичность, иными словами, фармацевтическая композиция, представленная в описании, представляет собой терапевтический агент, предназначенный для индукции клеточной цитотоксичности. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, указанная в описании, представляет собой фармацевтическую композицию, применяемую для лечения и/или предупреждения рака. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, указанная в описании, представляет собой фармацевтическую композицию, применяемую для лечения и/или предупреждения DLL3-позитивных или DLL3-экспрессирующих раков, включая рак легкого (в том числе мелкоклеточный рак легкого) и меланому. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, указанная в описании, представляет собой подавляющий рост клеток агент. В конкретных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, указанная в описании, представляет собой противораковый агент.

Фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, терапевтический агент, предназначенный для индукции клеточной цитотоксичности, подавляющий клеточный рост агент или противораковый

агент, представленные в настоящем описании, можно приготавливать при необходимости с использованием различных типов антигенсвязывающих молекул или антител. Например, цитотоксическую активность в отношении клеток, экспрессирующих антиген, можно повышать с помощью смеси из
5 нескольких антигенсвязывающих молекул или антител, представленных в настоящем описании.

Фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающую молекулу или антитело, представленную/представленное в настоящем описании, приготавливают путем смешения указанной антигенсвязывающей молекулы или
10 указанного антитела, имеющей/имеющего необходимую степень чистоты, с одним или несколькими необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд. под ред. Osol A., 1980) в форме лиофилизированных композиций или водных растворов.

Фармацевтически приемлемые носители, как правило, являются нетоксичными
15 для реципиентов в используемых дозах и концентрациях, и они включают (но не ограничиваясь только ими): буферы, такие как фосфатный, цитратный буферы, а также буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония;
20 хлорид бензетония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и *мета*-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (содержащие менее приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные
25 полимеры, такие как поли(винилпирролидон); аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; содержащие металл
30 комплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). В контексте настоящего описания примеры фармацевтически приемлемых носителей включают также диспергирующие агенты интерстициальных лекарственных

средств, такие как растворимые активные в нейтральной среде гликопротеины гиалуронидаз (sHASEGP), например, человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как rHuPH20 (HYLENEX[®], фирма Baxter International, Inc.). Некоторые примеры sHASEGP и методы их применения, в том числе rHuPH20, описаны в публикациях патентов США №№ 2005/0260186 и 2006/0104968. Согласно одному из объектов изобретения sHASEGP объединяют с одним или несколькими дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

Примеры лиофилизированных композиций антител описаны в патенте США № 6267958. Водные композиции антител включают композиции, описанные в патенте США № 6171586 и WO 2006/044908, последние композиции содержат гистидин-ацетатный буфер.

Препаративная форма, указанная в настоящем описании, может содержать также более одного действующего вещества, если это необходимо для конкретного подлежащего лечению показания, предпочтительно веществ с дополнительными видами активности, которые не оказывают отрицательного воздействия друг на друга. Указанные действующие вещества должны присутствовать в комбинации в количествах, эффективных для достижения поставленной цели.

При необходимости антигенсвязывающие молекулы или антитела, представленные в настоящем описании, можно включать в микрокапсулы (микрокапсулы, полученные из гидроксиметилцеллюлозы, желатина, поли[метилметакрилата] и т.п.), и приготавливать в качестве компонентов коллоидных систем введения лекарственного средства (липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд., под ред. Osol A., 1980). Кроме того, известны методы приготовления средств в виде агентов с замедленным высвобождением, и их можно применять для антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании (J. Biomed. Mater. Res. 15, 1981, сс. 267-277; Chemtech. 12, 1982, сс. 98-105; US № 3773719; заявки на Европейский патент (EP) №№. EP58481 и EP133988; Biopolymers 22, 1983, сс. 547-556).

Фармацевтические композиции, подавляющие клеточный рост агенты или противораковые агенты, представленные в настоящем описании, можно вводить пациентам либо орально, либо парентерально. Предпочтительным является парентеральное введение. В частности, такие методы введения включают инъекцию, назальное введение, транспульмональное введение и чрескожное введение. Инъекции включают, например, внутривенные инъекции, внутримышечные инъекции, внутрибрюшинные инъекции и подкожные инъекции. Например, фармацевтические композиции, терапевтические агенты, предназначенные для индукции клеточной цитотоксичности, подавляющие клеточный рост агенты или противораковые агенты, представленные в настоящем описании, можно применять местно или вводить системно с помощью инъекции. Кроме того, соответствующие методы введения можно выбирать в зависимости от возраста пациента и симптомов. Предназначенную для введения дозу можно выбирать, например, из диапазона от 0,0001 мг до 1000 мг на кг веса тела на каждое введение. Альтернативно этому, дозу можно выбирать, например, из диапазона от 0,001 до 100000 мг/на пациента. Однако доза фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании, не ограничена указанными дозами.

Предпочтительно представленная в настоящем описании фармацевтическая композиция содержит антигенсвязывающую молекулу или антитело, представленную/представленное в настоящем описании. В одном из объектов изобретения композиция представляет собой фармацевтическую композицию, предназначенную для применения для лечения или предупреждения рака. Предпочтительно рак представляет собой рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого) и меланому. Фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, можно применять для лечения или предупреждения рака. В настоящем описании предложен способ лечения или предупреждения рака, в котором пациенту, который нуждается в этом, вводят антигенсвязывающую молекулу или антитело, представленную/представленное в настоящем описании.

В настоящем описании предложены также способы повреждения клеток, экспрессирующих DLL3, или подавления клеточного роста путем приведения в контакт клеток, экспрессирующих DLL3, с антигенсвязывающей молекулой, представленной в настоящем описании, которая связывается с DLL3. Клетки, с

которыми связывается антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, не ограничены конкретно, если они экспрессируют DLL3. В частности, согласно настоящему описанию предпочтительные DLL3-экспрессирующие клетки включают рак легкого (в том числе мелкоклеточный рак легкого) и меланому.

Согласно настоящему описанию «контакт» можно осуществлять, например, добавляя антигенсвязывающую молекулу, представленную в настоящем описании, в культуральные среды клеток, экспрессирующих DLL3, которые культивируют *in vitro*. В этом случае добавляемую антигенсвязывающую молекулу можно использовать в соответствующей форме, такой как раствор или твердый продукт, полученный лиофилизацией, или т.п. Когда антигенсвязывающую молекулу, представленную в настоящем описании, добавляют в виде водного раствора, то раствор может представлять собой чистый водный раствор, содержащий только антигенсвязывающую молекулу, или раствор, содержащий, например, описанные выше поверхностно-активное вещество, эксципиент, краситель, ароматизатор, консервант, стабилизатор, забуферивающий агент, суспендирующий агент, регулирующий изотоничность агент, связующее вещество, разрыхлитель, замасливающее вещество, усилитель текучести и корригент. Добавляемая концентрация не ограничена конкретно; однако конечная концентрация в культуральной среде предпочтительно составляет от 1 пг/мл до 1 г/мл, более предпочтительно от 1 нг/мл до 1 мг/мл и еще более предпочтительно от 1 мкг/мл до 1 мг/мл.

В другом варианте осуществления изобретения согласно настоящему описанию «контакт» можно осуществлять также путем введения животным кроме человека, которым трансплантированы DLL3-экспрессирующие клетки *in vivo*, или животным, которые имеют раковые клетки, эндогенно экспрессирующие DLL3. Метод введения может быть оральным или парентеральным. Предпочтительным является парентеральное введение. В частности, метод парентерального введения включает инъекцию, назальное введение, транспульмональное введение и чрескожное введение. Инъекции включают, например, внутривенные инъекции, внутримышечные инъекции, внутрибрюшинные инъекции и подкожные инъекции. Например, фармацевтические композиции, терапевтические агенты, предназначенные для

индукции клеточной цитотоксичности, подавляющие клеточный рост агенты или противораковые агенты, представленные в настоящем описании, можно применять местно или вводить системно с помощью инъекции. Кроме того, соответствующий метод введения можно выбирать в зависимости от возраста животного и симптомов. Когда антигенсвязывающую молекулу вводят в виде водного раствора, то раствор может представлять собой чистый водный раствор, содержащий только антигенсвязывающую молекулу, или раствор, содержащий, например, описанные выше поверхностно-активное вещество, эксципиент, краситель, ароматизатор, консервант, стабилизатор, забуферивающий агент, суспендирующий агент, регулирующий изотоничность агент, связующее вещество, разрыхлитель, замасливающее вещество, усилитель текучести и корригент. Вводимую дозу можно выбирать, например, из диапазона от 0,0001 до 1000 мг на кг веса тела на каждое введение. Альтернативно этому, дозу можно выбирать, например, из диапазона от 0,001 до 100000 мг на каждого пациента. Однако доза антигенсвязывающей молекулы, представленной в настоящем описании, не ограничена указанными примерами.

В настоящем описании предложены также наборы, предназначенные для применения в способе, представленном в настоящем описании, которые содержат антигенсвязывающую молекулу, представленную в настоящем описании, или антигенсвязывающую молекулу, полученную способом, представленным в настоящем описании. Наборы могут быть упакованы вместе с дополнительным фармацевтически приемлемым носителем или средой или инструкцией по применению, в которой указано, как применять наборы, и т.д.

Другим объектом изобретения является изделие, которое содержит продукты, применяемые для лечения, предупреждения и/или диагностирования указанных выше нарушений. Изделие представляет собой контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковку, которые находятся в контейнере. Приемлемыми контейнерами являются, например банки, пузырьки, шприцы, пакеты для внутривенного (IV) раствора и т.д. Контейнеры можно изготавливать из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностирования состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может

представлять собой пакет для внутривенного раствора или пузырек, снабженный пробкой, которую можно прокалывать с помощью иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет собой антители, предлагаемое в изобретении. На этикетке или
5 листовке-вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения выбранного состояния. Кроме того, изделие может включать (а) первый контейнер с находящейся в нем композицией, которая содержит антители, предлагаемое в изобретении; и (б) второй контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит дополнительный цитотоксический или
10 другой терапевтический агент. Согласно этому варианту осуществления изобретения изделие может содержать также листовку-вкладыш в упаковку, которая содержит информацию о том, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. В альтернативном или дополнительном варианте изделие может дополнительно включать второй (или третий) контейнер
15 с фармацевтически приемлемым буфером, таким как бактериостатическая вода для инъекций (БСВИ), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может включать другие продукты, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, в частности, другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и
20 шприцы.

Листовка-вкладыш в упаковку

Понятие «листовка-вкладыш в упаковку» относится к инструкциям, которые обычно входят в поступающие в продажу упаковки терапевтических продуктов, содержащим информацию о показаниях, применении, дозе, пути
25 введения, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или мерах предосторожности, которые связаны с применением указанных терапевтических продуктов.

Фармацевтическая препаративная форма

Понятие «фармацевтическая препаративная форма» или «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, которая
30 обеспечивает биологическую активность входящего в ее состав действующего вещества, которое должно обладать эффективностью, и которая не содержит

дополнительных компонентов, обладающих неприемлемой токсичностью для индивидуума, которому следует вводить композицию.

Фармацевтически приемлемый носитель

5 «Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтической препаративной форме, отличному от действующего вещества, который является нетоксичным для индивидуума. Фармацевтически приемлемые носители включают (но не ограничиваясь только ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

Лечение

10 В контексте настоящего описания понятие «лечение» (и его грамматические вариации, такие как «лечить» или «процесс лечения») относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики, либо в процессе развития клинической патологии.

15 Требуемыми действиями лечения являются (но не ограничиваясь только ими) предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий болезни, предупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссия или

20 улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающие молекулы или антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, применяют для задержки развития болезни или замедления прогрессирования болезни.

Рак

25 Понятия «рак» и «злокачественное» относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающего, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым ростом/нерегулируемой пролиферацией клеток.

В конкретных вариантах осуществления изобретения рак представляет собой DLL3-экспрессирующий или DLL3-позитивный рак, который включает

30 рак легкого (в том числе мелкоклеточный рак легкого) и меланому.

Опухоль

Понятие «опухоль» относится к росту и пролиферации всех неопластических клеток, как злокачественных, так и доброкачественных, и всех предраковых и раковых клеток и тканей. Понятия «рак», «злокачественный», «пролиферативное нарушение клеток», «пролиферативное нарушение» и «опухоль» не являются взаимоисключающими при ссылке на них в настоящем описании.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения рак представляет собой рак (включая раковые ткани или клетки), экспрессирующий DLL3. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак представляет собой рак легкого, мелкоклеточный рак легкого (SCLC) или меланому.

Другие агенты и варианты лечения

Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно вводить в комбинации с одним или несколькими другими агентами, применяемыми в терапии. Например, мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. Под понятие «терапевтический агент» подпадает любой агент, который вводят индивидууму, который нуждается в таком лечении, для лечения симптома или заболевания. Указанный дополнительный терапевтический агент может включать любые действующие вещества, пригодные для лечения конкретного подлежащего лечению показания, предпочтительно агенты с дополнительными видами активности, которые не оказывают вредного воздействия друг на друга. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой иммуномодулятор, цитостатический агент, ингибитор клеточной адгезии, цитотоксический агент, активатор апоптоза клеток или агент, который повышает чувствительность клеток к индукторам апоптоза. В конкретном варианте осуществления изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой противораковый агент, например, разрушитель микротрубочек, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы, интеркалятор ДНК, алкилирующий агент, гормональную терапию, ингибитор киназы, антагонист рецептора, активатор апоптоза опухолевых клеток или антиангиогенный агент.

Указанные другие агенты могут присутствовать в комбинации в количествах, в которых они эффективны для поставленной цели. Эффективное количество указанных других агентов зависит от количества применяемых мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, типа нарушения или лечения и других указанных выше факторов. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, как правило, применяют в тех же дозах и с использованием путей введения, которые указаны в настоящем описании, или в количестве, составляющем от 1 до 99% от доз, указанных в настоящем описании, или в любой дозе и с помощью любого пути введения, которые эмпирически/клинически рассматриваются как пригодные.

Указанные выше комбинированные терапии включают совместное введение (при котором два или большее количество терапевтических агентов включают в одну и ту же композицию или в разные композиции) и раздельное введение, в случае которого введение мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, можно осуществлять до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента и/или адъюванта. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно применять также в сочетании с лучевой терапией.

Все документы, процитированные в настоящем описании, включены в него в качестве ссылки.

Ниже представлены примеры методов и композиций, применяемых в настоящем описании. Должно быть очевидно, что на практике можно воплощать другие варианты осуществления изобретения с учетом представленного выше подробного описания.

Примеры

Пример 1

Скрининг варианта с созревшей аффинностью родительского Dual-Fab H183L072 для повышения цитотоксичности *in vitro* в отношении опухолевых клеток

1.1 Последовательность вариантов с созревшей аффинностью

Концепция получения вариативной области иммуноглобулина (Fab), которая связывается с CD3 и CD137, но не может связываться с CD3 и CD137

одновременно (Dual-Fab), описана в WO 2019/111871 (включена в настоящее описание в качестве ссылки). Для повышения аффинности связывания родительского Dual-Fab H183L072 (тяжелая цепь: SEQ ID NO: 1; легкая цепь: SEQ ID NO: 57), описанного в WO 2019/111871, создавали более 1000 вариантов Dual-Fab с использованием H183L072 в качестве матрицы для интродукции одной или нескольких мутаций в вариабельную область. Антитела экспрессировали с использованием Expi293 (фирма Invitrogen) и очищали с помощью белка А с последующей гель-фильтрацией, если гель-фильтрация требовалась. Последовательности 22 репрезентативных вариантов Dual-Fab с несколькими мутациями представлены в таблице 6 и таблицах 8-1 - 8-6, а аффинность и кинетику связывания в отношении CD3 и CD137 оценивали при 25°C и/или 37°C, используя устройство Biacore T200 (фирма GE Healthcare) согласно методу, описанному в примере 1.2.2 (таблица 9).

1.2. Информация о кинетике связывания вариантов с созревшей аффинностью

1.2.1 Экспрессия и очистка человеческих CD3 и CD137

Гамма- и эILON-субъединицы комплекса человеческого CD3 (человеческий CD3eg-линкер) связывали с помощью 29-мерного линкера и Flag-метку сливали с С-концом гамма-субъединицы (SEQ ID NO: 102, таблицы 5 и 7). Указанную конструкцию временно экспрессировали, используя клеточную линию FreeStyle293F (фирма Thermo Fisher). Кондиционированную среду, экспрессирующую конструкцию человеческого CD3eg-линкер, концентрировали, используя колонку, упакованную смолами Q HP (фирма GE Healthcare), после чего применяли аффинную хроматографию с FLAG-меткой. Фракции, содержащие конструкцию человеческого CD3eg-линкер, собирали и затем переносили на колонку для гель-фильтрации Супердекс 200 (фирма GE healthcare), уравновешенную 1× D-3ФР. Затем объединяли фракции, содержащие конструкцию человеческого CD3eg-линкер. Внеклеточный домен (ECD) человеческого CD137 (человеческий CD137 ECD) (SEQ ID NO: 103, таблицы 5 и 7) с гексагистидином (His-метка) и пептидом-акцептором биотина (BAP) на его С-конце временно экспрессировали, используя клеточную линию FreeStyle293F (фирма Thermo Fisher). Кондиционированную среду, экспрессирующую ECD человеческого CD137, вносили на колонку HisTrap HP

(фирма GE Healthcare) и элюировали с помощью буфера, содержащего имидазол (фирма Nacalai). Фракции, содержащие ECD человеческого CD137, собирали и затем переносили на колонку для гель-фильтрации Супердекс 200 (фирма GE healthcare), уравновешенную $1 \times D$ -3ФР. Затем фракции, содержащие ECD человеческого CD137, объединяли, и хранили при -80°C .

1.2.2 Измерение аффинности в отношении человеческих CD3 и CD137

Аффинность связывания антител Dual-Fab (Dual-Ig) с человеческим CD3 оценивали при 25°C , используя устройство Biacore 8K (фирма GE Healthcare). Антитело к человеческой Fc (фирма GE Healthcare) иммобилизовывали на всех проточных ячейках сенсорного чипа CM4, используя набор для аминного сочетания (фирма GE Healthcare). Антитела иммобилизовывали на сенсорных поверхностях, содержащих антитело к Fc, затем на проточные ячейки инъецировали рекомбинантный человеческий CD3 или CD137. Все антитела и аналиты приготавливали в буфере ACES, pH 7,4, содержащем 20мМ ACES, 150мМ NaCl, 0,05% Твин 20, 0,005% NaN_3 . После каждого цикла сенсорную поверхность регенерировали с помощью 3М MgCl_2 . Аффинность связывания определяли путем обработки и подгонки данных к модели связывания 1:1, используя программное обеспечение Biacore Insight Evaluation, версия 2.0 (фирма GE Healthcare). Анализ аффинности связывания с CD137 осуществляли в таких же условиях, за исключением того, что температуру анализа устанавливали на 37°C . Данные об аффинности связывания антител Dual-Fab с рекомбинантными человеческими CD3 и CD137 представлены в таблицах 9-1 и 9-2 (обозначение E, используемое для выражения значений K_{on} , K_{off} и KD в таблице, означает « 10 в степени» и, например, $3,54\text{E}+04 = 3,54 \times 10^4$). Как проиллюстрировано в таблицах 9-1 и 9-2, для вариантов Dual-Fab обнаружена различная кинетика связывания с CD3 и CD137 по сравнению с H183/L072.

Таблица 5

Аннотация к SEQ ID NO: в таблице 7 (представленные в таблице 7 SEQ ID NO: человеческих антигенов CD3 и CD137, применяемые для измерений аффинности)

Обозначение антитела	Перечень SEQ
Человеческий CD3eg-линкер	102
ECD человеческого CD137	103

Аннотация к SEQ ID NO: для таблиц с 8-1 по 8-6 (обозначение антитела и SEQ ID NO: переменной области, включая CDR 1, 2 и 3)

DualAE No.	Обозначение антитела	Обозначение VHR	Обозначение VLR	VHR	VHR_CDR1	VHR_CDR2	VHR_CDR3	VLR	VLR_CDR1	VLR_CDR2	VLR_CDR3
Родитель	H183/L072	dBBDu183H	dBBDu072L	1	15	29	43	57	62	67	72
DualAE01	H0868L0581	dBBDu183H0868	dBBDu072L0581	2	16	30	44	58	63	68	73
DualAE08	H1550L0918	dBBDu183H1550	dBBDu072L0918	3	17	31	45	59	64	69	74
DualAE06	H1571L0581	dBBDu183H1571	dBBDu072L0581	4	18	32	46	58	63	68	73
DualAE17	H1610L0581	dBBDu183H1610	dBBDu072L0581	5	19	33	47	58	63	68	73
DualAE10	H1610L0939	dBBDu183H1610	dBBDu072L0939	5	19	33	47	60	65	70	75
DualAE05	H1643L0581	dBBDu183H1643	dBBDu072L0581	6	20	34	48	58	63	68	73
DualAE19	H1647L0581	dBBDu183H1647	dBBDu072L0581	8	22	36	50	58	63	68	73
DualAE20	H1649L0581	dBBDu183H1649	dBBDu072L0581	9	23	37	51	58	63	68	73
DualAE21	H1649L0943	dBBDu183H1649	dBBDu072L0943	9	23	37	51	61	66	71	76
DualAE22	H1651L0581	dBBDu183H1651	dBBDu072L0581	10	24	38	52	58	63	68	73
DualAE23	H1652L0943	dBBDu183H1652	dBBDu072L0943	11	25	39	53	61	66	71	76
DualAE09	H1673L0943	dBBDu183H1673	dBBDu072L0943	12	26	40	54	61	66	71	76
DualAE18	H1673L0581	dBBDu183H1673	dBBDu072L0581	12	26	40	54	58	63	68	73
DualAE14	H2591L0581	dBBDu183H2591	dBBDu072L0581	13	27	41	55	58	63	68	73
DualAE15	H2594L0581	dBBDu183H2594	dBBDu072L0581	14	28	42	56	58	63	68	73
DualAE16	H1644L0939	dBBDu183H1644	dBBDu072L0939	81	82	83	84	60	65	70	75
DualAE02	H0888L0581	dBBDu183H0888	dBBDu072L0581	101	114	127	140	58	63	68	73
DualAE24	H1595L0581	dBBDu183H1595	dBBDu072L0581	104	117	130	143	58	63	68	73
DualAE07	H1573L0581	dBBDu183H1573	dBBDu072L0581	106	119	132	145	58	63	68	73
DualAE25	H1579L0581	dBBDu183H1579	dBBDu072L0581	107	120	133	146	58	63	68	73
DualAE26	H1572L0581	dBBDu183H1572	dBBDu072L0581	110	123	136	149	58	63	68	73
DualAE27	H0883	dBBDu183H0883	dBBDu072L	113	126	139	152	57	62	67	72
	CD3ε	CD3εVH	CD3εVL	77				78			
	CD137	CD137VH	CD137VL	79				80			

Таблица 6

Полноразмерная аминокислотная последовательность
антигена

Обозначение антигена	Перечень SEQ	Аминокислотная последовательность
Человеческий CD3ε-линкер	102	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSG YYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVGSADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDGSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLL TCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGNAKDPGRMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMDYKDDDDK
ECD человеческого CD137	103	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCL GAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLS PGASSVTPPAPAREPGHSPQHSHHHHHGGGGGSLNDIFEAQKIEWHE

Таблица 7

Полноразмерная аминокислотная последовательность варибельной области антитела и представленные далее аминокислотные последовательности CDR 1, 2 и 3 как указано в аннотации

Перечень SEQ	Номер SEQ	Аминокислотная последовательность
dBBDu183H	1	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNAWMHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKGNAYAAYYA PSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTVLPAGVDAWGQGTITVTVSS
dBBDu183H0868	2	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWMHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYAAYYA PSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAGVDAWGQGTITVTVSS
dBBDu183H1550	3	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWMHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYAAYYA PSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHYIHYASASTLLPAGVDAWGQGTITVTVSS
dBBDu183H1571	4	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYATYYAP SVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAGVDAWGQGTITVTVSS
dBBDu183H1610	5	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWMHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKWNAYAAYYA PSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHYIHYASASTLLPAEGIDAWGQGTITVTVSS
dBBDu183H1643	6	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAYYAP SVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTITVTVSS
dBBDu183H1647	8	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNTWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNDYAAYYAP SVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTITVTVSS
dBBDu183H1649	9	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYADYYAP SVKERFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTITVTVSS
dBBDu183H1651	10	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYADYYAP SVEGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTITVTVSS
dBBDu183H1652	11	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYADYYAP SVEGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTITVTVSS
dBBDu183H1673	12	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKWNAYADYYA PSVKERFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHYIHYASASTLLPAEGIDAWGQGTITVTVSS

Таблица 8-1

Продолжение таблицы 8-1

Перечень SEQ	Номер SEO	Аминокислотная последовательность
dBBDu183H2591	13	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHP SVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHYVHYAAASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSS
dBBDu183H2594	14	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHP SVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCHYVHYAAASQLLPAEGVDAWGQGTTVTVSS
dBBDu183H_VHR_CDR1	15	NAWMH
dBBDu183H0868_VHR_CDR1	16	NVWMH
dBBDu183H1550_VHR_CDR1	17	NVWMH
dBBDu183H1571_VHR_CDR1	18	NVWFH
dBBDu183H1610_VHR_CDR1	19	NVWMH
dBBDu183H1643_VHR_CDR1	20	NVWFH
dBBDu183H1647_VHR_CDR1	22	NTWFH
dBBDu183H1649_VHR_CDR1	23	NVWFH
dBBDu183H1651_VHR_CDR1	24	NVWFH
dBBDu183H1652_VHR_CDR1	25	NVWFH
dBBDu183H1673_VHR_CDR1	26	NVWFH
dBBDu183H2591_VHR_CDR1	27	NVWFH
dBBDu183H2594_VHR_CDR1	28	NVWFH
dBBDu183H_VHR_CDR2	29	QIKDKGNAYAAAYAPSVKG
dBBDu183H0868_VHR_CDR2	30	QIKDKYNAYAAAYAPSVKG
dBBDu183H1550_VHR_CDR2	31	QIKDKYNAYAAAYAPSVKG
dBBDu183H1571_VHR_CDR2	32	QIKDKYNAYATYYAPSVKG

Таблица 8-2

Продолжение таблицы 8-2

Перечень SEQ	Номер SEQ	Аминокислотная последовательность
dBBDu183H1610_VHR_CDR2	33	QIKDKWNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1643_VHR_CDR2	34	QIKDYYNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1647_VHR_CDR2	36	QIKDYYNDAAYYAPSVKG
dBBDu183H1649_VHR_CDR2	37	QIKDKYNAYADYYAPSVKE
dBBDu183H1651_VHR_CDR2	38	QIKDKYNAYADYYAPSVGE
dBBDu183H1652_VHR_CDR2	39	QIKDYYNAYADYYAPSVGE
dBBDu183H1673_VHR_CDR2	40	QIKDKWNAYADYYAPSVKE
dBBDu183H2591_VHR_CDR2	41	QIKDYYNAYAGYYHPSVKG
dBBDu183H2594_VHR_CDR2	42	QIKDYYNAYAGYYHPSVKG
dBBDu183H_VHR_CDR3	43	VHYASASTVLPAGVDA
dBBDu183H0868_VHR_CDR3	44	VHYASASTLLPAGVDA
dBBDu183H1550_VHR_CDR3	45	IHYASASTLLPAGVDA
dBBDu183H1571_VHR_CDR3	46	VHYASASTLLPAGVDA
dBBDu183H1610_VHR_CDR3	47	IHYASASTLLPAEGIDA
dBBDu183H1643_VHR_CDR3	48	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1647_VHR_CDR3	50	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1649_VHR_CDR3	51	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1651_VHR_CDR3	52	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1652_VHR_CDR3	53	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1673_VHR_CDR3	54	IHYASASTLLPAEGIDA
dBBDu183H2591_VHR_CDR3	55	VHYAAASTLLPAEGVDA
dBBDu183H2594_VHR_CDR3	56	VHYAAASQLLPAEGVDA

Таблица 8-3

Продолжение таблицы 8-3

Перечень SEQ	Номер SEQ	Аминокислотная последовательность
dBBDu072L	57	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCCASQELVHMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFGVDP RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQGTSPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0581	58	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCCPSQEVVHMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFGVDP RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQGTSHPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0918	59	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCCPSQEVVHMNNVYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFGVDP RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQGTSHPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0939	60	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCCPSQEVVHMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNVFGVDP RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQGTTHPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0943	61	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCCPSEEVVHMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNLFGVDP RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQGTTHPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L_VLR_CDR1	62	QASQELVHMNRNTYLH
dBBDu072L0581_VLR_CDR1	63	QPSQEVVHMNRNTYLH
dBBDu072L0918_VLR_CDR1	64	QPSQEVVHMNNVYLH
dBBDu072L0939_VLR_CDR1	65	QPSQEVVHMNRNTYLH
dBBDu072L0943_VLR_CDR1	66	QPSEEVVHMNRNTYLH
dBBDu072L_VLR_CDR2	67	KVSNRFP
dBBDu072L0581_VLR_CDR2	68	KVSNRFP
dBBDu072L0918_VLR_CDR2	69	KVSNRFP
dBBDu072L0939_VLR_CDR2	70	KVSNVFP
dBBDu072L0943_VLR_CDR2	71	KVSNLFP
dBBDu072L_VLR_CDR3	72	AQGTSPFT
dBBDu072L0581_VLR_CDR3	73	AQGTSHPFT
dBBDu072L0918_VLR_CDR3	74	AQGTSHPFT
dBBDu072L0939_VLR_CDR3	75	AQGTTHPFT
dBBDu072L0943_VLR_CDR3	76	AQGTTHPFT

Таблица 8-4

Продолжение таблицы 8-4

Перечень SEQ	Номер SEO	Аминокислотная последовательность
CD3εVH	77	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMHWRQAPGKGLEWVAQIKDKSQNYATYV AESVKGRFTISRADSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCRYVHYAAGYGVDIWGQGTTTVTVSS
CD3εVL	78	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQPLVHSNRNTYLVHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFSGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQVPYTFGGGTKLEIK
CD137VH	79	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESR VTISVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARDYGPNGYDWYFDLWGRGTLTVTVSS
CD137VL	80	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKEIK
dBBDu183H1644	81	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYAP SVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTTVTVSS
dBBDu183H1644_VHR_CDR1	82	NVWFH
dBBDu183H1644_VHR_CDR2	83	QIKDYNNAYAAAYAPSVKG
dBBDu183H1644_VHR_CDR3	84	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H0888	101	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWMHWRQAPGKGLEWVAQIKDKWNAYAAAYA PSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYIHYASASTLLPAFGIDAWGQGTTTVTVSS
dBBDu183H1595	104	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNTWMHWRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYAAAYA PSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYIHYASASTLLPAFGVDAWGQGTTTVTVSS
dBBDu183H1573	106	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYAP SVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAFGVDAWGQGTTTVTVSS
dBBDu183H1579	107	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYAAAYAP SVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAFGVDAWGQGTTTVTVSS
dBBDu183H1572	110	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDKYNAYAAAYAP SVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTTVTVSS
dBBDu183H0883	113	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNAWMHWRQAPGKGLEWVAQIKDKGNAYAAAYA PSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCRYVHYASASTLLPAFGVDAWGQGTTTVTVSS

Таблица 8-5

Продолжение таблицы 8-5

Перечень SEQ	Номер SEQ	Аминокислотная последовательность
dBBDu183H0888_VHR_CDR1	114	NVWMH
dBBDu183H1595_VHR_CDR1	117	NTWMH
dBBDu183H1573_VHR_CDR1	119	NVWFH
dBBDu183H1579_VHR_CDR1	120	HVWFH
dBBDu183H1572_VHR_CDR1	123	NVWFH
dBBDu183H0883_VHR_CDR1	126	NAWMH
dBBDu183H0888_VHR_CDR2	127	QIKDKWNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1595_VHR_CDR2	130	QIKDKYNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1573_VHR_CDR2	132	QIKDYNNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1579_VHR_CDR2	133	QIKDKYNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1572_VHR_CDR2	136	QIKDKYNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H0883_VHR_CDR2	139	QIKDKGNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H0888_VHR_CDR3	140	IHYASASTLLPAFGIDA
dBBDu183H1595_VHR_CDR3	143	IHYASASTLLPAFGVDA
dBBDu183H1573_VHR_CDR3	145	VHYASASTLLPAFGVDA
dBBDu183H1579_VHR_CDR3	146	VHYASASTLLPAFGVDA
dBBDu183H1572_VHR_CDR3	149	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H0883_VHR_CDR3	152	VHYASASTLLPAFGVDA

Таблица 8-6

Кинетические характеристики связывания Dual-вариантов с человеческим CD3 и человеческим CD137

Обозначение антитела	CD3 (25°C)			CD137 (37°C)		
	ka (M ⁻¹ c ⁻¹)	kd (c ⁻¹)	KD (M)	ka (M ⁻¹ c ⁻¹)	kd (c ⁻¹)	KD (M)
H183L072	3.54E+04	1.20E-02	3.40E-07	3.47E+03	1.96E-02	5.66E-06
H0868L0581	1.23E+05	1.94E-02	1.57E-07	1.22E+04	1.36E-03	1.11E-07
H1550L0918	7.20E+04	3.16E-03	4.38E-08	1.09E+04	5.79E-03	5.30E-07
H1571L0581	1.42E+05	1.56E-02	1.10E-07	1.21E+04	1.05E-03	8.68E-08
H1610L0581	6.80E+04	1.42E-03	2.09E-08	1.07E+04	1.10E-03	1.03E-07
H1610L0939	5.00E+04	2.53E-03	5.07E-08	1.30E+04	8.01E-04	6.18E-08
H1643L0581	9.46E+04	2.51E-02	2.65E-07	1.23E+04	6.06E-04	4.94E-08
H1644L0939	5.58E+04	8.08E-02	1.45E-06	1.21E+04	4.44E-04	3.68E-08
H1647L0581	4.43E+04	1.01E-01	2.28E-06	9.98E+03	6.47E-04	6.48E-08
H1649L0581	7.50E+04	3.36E-02	4.49E-07	1.29E+04	5.53E-04	4.28E-08
H1649L0943	6.10E+04	4.81E-02	7.89E-07	1.43E+04	4.68E-04	3.28E-08
H1651L0581	7.18E+04	3.71E-02	5.17E-07	1.40E+04	6.03E-04	4.32E-08
H1652L0943	6.23E+04	6.36E-02	1.02E-06	1.29E+04	4.70E-04	3.64E-08
H1673L0581	7.96E+04	1.06E-03	1.33E-08	1.19E+04	9.60E-04	8.04E-08
H1673L0943	5.50E+04	1.16E-03	2.10E-08	1.22E+04	7.22E-04	5.91E-08
H2591L0581	1.02E+05	5.35E-02	5.25E-07	2.04E+04	7.42E-04	3.63E-08
H2594L0581	9.83E+04	5.84E-02	5.93E-07	2.09E+04	1.63E-03	7.81E-08

Таблица 9-1

Кинетические характеристики связывания Dual-вариантов с человеческим CD3 и человеческим CD137

Обозначение антитела	CD3 (25°C)			CD137 (37°C)		
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (M)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (M)
H0888L0581	9.50E+04	1.92E-03	2.02E-08	1.50E+04	3.11E-03	2.08E-07
H1595L0581	1.16E+05	6.58E-03	5.70E-08	1.38E+04	2.69E-03	1.95E-07
H1573L0581	1.21E+05	1.88E-02	1.56E-07	1.46E+04	1.03E-03	7.06E-08
H1579L0581	1.24E+05	3.40E-02	2.73E-07	1.48E+04	4.06E-03	2.75E-07
H1572L0581	9.77E+04	2.80E-02	2.86E-07	1.39E+04	7.22E-04	5.21E-08
H0883	9.07E+04	9.99E-03	1.10E-07	<i>n.d.</i>		

Таблица 9-2

Пример 2

Последовательности биспецифических и триспецифических антител и их получение

2.1. Конструирование и получение би- или триспецифических Ат формата (1+1)

Для оценки эффективности вариантов Dual-Ig (DualAE05 и др.), полученных в примере 1, создавали биспецифические и триспецифические антитела, одно плечо которых распознает опухолевый антиген DLL3 (из антитела к DLL3 D30841AE13), а другое плечо распознает эффекторные клетки, главным образом Т-клетки. Антитела DLL3/CD3 эпислон (1+1) и DLL3/DualAE05 (1+1) создавали, используя метод обмена Fab-плечей (FAE), описанный в Proc Natl Acad Sci U S A. 110(13), 26 марта 2013 г., сс. 5145-5150. Формат (1+1) представлен на фиг. 1(б). Антиген-мишень каждой Fv-области и правило обозначения каждого связывающего домена в би- и триспецифических антителах формата (1+1) представлены в таблице 10-2, а SEQ ID NO: представлены в таблице 12.

2.2. Конструирование и получение трехвалентного Ат формата (1+2), содержащего одно одновалентное DLL3-связывающее плечо и два Dual-Fab

Экспрессия антигена-мишени в солидных опухолях, вероятно, отличается высокой гетерогенностью, и области опухолей с низким уровнем экспрессии антигена могут не обеспечивать достаточное перекрестное сшивание CD3 или CD137. В частности, кластеризация рецепторов CD137 имеет решающее значение для эффективной агонистической активности (Trends Biochem Sci. 27(1), январь 2002 г., сс. 19-26). Для повышения цитотоксичности, опосредованной связыванием и активацией CD3, создавали трехвалентное триспецифическое антитело нового формата, т.е. DLL3-DUAL/LINC, 1+2) для увеличения количества доменов, связывающихся с молекулами CD137. В частности, антитело нового формата представляет собой трехвалентное триспецифическое антитело формата «1+2», которое содержит два одновалентных Dual-Fab, каждый из которых может связываться с одним CD3 или CD137, но не одновременно (FvB и FvC на фиг. 1а), и одно одновалентное DLL3-связывающее плечо (FvA на фиг. 1а), в которое одна дисульфидная связь («LINC») интродуцирована/сконструирована между двумя Dual-Fab путем интродукции

замены на цистеин, например, в положении 191 (S191C согласно нумерации Кэбота) CH1-домена каждого из двух Dual-Fab (фиг. 1(a) и таблица 10-1). Не вдаваясь в конкретную теорию, при создании изобретения высказано предположение о том, что такая сконструированная дисульфидная связь («LINC») может ограничить ориентацию связывания двух Dual-Fab с антигеном (CD3 или CD137) до *cis*-связывания с антигеном (т.е. связывания с двумя антигенами в одной и той же клетке) в результате стерического препятствия или более короткого расстояния между двумя Dual-Fab, тем самым улучшая профиль безопасности триспецифического Ат путем предотвращения нежелательного перекрестного сшивания двух CD3/CD137-экспрессирующих иммунных клеток, опосредованного двумя Dual-Fab, независимым от DLL3 образом. В частности, получали варианты антитела DLL3-Dual/Dual (DLL3-Dual/LINC, 1+2), имеющие одновалентную специфичность, связывающуюся с опухолевым антигеном DLL3, двухвалентную специфичность, связывающуюся с CD3, и двухвалентную специфичность, связывающуюся с CD137, присущие двум Dual-Fab (фиг. 1(a) и таблица 10-1). Использовали также технологию CrossMab (WO 2017/055539). Применяли Fc-область, которая была молчащей касательно Fc-гамма R и дегликозилированной. Антиген-мишень каждой Fv-области и правило обозначения каждого связывающего домена в триспецифических антителах представлены в таблице 10-1, а SEQ ID NO: представлены в таблицах 11-1 и 12. В качестве отрицательного контроля использовали антитело Ctrl (VHR IC17HdK и VLR IC17L), которое не связывается DLL3, вместо одновалентного DLL3-связывающего плеча (таблица 12). Все антитела экспрессировали в трехвалентной форме путем кратковременной экспрессии в клетках Expi293 (фирма Invitrogen) и очищали согласно методу, описанному в примере 1.1. Для повышения чистоты антитела дополнительно очищали, пропуская через аффинную колонку, которая специфически связывается с форматом UnLINC (т.е. с трехвалентным антителом формата 1+2 без сконструированной дисульфидной связи), но не связывается с LINC-форматом (т.е. трехвалентным антителом формата 1+2 со сконструированной дисульфидной связью)

2.3. Создание биспецифического Ат (BiTE)

Для сравнения эффективности трехвалентного Ат (DLL3-DUAL/LINC, 2+1) и других антител DLL3/CD3 биспецифического формата создавали антитело с

удлиненным временем полужизни BiTE-формата, обозначенное как DLL3CD3BiTE. DLL3CD3BiTE состояло из двух одноцепочечных переменных фрагментов (ScFv), один из которых направлен против ассоциированного с опухолью антигена DLL3, и он слит с одним фрагментом, направленным против CD3 (Fig. 1(в)). Антиген-мишень каждой Fv-области в BiTE-формате биспецифического антитела представлен в таблице 10-3, а SEQ ID NO: представлены в таблице 11-2 и таблице 14.

Название антитела, таргетирующее плечо и информация о Fc

Трехвалентное Ат (1+2 LINC) Обозначение антитела	Формат	Fv A	Линкер	Fv B	Fv C	FC	Fc (выступ)	Fc (впадина)
DLL3-DualAE05/ DualAE05-FF091	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Длинный	DualAE05	DualAE05	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1321kV11Fc	SG1321hV11Fc
Ctrl-DualAE05/ DualAE05-FF091	(1+2) Dual/LINC	Ctrl	Длинный	DualAE05	DualAE05	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1321kV11Fc	SG1321hV11Fc
DLL3-DualAE05/ DualAE05-FF102	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Длинный	DualAE05	DualAE05	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE05/ DualAE05-FF110	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Средний	DualAE05	DualAE05	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE05/ DualAE05-FF111	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Короткий	DualAE05	DualAE05	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE05/ DualAE05-FF056	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Длинный	DualAE05	DualAE05	L235R,S239K,N297A	SG1176kV11Fc	SG1176hV11Fc
DLL3-DualAE15/ DualAE15-FF119	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Длинный	DualAE15	DualAE15	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1321kV11Fc	SG1321hV11Fc
Ctrl-DualAE15/ DualAE15-FF119	(1+2) Dual/LINC	Ctrl	Длинный	DualAE15	DualAE15	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1321kV11Fc	SG1321hV11Fc
DLL3-DualAE15/ DualAE15-FF120	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Длинный	DualAE15	DualAE15	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE15/ DualAE15-FF121	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Средний	DualAE15	DualAE15	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE15/ DualAE15-FF122	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Короткий	DualAE15	DualAE15	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE15/ DualAE15-FF123	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Длинный	DualAE15	DualAE15	L235R,S239K,N297A	SG1176kV11Fc	SG1176hV11Fc
DLL3-DualAE16/ DualAE16-FF124	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Длинный	DualAE16	DualAE16	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1321kV11Fc	SG1321hV11Fc
Ctrl-DualAE16/ DualAE16-FF124	(1+2) Dual/LINC	Ctrl	Длинный	DualAE16	DualAE16	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1321kV11Fc	SG1321hV11Fc
DLL3-DualAE16/ DualAE16-FF125	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Длинный	DualAE16	DualAE16	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE16/ DualAE16-FF126	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Средний	DualAE16	DualAE16	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE16/ DualAE16-FF127	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Короткий	DualAE16	DualAE16	LALA, N297A, Act5 (M428L,N434A,Q438R,S440E)	SG1372kV11Fc	SG1372hV11Fc
DLL3-DualAE16/ DualAE16-FF128	(1+2) Dual/LINC	Анти- DLL3	Длинный	DualAE16	DualAE16	L235R,S239K,N297A	SG1176kV11Fc	SG1176hV11Fc

Таблица 10-1

Таблица 10-2

Би- и триспецифические Ат (1+1)

Обозначение антитела	Fv A	Fv B
DLL3/CD3ε	DLL3	CD3ε
DLL3/DualAE05	DLL3	DualAE05

5

Таблица 10-3

Биспецифическое Ат (BiTE)

Обозначение антитела	Fv A	Fv B
DLL3CD3BiTE	Анти-DLL3	Анти-CD3

Таблица 11-1

Номер цепи антитела и SEQ ID

Обозначение варианта	Линкер	Цепь 1	Цепь 2	Цепь 3	Цепь 4 или цепь 5
DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091	249	201	206	208	214
Ctrl-DualAE05/DualAE05-FF091	249	202	207	208	214
DLL3-DualAE05/DualAE05-FF102	249	203	206	209	214
DLL3-DualAE05/DualAE05-FF110	248	204	206	209	214
DLL3-DualAE05/DualAE05-FF111	259	205	206	209	214
DLL3-DualAE05/DualAE05-FF056	249	216	206	229	214
DLL3-DualAE15/DualAE15-FF119	249	217	206	210	214
Ctrl-DualAE15/DualAE15-FF119	249	218	207	210	214
DLL3-DualAE15/DualAE15-FF120	249	219	206	211	214
DLL3-DualAE15/DualAE15-FF121	248	220	206	211	214
DLL3-DualAE15/DualAE15-FF122	259	221	206	211	214
DLL3-DualAE15/DualAE15-FF123	249	222	206	230	214
DLL3-DualAE16/DualAE16-FF124	249	223	206	212	215
Ctrl-DualAE16/DualAE16-FF124	249	224	207	212	215
DLL3-DualAE16/DualAE16-FF125	249	225	206	213	215
DLL3-DualAE16/DualAE16-FF126	248	226	206	213	215
DLL3-DualAE16/DualAE16-FF127	259	227	206	213	215
DLL3-DualAE16/DualAE16-FF128	249	228	206	231	215

5

Таблица 11-2

Номер цепи антитела и SEQ ID

Обозначение антитела	Цепь 1
DLL3CD3BiTE	250

SEQ ID переменных областей и их CDR 1-3

Обозначение VR	Обозначение VHR	Обозначение VLR	VHR	VHR_ CDR1	VHR_ CDR2	VHR_ CDR3	VLR	VLR_ CDR1	VLR_ CDR2	VLR_ CDR3
DLL3 (D30841AE13)	D08410053H0118	D084101L0000	232	233	234	235	236	237	238	239
DualAE05	dBBDu183H1643	dBBDu072L0581	6	20	34	48	58	63	68	73
DualAE15	dBBDu183H2594	dBBDu072L0581	14	28	42	56	58	63	68	73
DualAE16	dBBDu183H1644	dBBDu072L0939	81	82	83	84	60	65	70	75
CD3ε	CD3εVH	CD3εVL	251	252	253	254	255	256	257	258
Ctrl	IC17HdK	IC17L	240	241	242	243	244	245	246	247

Таблица 12

Таблица 13

SEQ ID NO: Fc-областей, указанных в таблице 14

Обозначение Fc	SEQ ID NO:
SG1321kV11Fc	99
SG1372kV11Fc	100
SG1176kV11Fc	108
SG1321hV11Fc	109
SG1372hV11Fc	111
SG1176hV11Fc	112

Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
	201	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVKSCGGGSGGGGSSQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSCSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
	202	DIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLTSLQTEDVATYYC QQYWSTPYTFGGGKLEVKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVKSCGGGSGGGGSSQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHW VRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSCSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
	203	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVKSCGGGSGGGGSSQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSCSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP

Таблица 14-1

Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
	204	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCQSTESVYGSWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYYSGYIYAFGGGKTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVKSCGGGGSQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWRQA PGKGLEWVAQIKDYNNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSCSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
	205	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCQSTESVYGSWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYYSGYIYAFGGGKTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVKSCQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWRQAPGKGL EWVAQIKDYNNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
	206	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSSSYDMGWVRQAPGQGLEWMGTIYTDYSTDYASWAKGRVTISVDRSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARHTGYGYFLWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
	207	QVQLQQSGPQLVRPGASVKISCKASGYSTSYWMHWVNQRPGQGLEWIGMIDPSYSETRLNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQL SSPTSEDSAVYYCALYGNFYDYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
	208	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLM MNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP

Таблица 14-2

Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
	209	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGKFNSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQ MNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
	210	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGKFNSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQ MNSLKTEDTAVYYCHYVHYAAASQLLPAEGVDAWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
	211	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGKFNSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQ MNSLKTEDTAVYYCHYVHYAAASQLLPAEGVDAWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
	212	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQ MNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
	213	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQ MNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSP

Таблица 14-3

Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
	214	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCCQPSQEVVHMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFPGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQGTSHPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	215	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCCQPSQEVVHMNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNVFPGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQGTTHPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	216	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQGYYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYINAYAAAYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELRGGPKVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGN
	217	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQGYYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYINAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYAAASQLLPAEGVDAWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGN
	218	DIQMTQSSSSFSVSLGDRVITICKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLISLTQTEDVATYYCQYWPSTPYTFGGGKLEVKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGRLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPGKGLEWVAQIKDYINAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYAAASQLLPAEGVDAWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGN

Таблица 14-4

Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
	219	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGSGGGGSGVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYAAASQLLPAEGVDAW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSCSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSLHEALHAHYTRKELSLSP
	220	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGSGVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYAAASQLLPAEGVDAW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSCSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSLHEALHAHYTRKELSLSP
	221	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCQSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVKPKSCQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYAAASQLLPAEGVDAW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSCSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSLHEALHAHYTRKELSLSP

Таблица 14-5

Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
	222	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVKSCGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYAAASQLLPAEGVDAW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSCSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELRGGPKVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSP
	223	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVKSCGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSCSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP
	224	DIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLTSLQTEDVATYYC QQYWSTPYTFGGGKLEVKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVKSCGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHW VRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQ GTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSCSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLSLSP

Таблица 14-6

Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
	225	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSCSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
	226	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFH PGKGLEWVAQIKDYNNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSCSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSVLHEALHAHYTRKELSLSP
	227	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQSTESVYGSWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYYSGYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVEPKSCQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFH EWVAQIKDYNNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSCSLGTQTYICNVNHK SNTKVDEKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFCSVLHEALHAHYTRKELSLSP

Таблица 14-7

Обозначение послед-ти	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
	228	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCQSTESVYGSWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATY YCQGYYSYIYAFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVKSCGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGTFVFSNVWFH WVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLMNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSCSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELRGGPKVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHLEAHNHYTQKSLSLSP
	229	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLM MNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELRGGPKVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHLEAHNHYTQKSLSLSP
	230	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYLM MNSLKTEDTAVYYCHYVHYAAASQLLPAEGVDAWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELRGGPKVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHLEAHNHYTQKSLSLSP
	231	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGTFVFSNVWFHWWVRQAPGKGLEWVAQIKDYNNAYAAAYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLM MNSLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELRGGPKVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHLEAHNHYTQKSLSLSP

Таблица 14-8

Обозначение последовательности	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
D08410053H0118	232	QVTLRSGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSSSYDMGWVRQAPGQGLEWMGTIYTDYSTDYASWAKGRVTI SVDRSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHTGYGYFGLWGQGLTVVSS
D08410053H0118 VHR CDR1	233	SSYDMG
D08410053H0118 VHR CDR2	234	TIYTDYSTDYASWAKG
D08410053H0118 VHR CDR3	235	HTGYGYFGL
D084101L0000	236	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSTESVYGSDWLSWYQQKPGQPPKLLIYQASNLEIGVPSRFSGSGSGTDFT LTINSLEAEDAATYYCQGYSGYIYAFGGGTKVEIK
D084101L0000 VLR CDR1	237	QSTESVYGSDWLS
D084101L0000 VLR CDR2	238	QASNLEI
D084101L0000 VLR CDR3	239	QGYSGYIYA
IC17HdK	240	QVQLQQSGPQLVRPGASVKISCKASGYSFTSYWMHWVNQRPGQGLEWIGMIDPSYSETRLNQKFKDKATL TVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCALYGNFYDYWGQGTTTLTVSS
IC17HdK VHR CDR1	241	SYWMH
IC17HdK VHR CDR2	242	MIDPSYSETRLNQKFKD
IC17HdK VHR CDR3	243	YGNFYDY
IC17L	244	DIQMTQSSSFVSLGDRVTITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLIS TSLQTEDVATYYCQQYWSTPYTFGGGTKLEVK
IC17L VLR CDR1	245	KASEDIYNRLA
IC17L VLR CDR2	246	GATSLET
IC17L VLR CDR3	247	QQYWSTPYT
	248	VEPKSCGGGGGS
	249	VEPKSCGGGGSGGGGS

Таблица 14-9

Обозначение последовательности	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
DLL3CD3BiTE		QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYVYYSGTTNYPNPSLKSRTISVDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCASIATGIFYFDYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSP GERVTLSCRASQRVNNNYLAWYQQRPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYDRSPLTFGGGKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQ GTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGTQVTVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSTIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL 250YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
CD3εVH	251	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMHWRQAPGKGLEWVAQIKDKSQNYATYVAESVKGR FTISRADSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCRYVHYAAGYGVDIWGQGTITVTVSS
CD3εVH_VHR_CDR1	252	NAWMH
CD3εVH_VHR_CDR2	253	QIKDKSQNYATYVAESVKGR
CD3εVH_VHR_CDR3	254	VHYAAGYGVDI
CD3εVL	255	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQPLVHSNRNTYLHWYQQKPGQAPRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQVPYTFGQGTLEIK
CD3εVL_VLR_CDR1	256	RSSQPLVHSNRNTYLH
CD3εVL_VLR_CDR2	257	KVSNRFS
CD3εVL_VLR_CDR3	258	GQGTQVPYT
	259	VEPKSC

Таблица 14-10

Обозначение последовательности	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
SG1321kV11Fc	99	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLS
SG1372kV11Fc	100	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLS
SG1176kV11Fc	108	CPPCPAPELRGGPKVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLS
SG1321hV11Fc	109	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLS
SG1372hV11Fc	111	CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHAHYTRKELSLS
SG1176hV11Fc	112	CPPCPAPELRGGPKVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLS

Таблица 14-11

Пример 3

In vitro эффективность антитела DLL3-Dual-LINC в отношении экспрессирующих DLL3 клеточных линий

3.1. Измерение TDCC-активности при использовании антитела анти-DLL3/Dual-Linc (1+2), антитела Dual (1+1), DLL3CD3BiTE и антитела DLL3/CD3 эпсилон (1+1)

Цитотоксическую активность оценивали по уровню ингибирования клеточного роста с помощью анализатора клеток в реальном времени xCELLigence (фирма Roche Diagnostics) в присутствии PBMC. На фиг. 2

представлены данные о TDCC-активности полученных антител, таких как анти-DLL3/Dual-Linc (DLL3-DualAE05/DualAE05, 1+2), антитело Dual (1+1) (DLL3/DualAE05), DLL3CD3BiTE и антитело DLL3/CD3 эпсилон (1+1), представленных в таблицах 10-13. Клеточную линию SK-MEL30 применяли в качестве клеток-мишеней. Клетки-мишени отделяли от чашки и клетки высевали в Е-планшет 96 (фирма Roche Diagnostics), используя аликвоты 100 мкл/лунку, для доведения количества клеток до 5×10^3 клеток/лунку, и измеряли рост клеток, применяя анализатор клеток в реальном времени xCELLigence. Через 24 ч планшет удаляли и в планшет добавляли по 50 мкл соответствующих антител в каждой из указанных концентраций (5-кратные серийные разведения, начиная с 10 нМ, т.е. 0,25, 1,25, 2,5, 5 и 10 нМ). После осуществления реакции в течение 15 мин при комнатной температуре добавляли 50 мкл свежего раствора человеческих PBMC, используя соотношение клетки-эффекторы/клетки-мишени 2 (т.е. 1×10^4 клеток /лунку) и измеряли рост клеток, применяя анализатор клеток в реальном времени xCELLigence. Реакцию осуществляли в атмосфере 5% газообразного диоксида углерода при 37°C. Поскольку передача сигналов CD137 повышает выживаемость Т-клеток и предупреждает активацию, индуцирующую гибель клеток, то TDCC-анализ проводили при более низком соотношении Е:Т. Может требоваться удлиненный период времени для обнаружения повышения цитотоксичности, связанной с активацией CD137. В целом, примерно через 68 ч после добавления PBMC определяли уровень ингибирования клеточного роста (CGI: %) с использованием указанного ниже уравнения. Величина клеточного индекса, полученная с использованием анализатора клеток в реальном времени xCELLigence, применяемая для

расчетов, представляла собой стандартизованную величину, в которой величину клеточного индекса непосредственно в момент времени перед добавлением антитела принимали за 1.

Уровень ингибирования клеточного роста (%) = $(A-B) \times 100 / (A-1)$, где

А обозначает среднее значение величин клеточного индекса в лунках без добавления антитела (содержащих только клетки-мишени и человеческие РВМС), а В обозначает среднее значение величин клеточного индекса в лунках-мишенях. Оценку осуществляли с дублированием.

Как продемонстрирована на фиг. 2а), антитело анти-DLL3/Dual-Linc (DLL3-DualAE05/DualAE05, 1+2) обладало более сильной TDCC-активностью по сравнению с антителом Dual (1+1) (DLL3/DualAE05) и антителом DLL3/CD3 эпсилон (1+1). Это позволяет предположить, что молекулярный формат Dual-Linc способствует повышению цитотоксичности. Кроме того, при применении антител в указанных концентрациях TDCC-активность антитела анти-DLL3/Dual-Linc сопоставима с активностью DLL3/CD3BiTE.

3.2. Изучение влияния длины линкера на цитотоксичность

Для повышения цитотоксичности в отношении опухолевых клеток решающее значение может иметь более тесная близость и более жесткое связывание между опухолевыми клетками и эффекторными клетками. Это означает, что более короткое расстояние может помогать приведению Т-клетки и опухолевой клетки в тесную близость, что может способствовать TDCC. Таким образом, при создании изобретения конструировали три варианта антитела анти-DLL3/Dual-Linc, в которых линкеры имели различную длину. Длина линкера антитела DLL3-DualAE05/DualAE05-FF110 (средний линкер) и DLL3-DualAE05/DualAE05-FF111 (короткий линкер) меньше, чем антитела DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091 (длинный линкер) (ниже в настоящем описании указанные варианты можно сокращенно обозначать как DLL3-AE05/AE05-FF110, DLL3-AE05/AE05-FF111 и DLL3-AE05/AE05-FF091 соответственно). Для оценки влияния длины линкера на цитотоксичность осуществляли измерение TDCC согласно методу, описанному в примере 3.1, используя антитела в концентрациях 0,2, 1 и 5 нМ.

Как продемонстрировано на фиг. 2б), DLL3-AE05/AE05-FF110 (средний линкер) и DLL3-AE05/AE05-FF111 (короткий линкер) обладали более сильной

TDCC-активностью, чем DLL3-AE05/AE05-FF091 (длинный линкер) в концентрации 0,2нМ. Для DLL3-AE05/AE05-FF110 (средний линкер) обнаружена самая сильная TDCC-активность. Эти результаты позволяют предположить, что длина линкера важной для TDCC-активности и линкер средней длины является наиболее пригодным для обеспечения TDCC-активности *in vitro*.

Пример 4

Оценка *in vivo* эффективности триспецифического антитела DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091 в сравнении с DLL3CD3BiTE.

Противоопухолевую активность антител DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091 и DLL3CD3BiTE, полученных в примере 2, тестировали, используя в качестве модели рака линию человеческого мелкоклеточного рака легкого NCI-H1436. Клетки NCI-H1436 трансплантировали подкожно гуманизированным мышам линии NOG. Самок мышей линии NOG покупали у фирмы In-Vivo Science. Для гуманизации мышей подвергали сублетальному облучению с последующей инъекцией через 1 день 100000 клеток пуповинной крови человека (фирма ALLCELLS). После гуманизации NCI-H1436 (5×10^6 клеток) смешивали с матриксом базальной мембраны Matrigel (фирма Corning) и трансплантировали в правую боковую область гуманизированных мышей линии NOG. День трансплантации принимали за день 0. В день 11 мышей произвольно разделяли на группы на основе объема опухолей и веса тела. На следующий день мышам инъецировали *i.v.* либо наполнитель (ЗФР, содержащий 0,05% Твин), либо в дозе 6,5 мг/кг DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091, либо в дозе 3,5 мг/кг DLL3CD3BiTE.

Для анализа Т-клеточной инфильтрации ксенотрансплантированные опухоли, полученные у мышей, собирали в указанные моменты времени после введения антител. Опухоли взвешивали, измельчали с использованием набора для диссоциации опухолей человека (фирма Miltenyi) в соответствии с протоколом производителя, а после диссоциации добавляли гранулы для абсолютного подсчета CountBright (фирма ThermoFisher scientific). Количество CD8⁺ Т-клеток внутри опухолей оценивали с помощью LSRFortessa X-20 (фирма BD).

Для анализа Т-клеточного истощения ксенотрансплантированные опухоли, полученные у мышей, собирали через 7 дней после введения антител. Опухоли измельчали с использованием набора для диссоциации опухолей человека

(фирма Miltenyi) в соответствии с протоколом производителя и в Т-клетках определяли уровни экспрессии маркеров Т-клеточного истощения Tim-3, PD-1 и Lag-3.

В результате установлено, что антитело DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091 обладало более высокой эффективностью и более сильной Т-клеточной инфильтрацией, чем DLL3CD3BiTE (фиг.3 и фиг. 4). Кроме того, в группе, обработанной DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091, в Т-клетках обнаружен более низкий уровень экспрессии PD-1, Tim-3 и LAG3 (фиг. 5), что позволяет предположить, что антитело DLL3-DualAE05/DualAE05-FF091 индуцировало Т-клеточное истощение в меньшей степени.

Промышленная применимость

В настоящем изобретении предложены мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, обладающие способностью связываться с CD3 и CD137 (4-1BB), но не обладающие способностью связываться с CD3 и CD137 одновременно, и обладающие способностью связываться с DLL3.

Антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, проявляют повышенную зависящую от Т-клеток цитотоксическую активность DLL3-зависимым образом в результате связывания с CD3/CD137 и DLL3.

Антигенсвязывающие молекулы и содержащие их фармацевтические композиции можно применять для таргетинга клеток, экспрессирующих DLL3, с целью применения в иммунотерапии для лечения различных раков, которые ассоциированы с DLL3, таких как DLL3-позитивные раки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:
первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий
фрагмент, каждый из которых обладает способностью связываться с
человеческим CD3 и человеческим CD137, но не может связываться с
человеческим CD3 и человеческим CD137 одновременно; и
третий антигенсвязывающий фрагмент, который обладает способностью
связываться с человеческим DLL3.

2. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 1, в которой
первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент
каждый содержит вариабельную область антитела, содержащую любой из
следующих вариантов, указанных ниже в п.п. (a1)-(a15):

(a1) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1,
имеющий SEQ ID NO: 17, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 31, CDR 3
тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 45, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID
NO: 64, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 69, и CDR 3 легкой цепи,
имеющий SEQ ID NO: 74;

(a2) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1,
имеющий SEQ ID NO: 18, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 32, CDR 3
тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 46, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID
NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи,
имеющий SEQ ID NO: 73;

(a3) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1,
имеющий SEQ ID NO: 19, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 33, CDR 3
тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID
NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи,
имеющий SEQ ID NO: 73;

(a4) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1,
имеющий SEQ ID NO: 19, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 33, CDR 3
тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID

NO: 65, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 70, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 75;

5 (a5) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 20, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 34, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

10 (a6) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 22, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 36, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 50, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

15 (a7) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 23, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 37, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

20 (a8) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 23, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 37, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

25 (a9) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 24, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 38, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 52, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

30 (a10) определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 25, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 39, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 53, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

(a11) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 26, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 40, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 54, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 66, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 71, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 76;

(a12) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 26, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 40, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 54, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a13) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 27, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 41, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 55, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73;

(a14) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 28, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 42, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 56, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 63, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 73; и

(a15) определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 82, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 83, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 84, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 65, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 70, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 75.

3. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-2, в которой первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент каждый содержит переменную область антитела, содержащую любой из вариантов, указанных ниже в п.п. (a1)-(a15):

(a1) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59;

(a13) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

5 (a14) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; и

(a15) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

10

4. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-3, в которой каждый первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab и содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь, сформированную между CH1-участком первого антигенсвязывающего фрагмента и CH1-участком второго антигенсвязывающего фрагмента.

15

5. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 4, в которой каждый первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab и содержит дисульфидную связь, сформированную между аминокислотным остатком в положении 191 согласно EU-нумерации в соответствующем CH1-участке первого антигенсвязывающего фрагмента и второго антигенсвязывающего фрагмента.

20

6. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-5, в которой каждый первый, второй и третий антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу Fab, в которой третий антигенсвязывающий фрагмент слит на C-конце тяжелой цепи Fab (CH1) с N-концом тяжелой цепи Fab одного из первого антигенсвязывающего фрагмента или второго антигенсвязывающего фрагмента, необязательно через пептидный линкер.

25

30

7. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 6, в которой указанный пептидный линкер выбран из группы, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249 или SEQ ID NO: 259.

5 8. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-7, в которой третий антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу кроссовер-Fab, в которой переменные области легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab обменены и в которой каждый первый и второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу канонического Fab.

10

9. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по п. 8, в которой в константном домене CL легкой цепи каждого первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислоты в положениях 123 и 124 представляют собой аргинин (R) и лизин (K) соответственно (нумерация согласно Кэботу) и в которой в константном домене CH1 тяжелой цепи каждого первого и второго антигенсвязывающих фрагментов аминокислоты в положениях 147 и 213 представляют собой глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-нумерации).

15

20

10. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-9, в которой третий антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область антитела, содержащую определяющий комплементарность участок тяжелой цепи (CDR) 1, имеющий SEQ ID NO: 233, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 234, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 235, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 237, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 238, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 239.

25

11. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-10, в которой третий антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 232, и переменную

30

область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236.

12. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из п.п. 1-11, дополнительно содержащая Fc-домен.

13. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит пять полипептидов в любой из комбинаций, выбранных из указанных ниже в п.п. (a1)-(a5):

(a1) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 208 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепь 4 и цепь 5);

(a2) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 203 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепь 4 и цепь 5);

(a3) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепь 4 и цепь 5);

(a4) полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205 (цепь 1), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 (цепь 2), полипептидная цепь, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209 (цепь 3), и две полипептидные цепи, каждая из которых содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214 (цепь 4 и цепь 5);

14. Выделенный полинуклеотид или множество полинуклеотидов, кодирующих мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из п.п. 1-13.

5

15. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или множество полинуклеотидов по п. 14.

10 16. Способ получения мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из п.п. 1-13, включающий стадии, на которых а) культивируют клетку-хозяина по п. 15 в условиях, пригодных для экспрессии антигенсвязывающей молекулы, и б) выделяют антигенсвязывающую молекулу.

a)

Трехвалентное Ат (1+2 DUAL/LINC)

Цепь 1

Цепь 2

Цепь 3

Цепь 4

Цепь 5

LINC
(сконструированная
дисульфидная связь)

Fv A
(внешний)

Fv B
(внутренний)

Fv C

VH/VL CrossMab

Линкер

Fc-область

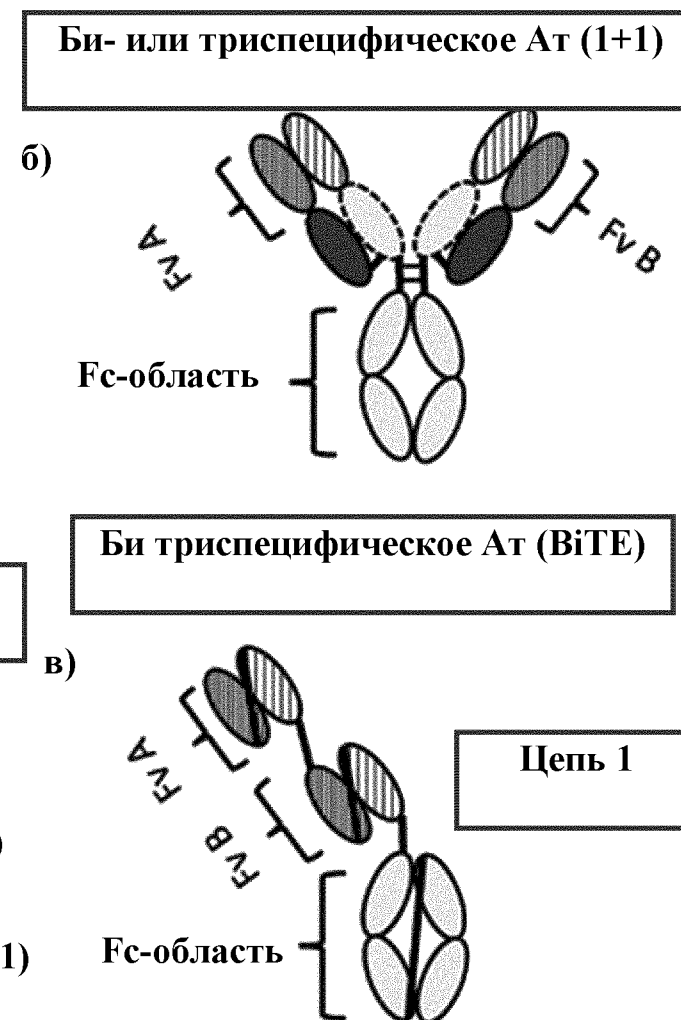
Вариабельный домен тяжелой цепи (VH)

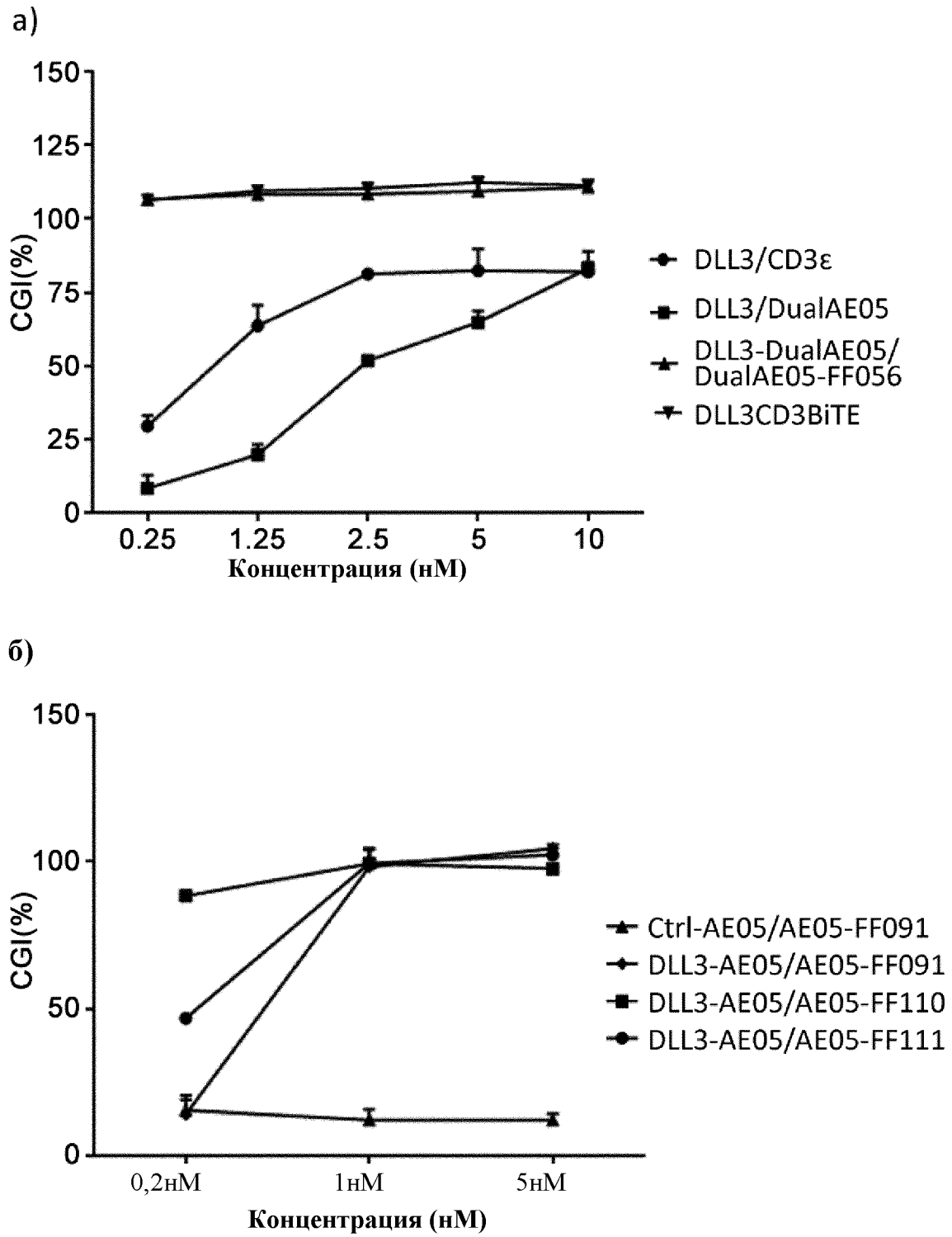
Вариабельный домен легкой цепи (VL)

Константный домен 1 тяжелой цепи (CH1)

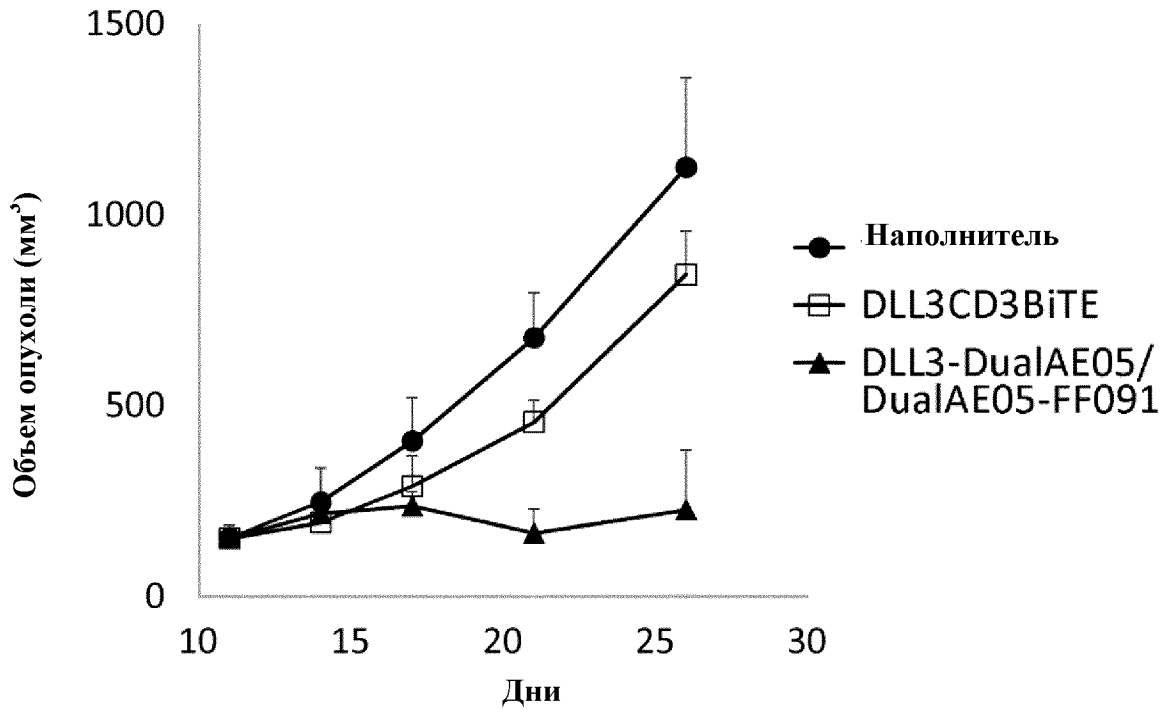
Константный домен легкой цепи (CL)

The diagram illustrates a complex antibody molecule composed of five polypeptide chains. Chain 1 and Chain 2 are connected by a disulfide bond (LINC). Chain 3 is also connected to Chain 1. Chain 4 and Chain 5 are connected by a disulfide bond. The molecule features several antigen-binding sites (Fv A, Fv B, Fv C) and a linker region. The Fc region is located at the base of the molecule. The legend indicates that the shaded ovals represent different domains: VH (variable heavy chain), VL (variable light chain), CH1 (constant heavy chain 1), and CL (constant light chain).

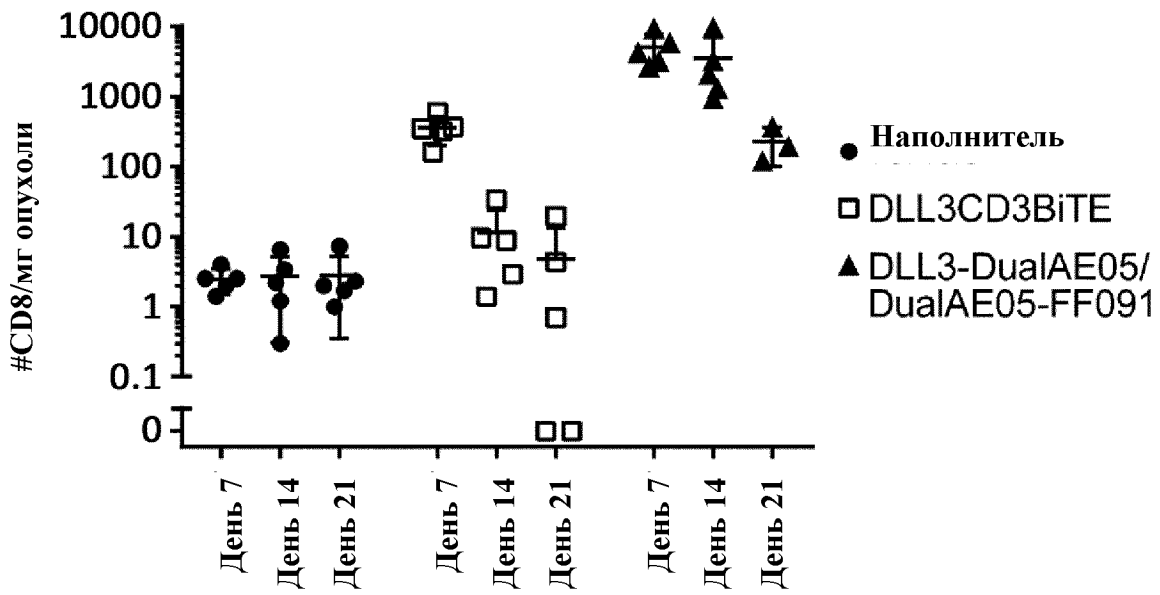




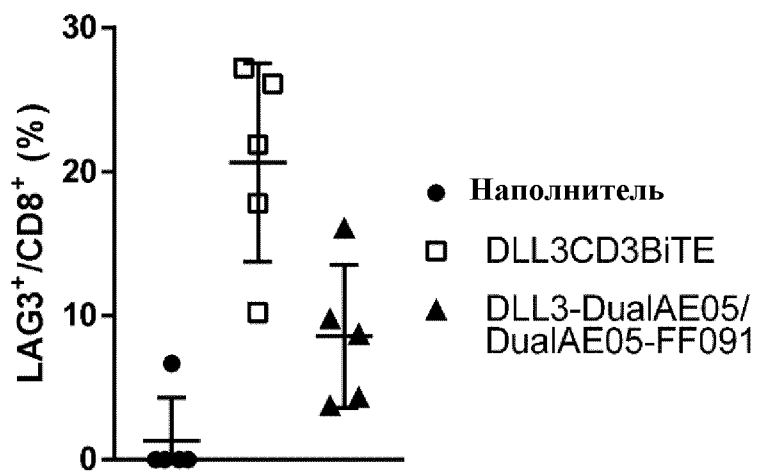
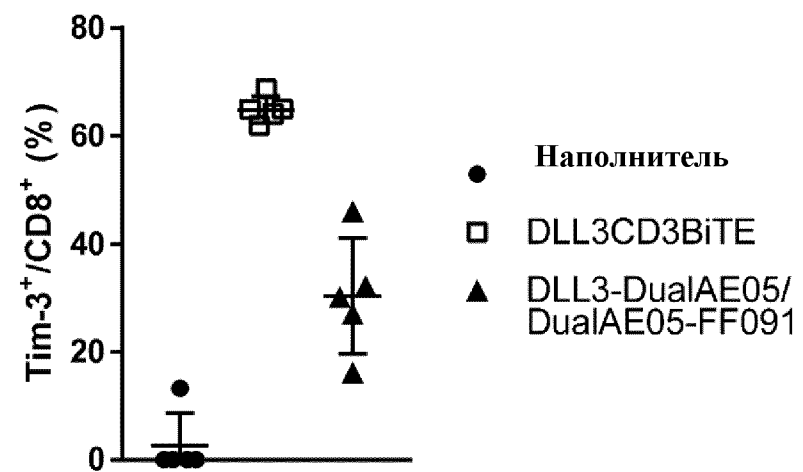
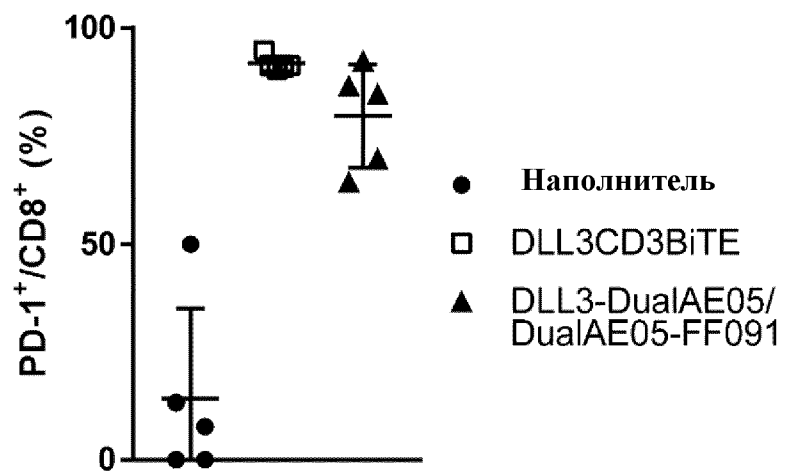
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

Фиг. 6

