

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390158 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.02

(22) Дата подачи заявки
2021.07.08

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ PSMA И ГАММА-ДЕЛЬТА РЕЦЕПТОРЫ Т-КЛЕТОК

(31) 20184800.9
(32) 2020.07.08
(33) EP
(86) PCT/EP2021/068960
(87) WO 2022/008646 2022.01.13
(71) Заявитель:
ЛАВА ТЕРАПЬЮТИКС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Роверс Робертус Корнелис, Ван Дер
Влит Йоханнес Йелле, Кинг Лиза
Анна, Паррен Пауль Виллем Генри
Ида, Геймарайс Иглесиас Виктория,
Лютье Хюлсик Давид, Махилсен
Петер Александер Герардус Мария
(NL)

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

(57) Изобретение относится к антителам, способным связывать PSMA человека и способным связывать Vγ9Vδ2 рецептор Т-клеток человека. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела по изобретению, и к применению антител по изобретению для лечения.

A1

202390158

202390158

A1

АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТ PSMA И ГАММА-ДЕЛЬТА РЕЦЕПТОРЫ Т-КЛЕТОК

ОПИСАНИЕ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к новым мультиспецифическим антителам, способным связывать PSMA человека и способным связывать V γ 9V δ 2 рецептор Т-клеток человека. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела по изобретению, и к применению антител по изобретению для лечения.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Рак предстательной железы является наиболее распространенным видом рака у мужчин в Европе и Соединенных Штатах. Раннее выявление локализованного заболевания приводит к высокой выживаемости. Однако метастазы опухоли приводят к резкому снижению выживаемости. Простатспецифический мембранный антиген (PSMA), также известный как фолатгидролаза I или глутаматкарбоксипептидаза II, является потенциальной мишенью при разработке лекарственных средств. PSMA представляет собой трансмембранный белок типа II, проявляющий сверхэкспрессию в клетках рака предстательной железы, но низкую экспрессию в нормальных тканях.

Ранее были созданы несколько соединений, нацеленных на PSMA (см., например, Haberkorn et al. (2016) Clin Cancer Res 22:9), включая антитела (Chatalic et al. (2015) J Nucl Med 56:1094; WO 2018/098354). Также были описаны подходы с использованием биспецифических антител к PSMA + CD3, активирующих и рекрутирующих Т-клетки с (Hernandez-Hoyos et al. (2016) Mol Cancer Ther 15:2155; WO 2016/187594). Биспецифические антитела, активирующие и рекрутирующие Т-клетки, обладают специфичностью связывания с опухолевой мишенью и специфичностью связывания с Т-клетками, и, таким образом, они повышают эффективность действия, перенаправляя цитотоксичность Т-клеток на злокачественные клетки, см., например, Huehls et al. (2015) Immunol Cell Biol 93:290; Ellerman (2019) Methods, 154:102; de Bruin et al. (2017) Oncoimmunology 7(1):e1375641 и WO 2015/156673. Однако описанные результаты

значительно различаются. Например, в одном исследовании, в котором фрагмент, связывающий CD3, был объединен с фрагментами, связывающими 8 различных В-клеток-мишеней (CD20, CD22, CD24, CD37, CD70, CD79b, CD138 и HLA-DR), установлено, что биспецифические антитела, нацеленные на различные опухолевые мишени, показали сильные различия в их способности индуцировать цитотоксичность клеток-мишеней, и эта цитотоксичность не коррелировала с уровнями экспрессии антигена. Например, биспецифические антитела на основе CD3, нацеленные на HLA-DR или CD138, не были способны индуцировать цитотоксичность, несмотря на средние или высокие уровни экспрессии HLA-DR и CD138 (Engelberts et al. (2020) Ebiomedicine 52:102625). Немногие методы перенаправления Т-клеток достигли поздней стадии клинических исследований, возможно, из-за значительной токсичности, производственных проблем, иммуногенности и низкой частоты случаев ответа при солидных опухолях. В частности, когда активатор-рекрутер Т-клеток включает плечо, связывающее CD3, токсичность может возникать в результате неконтролируемой иммунной активации и высвобождения цитокинов.

Таким образом, хотя был достигнут значительный прогресс, по-прежнему существует потребность в новых антителах к PSMA, которые были бы терапевтически эффективными, но обладали бы приемлемой токсичностью. Такие новые антитела к PSMA также должны иметь соответствующие фармакокинетические и фармакодинамические свойства и быть оптимальными для производства с высоким выходом и чистотой. Кроме того, необходимы стабильные структуры для таких антител, где происходит минимальная деградация и агрегация.

Эти потребности решены настоящим изобретением.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение раскрывает новые антитела для терапии на основе PSMA. Были сконструированы биспецифические антитела, в которых PSMA-связывающие участки объединены с участками связывания, способными связывать V γ 9V δ 2 рецептор Т-клеток и, таким образом, активировать и рекрутировать $\gamma\delta$ Т-клетки. Неожиданно оказалось, что биспецифические антитела способны опосредовать активацию аутологичных V γ 9V δ 2 Т-клеток, включая инфильтрирующие опухоль V γ 9V δ 2 Т-клетки, и с очень высокой эффективностью индуцировать гибель опухолевых клеток пациента в

присутствии аутологичных V γ 9V δ 2 Т-клеток, происходящих из РВМС. Эту активность также наблюдали с использованием линий опухолевых клеток при низком соотношении эффекторных клеток ($\gamma\delta$ Т-клеток) к клеткам-мишеням (опухолевым клеткам), что является важным, поскольку $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой лишь субпопуляцию Т-клеток у человека, которая может различаться по их количеству. С другой стороны, нормальная здоровая ткань не была затронута, что указывает на потенциал этих антител для эффективного, но безопасного лечения рака. Кроме того, исследования, проведенные с цельной кровью человека, показали, что, несмотря на высокую активность в отношении клеток-мишеней, антитело индуцировало лишь низкие уровни высвобождения цитокинов, что свидетельствует о низком риске синдрома высвобождения цитокинов.

Кроме того, был разработан новый формат биспецифического антитела, содержащего VHN-Fc человека, которое при продуцировании в клетках-хозяевах млекопитающих приводит к очень гомогенному и чистому продукту. Кроме того, такой формат антитела обеспечил подходящие фармакокинетические свойства для использования его в лечении, и для этого продукта была разработана подходящая стабильная композиция. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, следует отметить, что молекулярный размер и уменьшенный гидродинамический радиус антител в таком формате антител могут быть очень полезными для эффективного проникновения в опухоль, избегая при этом почечной фильтрации и обеспечивая защиту от деградации за счет связывания с FcRn.

Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему первую антигенсвязывающую область, способную связывать PSMA человека, и вторую антигенсвязывающую область, способную связывать V γ 9V δ 2 рецептор Т-клеток человека.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела по изобретению, применениям антител по изобретению при лечении, а также к конструкциям нуклеиновых кислот, векторам экспрессии для продуцирования антител по изобретению и к клеткам-хозяевам, содержащим такие конструкции нуклеиновых кислот или вектор экспрессии.

Дополнительные аспекты и варианты выполнения настоящего изобретения описаны ниже.

Краткое описание фигур

Фигура 1: На этой фигуре показано выравнивание последовательностей гуманизированных вариантов анти-PSMA VHH JVZ-007. LV1044 - исходная последовательность, полученная от ламы; другие последовательности представляют собой гуманизированные варианты.

Фигура 2: На этой фигуре представлено схематическое изображение биспецифических VHH с форматом, увеличивающим время полужизни. Сайленсинговые мутации Fc обозначены звездочками. Последовательность модифицированного шарнира указана рядом с изображением, а также показаны мутации CH3, которые обеспечивают гетеродимеризацию, опосредованную связями «выступ-во впадину» (KiH). HC: тяжелая цепь.

Фигура 3: На этой фигуре показаны результаты анализа активации Т-клеток (дегрануляция), при исследовании эффективности гуманизированных вариантов в отношении индукции дегрануляции Т-клеток. Верхняя панель: титрование биспецифических конструкций с использованием PSMA-положительных клеток LNCaP в качестве клеток-мишеней. Нижняя панель: одна высокая (10 нМ) концентрация биспецифических конструкций, используемых в анализе дегрануляции с клетками PC-3 в качестве клеток-мишеней. 5C8 обозначает VHH TCR-специфического антитела против V γ 9V δ 2, а 5C8var1 обозначает его гуманизированный вариант.

Фигура 4: На этой фигуре показаны результаты цитотоксичности в отношении клеток LNCaP, индуцированной антителами и опосредованной V γ 9V δ 2 Т-клетками.

Фигура 5: На этой фигуре показаны результаты анализа связывания LV1050-Fc x 5C8var1-Fc с различными клетками/клеточными линиями в анализе FACS. Верхняя панель: связывание с PSMA-положительной клеточной линией LNCaP и с PSMA-отрицательной линией PC-3. Нижняя панель: связывание с V γ 9V δ 2 Т-клетками.

Фигура 6: На этой фигуре показаны результаты оценки LV1050-Fc x 5C8var1-Fc-индуцированной активации V γ 9V δ 2 Т-клеток, зависимой от мишени (верхняя панель) и результаты оценки цитотоксичности (нижняя панель).

Фигура 7: На этой фигуре показаны уровни экспрессии PSMA и CD277 в опухолевой ткани и нормальной ткани предстательной железы и частота встречаемости (как часть общей популяции CD3+) V γ 9V δ 2 T-клеток в тканях.

Фигура 8: На этой фигуре показаны результаты оценки цитотоксичности (24-часовой анализ) клеток опухоли простаты, индуцированной V γ 9V δ 2 T-клетками и LV1044-5C8 («соединение LAVA»). *** $p < 0,05$. Количество опухолевых клеток (верхняя панель) или нормальных клеток (нижняя панель) без лечения принято за 100%.

Фигура 9: На этой фигуре показана схема взаимодействия, отображенная с указанием связей между PSMA и LV1050-5C8var1-no-C-tag. Цифры указывают положение аминокислот в конструкции PSMA с SEQ ID NO: 30, которая основана на UniProt ID Q04609, но с другим сигнальным пептидом. Номера положений в конструкции PSMA соответствуют нумерации в UniProt ID Q04609 следующим образом: Положение в конструкции = положению в UniProt ID Q04609 + 41. Показанные фрагменты PSMA представлены в SEQ ID NO: 33-36.

Фигура 10: На этой фигуре показаны результаты анализа дегрануляции с использованием размноженных V γ 9V δ 2 T-клеток и PSMA-положительных клеточных линий, полученных из опухоли. Дегрануляцию измеряли с использованием первичных размноженных V γ 9V δ 2 T-клеток, совместно культивируемых с различными клеточными линиями, экспрессирующими PSMA (клетки LNCaP, 22Rv1 и VCaP). Процент CD107a-положительных (дегранулирующих) клеток в популяции CD3-V γ 9 нанесен на график как функция концентрации LV1050-Fc x 5C8var1-Fc.

Фигура 11: На этой фигуре показаны результаты анализа цитотоксичности с использованием размноженных V γ 9V δ 2 T-клеток и PSMA-положительных или PSMA-отрицательных клеток. Цитотоксичность измеряли с использованием первичных размноженных V γ 9V δ 2 T-клеток, совместно культивированных: (A) с клетками LNCaP (PSMA-положительные клетки), по сравнению с клетками LNCaP.koPSMA (PSMA-отрицательными клетками); или (B) с различными клеточными линиями, экспрессирующими PSMA (клетки LNCaP, 22Rv1 и VCaP). Гибель клеток-мишеней определяли по активности в среде с внутриклеточной протеазой с использованием анализа CytoTox-Glo™.

Фигура 12: На этой фигуре показаны результаты анализа дегрануляции V γ 9V δ 2 T-

клеток, эндогенно присутствующих в опухоли предстательной железы или нормальной (незлокачественной) ткани. Суспензии клеток опухоли предстательной железы (А) и нормальной (незлокачественной) ткани предстательной железы (В) инкубировали в течение 4 часов с флуоресцентно меченым mAb CD107a с 50 нМ LV1050-Fc x 5C8var1-Fc или без него, а процент CD45+/клетки CD3+/V γ 9+/V δ 2+/CD107a+ (указан как экспрессия CD107a (% EpcAM-/CD45+/CD3+/V γ 9+/V δ 2+)) определяли с помощью проточной цитометрии. Индукция экспрессии CD107a с использованием LV1050-Fc x 5C8var1-Fc показана относительно фоновой (только среда) экспрессии. **P<0,01, парный Т-критерий; ns = не значимо.

Фигура 13: На этой фигуре показаны результаты анализа дегрануляции V γ 9V δ 2 Т-клеток, присутствующих в аутологических PMBC, при совместном культивировании с опухолью простаты, полученной от пациента, или с нормальной (незлокачественной) тканью простаты. Суспензии клеток опухоли предстательной железы (А) и нормальной (незлокачественной) ткани предстательной железы (В) инкубировали в течение 4 часов с флуоресцентно меченым mAb CD107a с 50 нМ LV1050-Fc x 5C8var1-Fc или без него в присутствии аутологических PMBC, и процент клеток CD45+/CD3+/V γ 9+/V δ 2+/CD107a+ (указан как экспрессия CD107a (% EpcAM-/CD45+/CD3+/V γ 9+/V δ 2+)) определяли с помощью проточной цитометрии. Индукция экспрессии CD107a с использованием LV1050-Fc x 5C8var1-Fc показана относительно фоновой (только среда) экспрессии *P<0,05, парный Т-критерий, ns = не значимо.

Фигура 14: На этой фигуре показаны результаты оценки лизиса опухолевых клеток, опосредованного LV1050-Fc x 5C8var1-Fc в присутствии аутологических PMBC. Суспензии одиночных клеток из ткани опухоли предстательной железы (А) или нормальной (незлокачественной) ткани предстательной железы (В) культивировали с аутологичными PMBC в соотношении Е:Т = 10:1, с 50 нМ LV1050-Fc x 5C8var1-Fc или без него, и инкубировали в течение 24 часов. Цитотоксичность определяли с помощью проточной цитометрии с использованием исключения 7-AAD и выражали в виде процента лизиса относительно «клеток-мишеней плюс PMBC». Показаны средние значения и SEM (стандартная ошибка среднего), (n = 3), * P < 0,05.

Фигура 15: На этой фигуре показано, что комбинация LV1050-Fc x 5C8var1-Fc и PMBC ингибирует рост опухоли у мышей, инокулированных клетками карциномы

предстательной железы 22Rv1. Мышам NCG (n=4-6/группа) вводили подкожно только клетки рака предстательной железы 22Rv1 или в комбинации с PBMC от двух здоровых доноров. В дни 0, 7, 14 и 21 внутривенно вводили LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (0,2 или 2 мг/кг) или PBS. Размеры опухолей измеряли штангенциркулем дважды в неделю. Мышей умерщвляли, когда средний объем опухоли в группе превышал 2000 мм³. Объемы опухоли (мм³; среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего) нанесены на график в виде функции зависимости от дней после инокуляции клеток рака предстательной железы 22Rv1. Статистический анализ (ANOVA (дисперсионный анализ) с апостериорным критерием Даннета) показал, что использование PBMC от донора № 1 и LV1050-Fc x 5C8var1-Fc, вводимого в дозе 0,2 или 2 мг/кг, приводит к статистически значимому снижению (**P < 0,001) уровню роста опухоли, при значениях TGI на 34-й день соответственно 91% и 78%. При использовании PBMC от донора № 2 введение LV1050-Fc x 5C8var1-Fc в дозе 2 мг/кг приводило к значительному противоопухолевому эффекту (*P < 0,01) со значением TGI 52% на 41-й день.

Фигура 16: На этой фигуре показана фармакокинетика LV1050-Fc x 5C8var1-Fc у мышей, трансгенных по FcRn человека, после его однократного внутривенного введения. LV1050-Fc x 5C8var1-Fc и гуманизированное контрольное антитело IgG вводили совместно внутривенно в дозе 2 мг/кг, 5 мг/кг или 10 мг/кг на группу мышам, трансгенным по FcRn человека (n=4 на группу). На верхнем графике показана концентрация LV1050-Fc x 5C8var1-Fc в зависимости от времени для трех групп мышей, которым вводили разные концентрации антитела. На нижнем графике показаны расчеты конечного периода полужизни LV1050-Fc x 5C8var1-Fc, полученные в трех группах дозирования (с использованием программного обеспечения PK Solutions для анализа данных ELISA). Времена полужизни LV1050-Fc x 5C8var1-Fc, рассчитанные для каждой группы, получавшей это антитело совместно с контрольным антителом IgG, были сопоставимы и соответствовали 139,9 $\pm$ 10,2 часа (при 2 мг/кг), 160,2 $\pm$ 13,4 часа (при 5 мг/кг) и 171,7 $\pm$ 10,6 часов (при 10 мг/кг).

Фигура 17: На этой фигуре показана фармакокинетика различных доз LV1050-Fc x 5C8var1-Fc в приматах, отличных от человека (NHP), после однократного внутривенного введения. Концентрации LV1050-Fc x 5C8var1-Fc в плазме измеряли до введения дозы, а затем через 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 72, 120, 168, 336, 504 и 528 часов после введения.

Концентрация LV1050-Fc x 5C8var1 (ось Y) в плазме представлена в виде функции от времени.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Определения

Термин «PSMA человека», используемый здесь, относится к белку простат-специфического мембранного антигена человека, также известному как глутаматкарбоксипептидаза 2 (EC:3.4.17.21), белок гена 27, ингибирующий рост клеток, фолатгидролаза 1, фолилполи-гамма-глутаматкарбоксипептидаза (FGCP), глутаматкарбоксипептидаза II (GCP II), мембранная глутаматкарбоксипептидаза (mGCP), N-ацетилированная альфа-связанная кислая дипептидаза I (NAALADase I) или птероилполигамма-глутаматкарбоксипептидаза (UniProtKB - Q04609 (FOLH1_HUMAN)), изоформа I. Последовательность этого белка представлена в SEQ ID NO: 24.

Термин «V δ 2 человека», используемый здесь, относится к белку TRDV2, дельта-варианту рецептора 2 Т-клеток (UniProtKB-A0JD36 (A0JD36_HUMAN) представляет пример последовательности V δ 2).

Термин «V γ 9 человека», используемый здесь, относится к белку TRGV9, гамма-варианту 9 Т-клеточного рецептора (UniProtKB - Q99603_HUMAN представляет пример последовательности V γ 9).

Термин «антитело» предназначен для обозначения молекулы иммуноглобулина, фрагмента молекулы иммуноглобулина или производного любого из них, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном в типичных физиологических условиях с временем полужизни, составляющим значительные периоды, например, по меньшей мере приблизительно 30 минут, по меньшей мере приблизительно 45 минут, по меньшей мере приблизительно один час, по меньшей мере приблизительно два часа, по меньшей мере приблизительно четыре часов, по меньшей мере приблизительно 8 часов, по меньшей мере приблизительно 12 часов, приблизительно 24 часов или более, приблизительно 48 часов или более, приблизительно 3, 4, 5, 6, 7 или более дней и т. д., или любой другой соответствующий функционально определенный период (например, время, достаточное для индукции, стимулирования, усиления и/или модулирования физиологического ответа, зависящее от связывания антитела с антигеном,

и/или время, достаточное для того, чтобы антитело приобрело эффекторную активность). Антигенсвязывающая область (или антигенсвязывающий домен), которая взаимодействует с антигеном, может включать переменные области как тяжелой, так и легкой цепей молекулы иммуноглобулина, или она может представлять собой однодоменную антигенсвязывающую область, например, только переменную область тяжелой цепи. Константные области антитела, если они присутствуют, могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки и Т-клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, который представляет собой первый компонент классического пути активации комплемента. Однако в некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения Fc-участок антитела был модифицирован, чтобы быть инертным. Термин «инертный» означает Fc-участок, который, по меньшей мере, не способен связывать какие-либо Fcγ рецепторы, индуцировать Fc-опосредованное перекрестное связывание FcR или индуцировать FcR-опосредованное перекрестное связывание антигенов-мишеней через два участка Fc отдельных антител. В другом варианте выполнения настоящего изобретения инертный Fc-участок, помимо прочего не способен связывать C1q. В одном варианте выполнения настоящего изобретения антитело содержит мутации в положениях 234 и 235 (Canfield and Morrison (1991) J Exp Med 173:1483), например мутацию Leu в Phe в положении 234 и мутацию Leu в Glu в положении 235. В другом варианте выполнения настоящего изобретения антитело содержит мутацию Leu в Ala в положении 234, мутацию Leu в Ala в положении 235 и мутацию Pro в Gly в положении 329. В другом варианте выполнения настоящего изобретения антитело содержит мутацию Leu в Phe в положении 234, мутацию Leu в Glu в положении 235 и мутацию Asp в Ala в положении 265.

Fc-участок иммуноглобулина определяется как фрагмент антитела, который обычно образуется после расщепления антитела папаином, который включает две области CH2-CH3 иммуноглобулина и соединительную область, например, шарнирную область. Константный домен тяжелой цепи антитела определяет изотип антитела, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD или IgE. Fc-участок опосредует эффекторные функции антител с рецепторами клеточной поверхности, называемыми Fc-рецепторами, и белками системы комплемента.

Термин «шарнирная область», используемый здесь, относится к шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, шарнирная область антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 216-230 согласно нумерации ЕС.

Термин «CH2 область» или «домен CH2», используемый здесь, относится к области CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, CH2 область антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 231-340 согласно нумерации ЕС. Однако CH2 область также может быть любым из других подтипов, описанных в настоящем документе.

Термин «CH3 область» или «домен CH3», используемый здесь, относится к области CH3 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, CH3 область антитела IgG1 человека соответствует аминокислотам 341-447 согласно нумерации ЕС. Однако CH3 область также может быть любым из других подтипов, описанных в настоящем документе.

Ссылка на положения аминокислот в Fc-участке/домене Fc в настоящем изобретении соответствует нумерации ЕС (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - 1991 NIH Publication No. 91-3242).

Как указано выше, используемый здесь термин антитело, если не указано иное или явно не противоречит контексту, охватывает фрагменты антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Известно, что антигенсвязывающую функцию антитела могут выполнять фрагменты полноразмерного антитела. Примеры антигенсвязывающих фрагментов, охватываемых термином «антитело», включают: (i) Fab'- или Fab-фрагмент, т.е. моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или моновалентное антитело, как описано в публикации заявки WO 2007/059782; (ii) фрагменты F(ab')₂, т.е. двухвалентные фрагменты, содержащие два фрагмента Fab, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий по существу из доменов VH и CH1; и (iv) Fv-фрагмент, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела. Более того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с помощью рекомбинантных методов синтетическим линкером, что позволяет сделать их единой белковой цепью, в которой области VL и VH образуют пары с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), см., например, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) и Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)).

Такие одноцепочечные антитела также охватываются термином антитело, если иное не указано или не следует из контекста. Хотя такие фрагменты обычно включаются в определение антитела, они вместе и каждый из них независимо являются уникальными признаками настоящего изобретения, проявляя различные биологические свойства и применимость. Термин антитело, если не указано иное, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb), химерные антитела и гуманизированные антитела, а также фрагменты антител, полученные любым известным способом, таким как ферментативное расщепление, синтез пептидов и рекомбинантные методы.

В некоторых вариантах выполнения изобретения в антителах по изобретению первая антигенсвязывающая область или антигенсвязывающая область, или обе, представляют собой однодоменное антитело. Однодоменные антитела (sdAb, также называемые Nanobody® или VHH) хорошо известны специалистам в данной области, см., например, Hamers-Casterman et al. (1993) *Nature* 363:446, Roovers et al. (2007) *Curr Opin Mol Ther* 9:327 и Krah et al. (2016) *Immunopharmacol Immunotoxicol* 38:21. Однодоменные антитела содержат одну CDR1, одну CDR2 и одну CDR3 области. Примерами однодоменных антител являются вариабельные фрагменты антител, содержащих только тяжелые цепи, антитела, которые в природе не содержат легких цепей, однодоменные антитела, полученные из обычных антител, и сконструированные антитела. Однодоменные антитела могут быть получены от любых видов, включая мышь, человека, верблюда, ламу, акулу, козу, кролика и корову. Например, встречающиеся в природе молекулы VHH могут быть получены из антител, вырабатываемых видами Camelidae, например, верблюда, одногорбого верблюда, ламы, альпаки и гуанако. Подобно целому антителу, однодоменное антитело способно избирательно связываться со специфическим антигеном. Однодоменные антитела могут содержать только вариабельный домен цепи иммуноглобулина, т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 области, и каркасные области.

Термин «иммуноглобулин», используемый здесь, относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, причем все четыре могут быть соединены между собой дисульфидными связями. Термин «тяжелая цепь иммуноглобулина», «тяжелая цепь иммуноглобулина» или «тяжелая цепь», используемый здесь, относится к одной из цепей иммуноглобулина. Тяжелая цепь обычно состоит из

вариабельной области тяжелой цепи (обозначенной здесь VH) и константной области тяжелой цепи (обозначенной здесь CH), которые определяют изотип иммуноглобулина. Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Константная область тяжелой цепи дополнительно содержит шарнирную область. В структуре иммуноглобулина (например, IgG) две тяжелые цепи связаны между собой дисульфидными связями в шарнирной области. Как и тяжелые цепи, каждая легкая цепь обычно состоит из нескольких участков: вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Кроме того, области VH и VL могут быть подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или образовывать структурно определенные петли), также называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемые каркасными областями (FR). Каждая область VH и VL обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Последовательности CDR могут быть охарактеризованы различными способами, например способами, описанными в публикации Choitia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901 или в монографии Kabat et al. (1991) *Sequence of protein of immunological interest*, fifth edition. NIH publication. Различные методы охарактеризования CDR и нумерации аминокислот можно сравнить на сайте www.abysis.org (UCL).

Используемый здесь термин «изотип» относится к (под)классу иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM) или любому его аллотипу, такому как IgG1m(za) и IgG1m(f), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Каждый изотип тяжелой цепи может быть объединен либо с каппа (κ) легкой цепью, либо с лямбда (λ) легкой цепью. Антитело по изобретению может иметь любой изотип.

Термин «исходное антитело» следует понимать как антитело, идентичное антителу по изобретению, но отличающееся тем, что исходное антитело не имеет ни одной или нескольких из указанных мутаций. «Вариант» или «вариант антитела» или «вариант исходного антитела» по изобретению представляет собой молекулу антитела, которая содержит одну или несколько мутаций по сравнению с «исходным антителом».

Аминокислотные замены могут заменять нативную аминокислоту на другую встречающуюся в природе аминокислоту или на аминокислотное производное неприродного происхождения. Аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной. В контексте настоящего изобретения консервативные замены могут быть определены заменами в пределах классов аминокислот, как показано в одной или нескольких из следующих трех таблиц:

Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Кислотные остатки	Asp (D) and Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R) и His (H)
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (S), Thr (T), Asn (N) и Gln (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M) и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W)

Альтернативные классы аминокислотных остатков для консервативных замен

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Остатки, содержащие спиртовые группы	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Остатки, ассоциированные с циклоалкенилом	F, H, W и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y

Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Маленькие остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V
Очень маленькие остатки	A, G и S
Остатки, участвующие в образовании поворотов	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, N, D, E и R

В контексте настоящего изобретения замена в варианте обозначается как:

исходная аминокислота - положение - аминокислота замены;

Для обозначения аминокислотных остатков здесь используется трехбуквенный код или однобуквенный код, включая коды Хаа и X. Соответственно, обозначение «Т366W» означает, что вариант содержит замену треонина на триптофан в положении аминокислоты варианта, соответствующем аминокислоте в положении 366 исходного антитела.

Кроме того, термин «замена» включает замену любой из других девятнадцати природных аминокислот или других аминокислот, таких как неприродные аминокислоты. Например, замена аминокислоты Т в положении 366 включает каждую из следующих замен: 366А, 366С, 366D, 366G, 366H, 366F, 366I, 366K, 366L, 366M, 366N, 366P, 366Q, 366R, 366S, 366E., 366В, 366Вт и 366У.

Термин «полноразмерное антитело» при использовании здесь относится к антителу, которое содержит все константные и переменные домены тяжелой и легкой цепи, соответствующие тем, которые обычно представлены в антителе дикого типа этого изотипа.

Термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором переменная область получена от вида, отличного от человека (например, получена от грызунов), а константная область получена от другого вида, такого как человек. Химерные антитела могут быть получены с помощью генной инженерии. Химерные моноклональные антитела для терапевтического применения разработаны для снижения иммуногенности антител.

Термин «гуманизированное антитело» относится к генетически сконструированному антителу, не встречающегося у человека, которое содержит константные домены антитела человека и переменные домены, которые не встречаются у человека, модифицированные таким образом, чтобы обеспечить высокий уровень гомологии последовательностей с переменными доменами человека. Этого можно достичь путем переноса шести определяющих комплементарность областей (CDR) антител, не встречающихся у человека, которые вместе образуют сайт связывания антигена, на гомологичную акцепторную каркасную область (FR) человека. Чтобы полностью восстановить аффинность связывания и специфичность исходного антитела, может потребоваться замена остатков каркаса исходного антитела (т.е. антитела, не встречающихся у человека) каркасными областями человека (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые важны для связывающих свойств антитела. Таким образом, гуманизированное антитело может содержать последовательности CDR, не встречающиеся у человека, в первую очередь каркасные области человека, необязательно содержащие одну или несколько аминокислотных обратных мутаций в аминокислотной последовательности, которые не встречаются у человека, и, необязательно, полностью человеческие константные области. При этом необязательно могут быть введены дополнительные аминокислотные модификации, которые не обязательно являются обратными мутациями, для получения гуманизированного антитела с предпочтительными характеристиками, такими как аффинность и биохимические свойства. Гуманизацию терапевтических антител, которые не встречаются у человека, осуществляют для сведения к минимуму их иммуногенности у человека, при этом такие гуманизированные антитела в то же время сохраняют специфичность и связывающую аффинность антитела, которое не встречается у человека.

Термин «мультиспецифическое антитело» относится к антителу, обладающему специфичностью по меньшей мере к двум различным, таким как по меньшей мере трем, как правило, неперекрывающимся эпитопам. Такие эпитопы могут быть на одном и том же или на разных антигенах-мишенях. Если эпитопы находятся на разных мишенях, такие мишени могут быть на одной и той же клетке или на разных клетках или типах клеток.

Термин «биспецифическое антитело» относится к антителу, обладающему специфичностью в отношении двух разных, как правило, неперекрывающихся эпитопов. Такие эпитопы могут быть на одной и той же или на разных мишенях. Если эпитопы находятся на разных мишенях, такие мишени могут быть на одной и той же клетке или на разных клетках или типах клеток.

Примеры различных классов биспецифических антител включают, но не ограничиваются ими, (i) IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами СН3 для обеспечения гетеродимеризации; (ii) рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием, где каждая из двух сторон молекулы содержит Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента по меньшей мере двух разных антител; (iii) слитые молекулы IgG, в которых полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; (iv) слитые молекулы Fc, где одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, Fc-участками или их частями; (v) слитые молекулы Fab, в которых различные Fab-фрагменты слиты вместе, слиты с константными доменами тяжелой цепи, Fc-участками или их частями; и (vi) антитела на основе ScFv и диатела и антитела с тяжелой цепью (например, доменные антитела, нанотела (Nanobodies®)), в которых разные одноцепочечные молекулы Fv или разные диатела или разные антитела с тяжелой цепью (например, доменные антитела, нанотела (Nanobodies®)) слиты с каждой другой или с другим белком или молекулой-носителем, слитой с константными доменами тяжелой цепи, Fc-участками или их частями.

Примеры IgG-подобных молекул с комплементарными молекулами доменов СН3 включают, но без ограничения, Triomab® (Trion Pharma/Fresenius Biotech), молекулы со структурой (выступ-во-впадину) (Knobs-into-Holes (Genentech)), CrossMAb (Roche) и электростатически соединенные молекулы (Amgen, Chugai, Oncomed), LUZ-Y (Genentech, Wranik et al. J. Biol. Chem. 2012, 287(52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1), DIG-body и PIG-body (Pharmabcine, WO 2010/134666, WO 2014/081202), антитела с модифицированным путем обмена цепями доменом (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonics (Merus, WO 2013/157953), FcΔAdp (Regeneron), биспецифические IgG1 и IgG2 (Pfizer/Rinat), антитела с асимметрическим каркасом (Zymeworks/Merck), mAb-Fv (Xencor), двухвалентные биспецифические антитела (Roche, WO 2009/080254) и молекулы DuoBody® (Genmab).

Примеры рекомбинантных IgG-подобных молекул с двойным нацеливанием включают, но без ограничения, (DT)-Ig с двойным нацеливанием (GSK/Domantis, WO 2009/058383), антитело «два в одном» (Genentech, Bostrom, et al. 2009. Science 323, 1610-1614), перекрестно-сшитые моноклональные антитела (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star), Zybodyes™ (Zyngenia, LaFleur et al. MAbs. 2013 Mar-Apr;5(2):208-18), антитела с общими легкими цепями, κλBodies (NovImmune, WO 2012/023053) и CovX-body® (CovX/Pfizer, Doppalapudi, VR, et al. 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 501-506).

Примеры слитых молекул IgG включают, но без ограничения, антитела с двойным переменным доменом (DVD)-Ig (Abbott), двухдоменные антитела с двойной головкой (Unilever; Sanofi Aventis), IgG-подобные биспецифические (ImClone/Eli Lilly, Lewis et al. Nat. Biotechnol. 2014 Feb;32(2):191-8), Ts2Ab (MedImmune/AZ, Dimasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30;393(3):672-92) и BsAb (Zymogenetics, WO 2010/111625), HERCULES (Biogen Idec), слитый scFv (Novartis), слитый scFv (Changzhou Adam Biotech Inc) и TvAb (Roche).

Примеры слитых молекул Fc включают, но без ограничения, продукты слияния ScFv/Fc (Academic Institution, Pearce et al. Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep; 42(6):1179), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, et al. 100th Annual Meeting AACR 2009 (Abstract № 5465), Zymogenetics/BMS, WO 2010/111625, антитела с двойной аффинностью, полученные технологией перенацеливания (Fc-DARTTM) (MacroGenics) и Dual(ScFv)2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine, Китай).

Примеры биспецифических антител со слиянием Fab включают, но без ограничения, F(ab)2 (Medarex/AMGEN), Fab с двойным действием или Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock® (DNL) (ImmunoMedics), бивалентные биспецифические антитела (Biotecnol) и Fab-Fv (UCB-Celltech).

Примеры антител, которые основаны на ScFv, диател и доменных антител включают, но без ограничения, биспецифический рекрутер Т-клеток (BiTE®) (Micromet, Tandem Diabody (Tandab) (Affimed), антитела с двойной аффинностью, полученные технологией перенацеливания (DARTTM) (MacroGenics), одноцепочечные антитела (Academic, Lawrence FEBS Lett. 1998 Apr 3;425(3):479-84), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), продукт слияния ScFv и альбумина сыворотки человека (Merrimack, WO 2010/059315) и молекулы COMBODY (Epigen Biotech, Zhu et al. Immunol Cell Biol. 2010

Aug;88(6):667-75), нанотела с двойным нацеливанием, nanobodies® (Ablynx, Hmila et al., FASEB J. 2010), антитела с двойным нацеливанием с доменом только тяжелой цепи.

Термины «связывает» или «специфически связывает» в контексте связывания антитела с антигеном относятся к связыванию антитела с заранее определенным антигеном или мишенью (например, PSMA человека или Vδ2), с которым связывание обычно происходит с аффинностью, соответствующей значению K_D равному приблизительно 10^{-6} М или менее, например, 10^{-7} М или менее, например, приблизительно 10^{-8} М или менее, например, приблизительно 10^{-9} М или менее, приблизительно 10^{-10} М или менее, или приблизительно 10^{-11} М или даже менее, определенное, например, с использованием метода проточной цитометрии, как описано в Примерах. Альтернативно, кажущиеся значения K_D могут быть определены с использованием, например, технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIAcore T200 с использованием антигена в качестве лиганда и связывающего фрагмента или связывающей молекулы в качестве аналита. Специфическое связывание означает, что антитело связывается с заданным антигеном с аффинностью, соответствующей значению K_D , которое по меньшей мере в десять раз меньше, например, по меньшей мере в 100 раз меньше, например, по меньшей мере в 1000 раз меньше, например, по меньшей мере в 10000 раз меньше, например, по меньшей мере в 100000 раз меньше, чем аффинность его связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от заданного антигена или близкородственного антигена. Степень снижения аффинности зависит от K_D связывающего фрагмента или связывающей молекулы, и поэтому, когда значение K_D для связывающего фрагмента или связывающей молекулы является очень низким (то есть связывающий фрагмент или связывающая молекула высоко специфичными), то степень снижения аффинности к антигену ниже, по сравнению с аффинностью к неспецифическому антигену, и снижение может быть по меньшей мере 10000-кратным. Термин « K_D » (М), используемый здесь, относится к константе равновесия диссоциации определенного взаимодействия между антигеном и связывающим фрагментом или связывающей молекулой.

В контексте настоящего изобретения термины «конкуренция» или «способность конкурировать» или «конкурирует» относятся к любому обнаруживаемому значительному снижению склонности конкретной связывающей молекулы (например, антитела к PSMA)

связываться с конкретным партнером по связыванию (например, к PSMA) в присутствии другой молекулы (например, другого антитела к PSMA), которая связывает партнера по связыванию. Как правило, конкуренция означает снижение связывания по меньшей мере приблизительно на 25%, например, по меньшей мере приблизительно на 50%, например, по меньшей мере приблизительно на 75%, например, по меньшей мере на 90% снижения связывания, вызванное присутствием другой молекулы, такой как антитело, определенное, например, с помощью анализа ELISA или проточной цитометрии с использованием достаточных количеств двух или более конкурирующих молекул, например антител. Дополнительные методы определения специфичности связывания путем конкурентного ингибирования описаны, например, в следующих документах: Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988), Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc, and Wiley InterScience N. Y., (1992, 1993) и Muller, *Meth. Enzymol.* 92, 589-601 (1983). В одном варианте выполнения настоящего изобретения антитело по изобретению связывается с тем же эпитопом на PSMA, что и антитело LV1050, и/или с тем же эпитопом на V δ 2, что и антитело 5C8 или 6H4. Способы определения эпитопа связывающей молекулы, такой как антитело, в данной области известны.

Термины «первая» и «вторая» антигенсвязывающие области, используемые здесь, не относятся к их ориентации/положению в антителе, т.е. они не имеют значения в отношении N- или C-конца. Термины «первый» и «второй» служат только для правильного и последовательного обозначения двух разных антигенсвязывающих областей, указанных в формуле изобретения и в описании.

Выражение «способный связывать V γ 9V δ 2-TCR» означает, что связывающая молекула может связывать V γ 9V δ 2-TCR, но не исключает, что связывающая молекула связывается с одной из отдельных субъединиц в отсутствие другой субъединицы, то есть только с цепью V γ 9 или только с цепью V δ 2. Например, антитело 5C8 представляет собой антитело, которое связывает V γ 9V δ 2-TCR, но также связывает цепь V δ 2, когда цепь V δ 2 экспрессируется отдельно. Это выражение также не исключает того, что антитело специфично в отношении комбинации двух цепей.

Термин «% идентичности последовательности», когда он используется здесь, относится к числу идентичных положений нуклеотидов или аминокислот, общих для

различных последовательностей (т.е. % идентичности = количество идентичных положений / общее количество положений $\times$ 100), принимая во внимание количество промежутков и длину каждого промежутка, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания. Процентная идентичность между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями может быть определена, например, с использованием алгоритма, описанного в E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988), который включен в программу ALIGN (версия 2.0) с использованием таблицы весов остатков PAM120, штрафа за промежуток длиной 12 и штрафа за промежуток длиной 4.

Дополнительные аспекты и варианты выполнения настоящего изобретения

Как описано выше, в первом основном аспекте настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему первую антигенсвязывающую область, способную связывать PSMA человека, и вторую антигенсвязывающую область, способную связывать V γ 9V δ 2 рецептор Т-клеток человека.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело. В другом варианте выполнения настоящего изобретения первая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело. В другом варианте выполнения настоящего изобретения вторая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело. В другом варианте выполнения настоящего изобретения как первая область связывания антиген-антиген, так и вторая область связывания антигена представляют собой однодоменные антитела. В другом варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело, в котором первая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело, а вторая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело,

В одном варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело конкурирует (т.е. способно конкурировать) за связывание с PSMA человека с антителом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и предпочтительно мультиспецифическое антитело связывает тот же самый эпитоп на PSMA человека, что и антитело, имеющее последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело связывается с эпитопом на PSMA человека, который содержит один, несколько или все из следующих аминокислотных остатков: R190, S197, R204, S317, R320, S322, K324, H618, S631, K729, R730 и Y733, где нумерация соответствует последовательности UniProt Q04609-1. В другом варианте выполнения настоящего изобретения первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, представленную в SEQ ID NO: 14, последовательность CDR2 VH, представленную в SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR3 VH, представленную в SEQ ID NO: 16.

В другом варианте выполнения настоящего изобретения первая антигенсвязывающая область является гуманизированной, и при этом предпочтительно, что первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из:

- последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, или
- последовательности, которая по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 92%, например по меньшей мере на 94%, например по меньшей мере на 96%, например по меньшей мере на 98% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

Как указано выше, мультиспецифическое антитело по изобретению содержит вторую антигенсвязывающую область, способную связывать рецептор V γ 9V δ 2 Т-клеток человека. В одном варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело способно активировать V γ 9V δ 2 Т-клетки человека. Активацию V γ 9V δ 2 Т-клеток можно измерить по профилям экспрессии генов и/или экспрессии (поверхностных) маркеров (например, маркеров активации, таких как CD25, CD69 или CD107a) и/или секреторных белков (например, цитокинов или хемокинов). В предпочтительном варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело способно индуцировать активацию (например, усиление экспрессии CD69 и/или CD25), приводящую к дегрануляции, характеризующейся увеличением экспрессии CD107a (см., например, Пример 5) и/или продукции цитокинов (например, TNF α , IFN γ) V γ 9V δ 2 Т-клетками. Предпочтительно, когда мультиспецифическое антитело по изобретению способно увеличивать количество клеток, положительных в отношении CD107a, по меньшей мере в 2 раза, например, по меньшей мере в 5 раз, при тестировании, как описано здесь в Примере 5. В другом предпочтительном варианте выполнения настоящего

изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению характеризуется величиной значения EC_{50} для увеличения процентной доли CD107a-положительных клеток, равной 50 пМ или менее, например 25 пМ или менее, например 20 пМ или менее, например 15 пМ или менее, например 10 пМ или менее, или даже 5 пМ или менее, например, равной 2 пМ или менее, или 1 пМ или менее, при тестировании антитела с использованием $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток и клеток-мишеней LNCaP, как описано здесь в Примере 5.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению способно связываться с $V\delta 2$ человека. $V\delta 2$ является частью дельта-цепи $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR. Антитело, способное связываться с $V\delta 2$ человека, может связывать эпитоп, полностью расположенный в области $V\delta 2$, или связывать эпитоп, представляющий собой комбинацию остатков в области $V\delta 2$ и константной области дельта-цепи. В другом варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело способно связываться с $V\gamma 9$ человека. $V\gamma 9$ является частью гамма-цепи $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR. Антитело, способное связываться с $V\gamma 9$ человека, может связывать эпитоп, полностью расположенный в области $V\gamma 9$, или связывать эпитоп, представляющий собой комбинацию остатков в области $V\gamma 9$ и константной области гамма-цепи. Несколько таких антител, которые связываются с $V\delta 2$ или $V\gamma 9$, были описаны в публикации заявки WO 2015/156673, и их антигенсвязывающие области, и по меньшей мере их CDR-последовательности, могут быть включены в мультиспецифическое антитело по изобретению. Другими примерами антител, из которых может быть получена область связывания $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR, являются антитела 7A5 TCR $V\gamma 9$ (ThermoFisher) (Oberg et al. (2014) Cancer Res 74:1349), и антитела B1.1 (ThermoFisher) и 5A6.E9. (ATCC HB 9772), описанные в публикации Neuman et al. (2016) J Med Prim 45:139.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело конкурирует за связывание с $V\delta 2$ человека с антителом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или конкурирует за связывание с $V\delta 2$ человека с антителом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20. В другом варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело связывает тот же эпитоп на $V\delta 2$ человека, что и антитело, имеющее последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или связывает тот же эпитоп на $V\delta 2$ человека, что и антитело, имеющее последовательность, представленную в SEQ ID NO:

20.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения в мультиспецифическом антителе по изобретению вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, представленную в SEQ ID NO: 17, последовательность CDR2 VH, представленную в SEQ ID NO: 18, и последовательность CDR3 VH, представленную в SEQ ID NO: 19, или она содержит последовательность CDR1 VH, представленную в SEQ ID NO: 21, последовательность CDR2 VH, представленную в SEQ ID NO: 22, и последовательность CDR3 VH, представленную в SEQ ID NO: 23.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения вторая антигенсвязывающая область мультиспецифического антитела по изобретению является гуманизированной.

В другом варианте выполнения настоящего изобретения вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из

- последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, или
- последовательности, которая по меньшей мере на 90 %, например по меньшей мере на 92 %, например по меньшей мере на 94 %, например по меньшей мере на 96 %, например по меньшей мере на 98 % идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения в мультиспецифическом антителе по изобретению первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, представленную в SEQ ID NO: 14, последовательность CDR2 VH, представленную в SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR3 VH, представленную в SEQ ID NO: 16, и где вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, представленную в SEQ ID NO: 17, последовательность CDR2 VH, представленную в SEQ ID NO: 18, и последовательность CDR3 VH, представленную в SEQ ID NO: 19.

В другом варианте выполнения настоящего изобретения в мультиспецифическом антителе по изобретению первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, представленную в SEQ ID NO: 14, последовательность CDR2 VH, представленную в SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR3 VH, представленную в SEQ ID NO: 15. в SEQ ID NO: 16, и где вторая антигенсвязывающая

область содержит последовательность CDR1 VH, представленную в SEQ ID NO: 21, последовательность CDR2 VH, представленную в SEQ ID NO: 22, и последовательность CDR3 VH, представленную в SEQ ID NO: 23.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению способно опосредовать гибель клеток, экспрессирующих PSMA, например, клеток LNCaP, клеток 22Rv1 или клеток VCaP, посредством активации $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток. Предпочтительно, когда антитело способно индуцировать гибель клеток LNCaP путем активации $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток с величиной EC_{50} равной 50 пМ или менее, например 25 пМ или менее, например 20 пМ или менее, например 15 пМ или менее, например 10 пМ или менее, или даже 5 пМ или менее, например 2 пМ или менее, или 1 пМ или менее, при тестировании, как описано здесь в Примере 6.

В другом варианте выполнения настоящего изобретения антитело способно индуцировать гибель клеток LNCaP, 22Rv1 или VCaP посредством активации $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток с величиной EC_{50} равной 50 пМ или менее, например 25 пМ или менее, например 20 пМ или менее, например 15 пМ или менее, при тестировании через 24 часа, как описано здесь в Примере 13, предпочтительно при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням как 1:1, так и 1:10.

В другом варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению способно связываться с клетками PSMA-положительной клеточной линией рака предстательной железы LNCaP с величиной EC_{50} равной 50 нМ или менее, например 20 нМ или менее, например 10 нМ или менее, при тестировании, как описано здесь в Примере 7. В другом варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению способно связываться с $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клетками с величиной EC_{50} равной 10 нМ или менее, например 5 нМ или менее, например 2 нМ или менее, при тестировании, как описано здесь в Примере 7. В другом варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению способно связываться с рекомбинантным белком PSMA человека со значением K_D , равным 100 нМ или менее, например 50 нМ или менее, при тестировании, как описано здесь в Примере 11. В другом варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению способно связываться с $V\gamma 9V\delta 2$ -Fc человека со значением K_D , равным 10 нМ или менее, например 5 нМ или менее, например

2 нМ или менее, например 1 нМ или менее, при тестировании, как описано здесь в Примере 11.

В другом варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело способно опосредовать гибель клеток, экспрессирующих PSMA человека, у пациента с раком предстательной железы. Гибель клеток, экспрессирующих PSMA человека, у пациента с раком предстательной железы можно определить, например, как описано здесь в Примере 10. В одном варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению способно опосредовать специфическую гибель клеток более чем на 25%, например более чем на 50%, при концентрации 50 нМ, с помощью анализов, описанных здесь в Примере 10 или в Примере 14.

В другом варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело не способно опосредовать гибель PSMA-отрицательных клеток, таких как PSMA-отрицательные клетки человека. В другом варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело не индуцирует IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 или TNF α в цельной крови здоровых доноров в концентрациях до 280 нМ, при тестировании, описанном здесь в Примере 16. В другом варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело индуцирует более чем в 10 раз меньше IL-8 и/или более чем в 50 раз меньше IFN γ , чем Campath®, в цельной крови здоровых доноров при тестировании, описанном здесь в Примере 16.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения первая антигенсвязывающая область и вторая антигенсвязывающая область ковалентно связаны друг с другом через пептидный линкер, например линкером, имеющим длину из от 1 до 20 аминокислот, например от 1 до 10 аминокислот, в частности, из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 10 аминокислот. В одном варианте выполнения настоящего изобретения пептидный линкер содержит или состоит из последовательности GGGGS, представленной в SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первая антигенсвязывающая область, способная связывать PSMA человека, расположена на N-конце второй антигенсвязывающей области, способной связывать V γ 9V δ 2 Т-клеточный рецептор человека.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело дополнительно содержит домен продления периода полужизни. В одном

варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело при его введении человеку имеет конечный период полужизни, превышающий приблизительно 168 часов. Наиболее предпочтительно, когда конечный период полужизни составляет 336 часов или более. Термин «конечный период полужизни» антитела, используемый здесь, относится к времени, необходимому для снижения концентрации полипептида в сыворотке на 50% в конечной фазе элиминации *in vivo*.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело содержит Fc-участок. В данной области техники описаны различные способы получения биспецифических антител, например, в обзоре Brinkmann and Kontermann (2017) MAbs 9:182. В одном варианте выполнения настоящего изобретения Fc-участок представляет собой гетеродимер, содержащий два полипептида Fc, где первая антигенсвязывающая область слита с первым полипептидом Fc, а вторая антигенсвязывающая область слита со вторым полипептидом Fc, и где первый и второй полипептиды Fc содержат асимметричные аминокислотные мутации, которые благоприятствуют образованию гетеродимеров вместо образования гомодимеров (см., например, Ridgway et al. (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng 9:617). В другом варианте выполнения настоящего изобретения области CH3 полипептидов Fc содержат указанные асимметричные аминокислотные мутации, и предпочтительно, когда первый полипептид Fc содержит замену T366W, а второй полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, или наоборот, где положения аминокислот соответствуют положениям в IgG1 человека в соответствии с системой нумерации ЕС. В другом варианте выполнения настоящего изобретения цистеиновые остатки в положении 220 в первом и втором полипептидах Fc deletированы или заменены, где аминокислотное положение соответствует положениям в IgG1 человека в соответствии с системой нумерации ЕС. В другом варианте выполнения настоящего изобретения участок содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения первый и/или второй полипептиды Fc содержат мутации, которые делают антитело инертным, т.е. неспособным опосредовать эффекторные функции. В одном варианте выполнения настоящего изобретения первый и второй полипептиды Fc содержат мутацию в положении

234 и/или 235, и предпочтительно, когда первый и второй полипептид Fc содержат замены L234F и L235E, где положения аминокислот соответствуют положениям в IgG1 человека в соответствии с системой нумерации ЕС.

В предпочтительном варианте выполнения настоящего изобретения первая антигенсвязывающая область содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, а вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и

- первый полипептид Fc содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, а второй полипептид Fc содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, или

- первый полипептид Fc содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, а второй полипептид Fc содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

В другом варианте выполнения настоящего изобретения антитело содержит или состоит из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26.

В еще одном основном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей мультиспецифическое антитело по изобретению, как описано здесь, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Антитела могут быть объединены с фармацевтически приемлемыми эксципиентами в соответствии с общепринятыми методами, такими как описанные в Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, June 2012 г., ISBN 9780857110275. Фармацевтически приемлемый эксципиент, а также любые другие носители, разбавители или адъюванты должны подходить для антител и выбранного способа введения. Пригодность эксципиентов и других компонентов фармацевтических композиций определяется на основании отсутствия значимого негативного влияния на желаемые биологические свойства выбранного антитела или фармацевтической композиции по изобретению (например, менее чем существенное воздействие (относительное ингибирование 10% или менее, относительное ингибирование 5% или менее и т.д. при связывании антигена).

Фармацевтическая композиция может включать разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионогенный детергент, такой как Tween-20 или Tween-

80), стабилизаторы (например, сахара или аминокислоты, не содержащие белков), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию. Другие фармацевтически приемлемые эксципиенты включают любые и все подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты, антиоксиданты и замедляющие абсорбцию агенты и т.п., которые физиологически совместимы с антителом по изобретению.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит мультиспецифическое антитело по изобретению (предпочтительно антитело, содержащее Fc-участок), буфер и антиоксидант, и при этом pH композиции составляет от 5,4 до 7,4, например от 5,4 до 6,1.

В другом варианте выполнения настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит мультиспецифическое антитело по изобретению, буфер и метионин, и при этом pH композиции составляет от 5,4 до 7,4, например от 5,4 до 6,1.

В другом варианте выполнения настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит мультиспецифическое антитело по изобретению, буфер, сахарозу, полисорбат 80 и метионин, при этом pH композиции составляет от 5,4 до 7,4, например от 5,4 до 6,1.

В другом варианте выполнения настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит мультиспецифическое антитело по изобретению, гистидиновый или ацетатно-натриевый буфер, сахарозу, полисорбат 80 и метионин, и при этом pH композиции составляет от 5,4 до 7,4, например от 5,4 до 6,1.

Предпочтительно, когда концентрация буфера составляет от 5 до 25 mM, например 10 mM. Предпочтительно, когда концентрация сахарозы составляет от 100 до 500 mM, например от 250 mM до 300 mM, например 280 mM. Предпочтительно, когда концентрация полисорбата 80 составляет от 0,005% до 0,1%, например от 0,01% до 0,05%, например 0,02%. Предпочтительно, когда концентрация метионина составляет от 0,2 mM до 5 mM, например от 0,5 mM до 2 mM, например 1 mM. Предпочтительно, когда мультиспецифическое антитело в композиции содержит Fc-участок.

Таким образом, в предпочтительном варианте выполнения настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит мультиспецифическое антитело по изобретению,

содержащее Fc-участок, гистидиновый или ацетатно-натриевый буфер, сахарозу, полисорбат 80 и метионин, и при этом pH композиции составляет от 5,4 до 7,4, например от 5,4 до 6,1.

Таким образом, в еще одном предпочтительном варианте выполнения настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит мультиспецифическое антитело по изобретению, содержащее Fc-участок, 10М гистидиновый или натрий-ацетатный буфер, 280 мМ сахарозы, 0,02% полисорбата 80 и 1 мМ метионина, и при этом pH композиции составляет 5,5 или 6,0.

Предпочтительно, когда Fc-участок представляет собой гетеродимер, содержащий два Fc-полипептида, где первая антигенсвязывающая область слита с первым Fc-полипептидом, а вторая антигенсвязывающая область слита со вторым Fc-полипептидом, и где первый и второй Fc-полипептиды включают асимметричные аминокислотные мутации, которые благоприятствуют образованию гетеродимеров, по сравнению с образованием гомодимеров. Предпочтительно, когда СНЗ области полипептидов Fc содержат указанные асимметричные аминокислотные мутации, и при этом предпочтительно, когда первый полипептид Fc содержит замену T366W, а второй полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, или наоборот. Кроме того, предпочтительно, чтобы цистеиновые остатки в положении 220 в первом и втором полипептидах Fc были делетированы или заменены, и/или первый и второй полипептиды Fc дополнительно содержали мутацию в положении 234 и/или 235, и предпочтительно, когда первый и второй Fc полипептид содержат замену L234F и L235E.

Кроме того, предпочтительно, когда мультиспецифическое антитело в композиции содержит первую антигенсвязывающую область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, вторую антигенсвязывающую область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и

- первый полипептид Fc содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, а второй полипептид Fc содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, или

- первый полипептид Fc содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, а второй полипептид Fc содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13,

и фармацевтическая композиция содержит 10М гистидиновый или ацетатно-натриевый буфер, 280 мМ сахарозы, 0,02% полисорбата 80 и 1 мМ метионина, и при этом рН композиции составляет 5,5 или 6,0. Предпочтительно, когда концентрация антитела составляет от 0,1 мг/мл до 20 мг/мл, например от 0,1 до 10 мг/мл, например от 0,5 мг/мл до 2 мг/мл, например 1 мг/мл.

В еще одном основном аспекте настоящее изобретение относится к мультиспецифическим антителам по изобретению, описанным здесь, для применения в качестве лекарственного средства.

Мультиспецифическое антитело по изобретению позволяет создать микроокружение, способствующее гибели опухолевых клеток, в частности PSMA-положительных опухолевых клеток, за счет действия V γ 9V δ 2 Т-клеток.

Соответственно, в предпочтительном варианте настоящего изобретения мультиспецифическое антитело предназначено для применения при лечении рака. В еще одном предпочтительном варианте настоящего изобретения мультиспецифическое антитело предназначено для применения при лечении рака предстательной железы, такого как метастатический или неметастатический рак предстательной железы. В другом варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело предназначено для лечения рака, при котором PSMA экспрессируется в опухолевых новообразованиях или в опухолеассоциированных эндотелиальных клетках первичных или метастатических опухолей, включая колоректальный рак, рак легкого, рак молочной железы, рак эндометрия и рак яичников, рак желудка, почечно-клеточный рак, уротелиальный рак, гепатоцеллюлярный рак, плоскоклеточный рак полости рта, опухоли щитовидной железы и глиобластомы. В другом варианте выполнения настоящего изобретения мультиспецифическое антитело предназначено для лечения аденоиднокистозной карциномы головы и шеи.

Аналогично, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, предусматривающему введение мультиспецифического антитела по изобретению, описанному здесь, человеку, нуждающемуся в этом. В одном варианте выполнения настоящего изобретения заболевание представляет собой рак, такой как рак предстательной железы, например, метастатический или неметастатический рак предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело вводят в виде монотерапии. Однако антитела по изобретению можно также вводить в рамках комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими терапевтическими агентами, релевантными в отношении заболевания или состояния, подлежащего лечению.

Термин «лечение», используемый здесь, относится к введению эффективного количества антитела по изобретению с целью облегчения, ослабления, купирования, устранения (излечения) или предотвращения симптомов или болезненных состояний. «Эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Эффективное количество полипептида, такого как антитело, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст, пол и масса индивидуума, а также от способности антитела вызывать желаемый ответ у индивидуума. Эффективным количеством также является такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела перевешиваются терапевтически полезными эффектами. В качестве примера, неограничивающий диапазон эффективного количества антитела по настоящему изобретению составляет приблизительно от 0,1 мг / кг до 100 мг/кг, например приблизительно от 1 мг / кг до 50 мг/кг, например приблизительно от 0,01 до 20 мг/кг, например приблизительно от 0,1 до 10 мг/кг, и, например, приблизительно 0,5, приблизительно 0,3, приблизительно 1, приблизительно 3, приблизительно 5 или приблизительно 8 мг/кг. Введение можно осуществлять любым подходящим путем, обычно парентеральным, например внутривенным, внутримышечным или подкожным.

Мультиспецифические антитела по изобретению обычно получают рекомбинантно, т.е. путем экспрессии конструкций нуклеиновых кислот, кодирующих антитела, в подходящих клетках-хозяевах, с последующей очисткой полученного рекомбинантного антитела, выделенного из клеточной культуры. Конструкции нуклеиновой кислоты могут быть получены стандартными методами молекулярной биологии, хорошо известными в данной области. Конструкции обычно вводят в клетку-хозяина с использованием вектора экспрессии. Подходящие конструкции нуклеиновых кислот и векторы экспрессии известны в данной области. Клетки-хозяева, подходящие для рекомбинантной экспрессии антител, хорошо известны в данной области, и они включают клетки CHO, HEK-293, Expi293F, PER-C6, NS/0 и Sp2/0.

Соответственно, в следующем аспекте настоящее изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей мультиспецифическое антитело по изобретению. В одном варианте выполнения настоящего изобретения конструкция представляет собой ДНК-конструкцию. В другом варианте выполнения настоящего изобретения конструкция представляет собой РНК-конструкцию.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую мультиспецифическое антитело по изобретению.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, т.е. к рекомбинантной клетке-хозяину, такой как клетка-хозяин млекопитающего, предпочтительно клетке CHO, содержащей одну или несколько конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих мультиспецифическое антитело по изобретению, или вектор экспрессии, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую мультиспецифическое антитело по изобретению.

Соответственно, в следующем аспекте настоящее изобретение относится к получению мультиспецифического антитела по изобретению, предпочтительно мультиспецифического антитела по изобретению, содержащего Fc-участок, путем экспрессии или коэкспрессии одной или нескольких конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих мультиспецифическое антитело в подходящей клетке-хозяине, такой как клетка-хозяин млекопитающего, например в клетке CHO, с последующей очисткой продуцированного рекомбинантного антитела из клеточной культуры или супернатанта, полученного после удаления клеток.

Таблица 1: Перечень последовательностей

SEQ ID. No	Код (обозначение)	Описание	Последовательность
1	LV1044- JVZ007	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMI SEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTT DYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLK PEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVSS
2	LV1050	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMI

			SEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTT DYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLR AEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSS
3	LV1051	VHH	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASRFMI SEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTT DYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLR AEDTAVYYCDGYGYRGLGTQVTVSS
4	5C8	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF SNYAMGWFRQAPGKEREVFAAISWSGGS TSYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSP KPEDTAIYYCAAQFSGADYGFGR LGIRGY EYDYWGQGTQVTVSS
5	5C8var1	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPF SNYAMSWFRQAPGKEREVFAAISWSGGS TSYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAAQFSGADYGFGR LGIRG YEYDYWGQGTQVTVSS
6	Линкер		GGGGS
7	LV1044-5C8	Биспеци- фическое антитело	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMI SEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTT DYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLK PEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSSGGG GSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR PFSNYAMGWFRQAPGKEREVFAAISWSG GSTSYADSVKGRFTISRDNANTVYLQM NSPKPEDTAIYYCAAQFSGADYGFGR LGI RGYEYDYWGQGTQVTVSS
8	LV1050- 5C8var1	Биспеци- фическое антитело	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMI SEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTT DYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLR

			AEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSSGGG GSEVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGR PFSNYAMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGG STSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAQFSGADYGFGR LGIR GYEYDYWGQGTQVTVSSAAAEPEA
9	LV1051-5C8var1	Биспецифическое антитело	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASRFMI SEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTT DYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCDGYGYRGLGTQVTVSSGGG GSEVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGR PFSNYAMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGG STSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAQFSGADYGFGR LGIR GYEYDYWGQGTQVTVSSAAAEPEA
10		Модифицированная последовательность шарнирной области	AAASDKTHTCPPCP
11	wtIgG1 (аллотип G1m17, G1m(z))	CH2 и CH3	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
12	IgG1 L234F	Вариант константной	AAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

	L235E T366W	области тяжелой цепи	NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
13	IgG1 L234F L235E T366S L368A Y407V	Вариант константной области тяжелой цепи	AAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
14	LV1050	CDR1	RFMISEYSMH
15	LV1050	CDR2	TINPAGTTDYADSVKG
16	LV1050	CDR3	DGYGY
17	5C8var1	CDR1	NYAMS
18	5C8var1	CDR2	AISWSGGSTSYADSVKG
19	5C8var1	CDR3	QFSGADYGFGRLGIRGYEYDY
20	6H4	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF SNYGMGWFRQAPGKKREFVAGISWSGGS TDYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDYD YWGQGTQVTVSS
21	6H4	CDR1	GRPFSNYGMG
22	6H4	CDR2	GISWSGGSTDYADSVKG
23	6H4	CDR3	VFSGAETAYYPSDDYDY
24	PSMA		MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVL

			AGGFLLGFLFGWFIKSSNEATNITPKHNM KAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQ NFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVL LSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPP PGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYV NYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIARYG KVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADY FAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLN GAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSI PVHPIGYDDAQKLEKMGGSAAPPDSSWR GSLKVPYNVGPFTGNFSTQKVKMHIHST NEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHR DSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKK EGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAE ENSRLQLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDC TPLMYSLVHNLTKEKSPDEGFEGKSLYES WTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQ RLGASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSV YETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGM VFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYS ISMKHPQEMKTYSVSFDLSFSAVKNFTEIA SKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLE RAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAG ESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQI YVAAFTVQAAAETLSEVA
25	5C8var1 Fc L234F L235E T366W		EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPF SNYAMSWFRQAPGKEREFVSAISWSSGGST SYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAQFSGADYGFGR LGIRGY EYDYWGQGTQVTVSSAAASDKTHTCPPC PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

			CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
26	LV1050 Fc L234F L235E T366S L368A Y407V		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMI SEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTT DYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSSAAA SDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
27	5C8var1 Fc L234F L235E T366W		EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPF SNYAMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGGST SYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAAQFSGADYGFGRLGIRGY EYDYWGQGTQVTVSSAAASDKTHTCPPC PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE

			ALHNHYTQKSLSLSPGK
28	LV1050 Fc L234F L235E T366S L368A Y407V		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMI SEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTT DYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSSAAA SDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29	LV1050- 5C8var1-no-c- tag (вариант без C-метки)		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMI SEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTT DYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSSGGG GSEVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGR PFSNYAMSWFRQAPGKEREFSVAISWGG STSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAQFSGADYGFGR LGIR GYEYDYWGQGTQVTVSS
30	PSMA var (вариант PSMA)		MARPLCTLLLLMATLAGALAGSHHHHHH GSKSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENI KKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQ WKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYI SIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVSDIVPP FSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLE RDMKINCSGKIVIARYGKVFRGNKVKNA QLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDG WNLPGGGVQQRGNILNLNGAGDPLTPGY

			ANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQ KLEKMGGSAPPDSSWRGSLKVPYNVGP GFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIG TLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQ SGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFA SWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVA YINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLT KELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSG MPRISKLGSGNDFEVFFQRLGASGRARYT KNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFY DPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPF DCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKT YSVSFDLSFSAVKNFTEIASKFSERLQDFD KSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPD RPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALF DIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAA AETLSEVA
31	huVdelta2 ECD-Fc (hole)-His		MQRISLIHL SLFWAGVMSAIELVPEHQTV PVSIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYRK TQGNTMTFIYREKDIYGPFGKDNFQGDIDI AKNLAVLKILAPSERDEGSYYCACDTLGM GGEYTDKLIFGKGTRVTVEPRSQPHTKPS VFVMKNGTNAVCLVKEFYPKDIRINLVSS KKITEFDPAIVISPSGKYNAVKLKGYEDSN SVTCSVQHDKTVHSTDFEVKTDSTDHV KPKETENTKQPSKSCHKPKAIVHTEKVN MSLTAAASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD

			ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGHHHHH
32	huVgamma9 ECD-Fc (knob)-C-tag		MLSLLHASTLAVLGALCVYGAGHLEQPQI SSTKTLSTARLECVVSGITISATSVYWYR ERPGEVIQFLVSISYDGTVRKESGIPSGKFE VDRIPETSTSTLTIHNVEKQDIATYYCALW EAQQELGKKIKVFGPGTKLIITDKQLDAD VSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFF PDVIKIHWEKKSENTILGSQEGNTMKTND TYMKFSWLTVPEKSLDKEHRCIVRHENN KNGVDQEIIFFPIKTDVITMDPKDNC SKDA NDTLLLQLTNTSAAAASDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGAAAEPEA

Примеры

Пример 1: Выделение PBMC и получение культур V γ 9V δ 2 Т-клеток от доноров-людей

У здоровых добровольцев-доноров отбирали пробы цельной крови. В качестве альтернативы получали лейкоцитарные пленки от службы снабжения крови Sanquin, и их использовали для выделения мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). PBMC выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности раствора Lymphoprep™. Затем V γ 9V δ 2 Т-клетки выделяли из PBMC здорового донора с помощью

магнитно-активируемой сортировки клеток (MACS) с использованием мышиного моноклонального антитела против V δ 2-TCR (Mab), меченного FITC, в комбинации с микрогранулами с козьими антителами против мышиного IgG. Очищенные V γ 9V δ 2 Т-клетки стимулировали каждые семь дней смесью фидерных клеток, состоящей из облученных РВМС от двух здоровых доноров и трансформированной вирусом Эпштейна-Барр В-клеточной линии (JY), ресуспендированных в среде RPMI, предложенной Мемориальным институтом Розуэлл-Парк (Roswell Park Memorial Institute), с добавлением 10 МЕ/ мл IL-7, 10 нг/мл IL-15 и 50 нг/мл РНА. Размноженные культуры V γ 9V δ 2 Т-клеток всегда проверяли на чистоту перед использованием их в экспериментах, и всегда обнаруживали >95% двойных положительных результатов по V γ 9 и V δ 2.

Пример 2: Гуманизация анти-PSMA VHH JVZ-007 и анти-V γ 9V δ 2 VHH 5C8

Аминокислотную последовательность анти-PSMA VHH JVZ-007 (LV1044; SEQ ID NO: 1), полученного от верблюдов (LV1044; SEQ ID NO: 1) (J Nucl Med. 2015 Jul; 56(7):1094-9, supplemental data), выравнивали с соответствующей последовательностью человека, и при этом установили, что наиболее близкое совпадение в базе данных генов V человека и зародышевой линии человека соответствуетIGHV3-74*01. На основании различий последовательностей в каркасных областях между последовательностями, полученными от человека и ламы, были сконструированы два гуманизированных варианта (SEQ ID NO: 2-3): см. выравнивание, показанное на фигуре 1.

Затем JVZ-007 и эти два мутанта объединяли с анти-V γ 9V δ 2 VHH 5C8 (антитело, связывающее V δ 2, описанное в публикации заявки WO 2015/156673) (SEQ ID NO: 4) или с 5C8var1, гуманизированным вариантом 5C8 (SEQ ID NO: 5), в биспецифическом формате VHH: анти-PSMA VHH-линкер-анти-V γ 9V δ 2 VHH. Последовательность линкера представляла собой GGGGS (SEQ ID NO: 6). В некоторые конструкции для целей очистки и обнаружения добавляли С-концевую С-метку (последовательность EPEA), которой предшествуют три остатка аланина. Последовательности полученных конструкций представлены в SEQ ID NO: 7-9.

Пример 3: Структура варианта формата биспецифического VHH с увеличенным периодом полужизни

Вариант формата биспецифического VHH с увеличенным периодом полужизни разрабатывали на основе формата антитела, содержащего Fc. Последовательности VHH связывали со слегка модифицированной шарнирной областью IgG1 человека: аминокислотные остатки 216-230 (нумерация EU) были заменены на AAASDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 10). Это исключает цистеин, который обычно связывается с другой тяжелой цепью, и заменяет верхнюю шарнирную последовательность «ЕРК» тремя аланинами. Этот модифицированный шарнир соединяли с последовательностями IgG1 (аллотип G1m17, G1m(z))-CH2 и -CH3 (SEQ ID NO: 11). Последовательность CH2 модифицировали, чтобы она содержала мутации, вызывающие сайленсинг Fc (L234F, L235E), а последовательность CH3 модифицировали, чтобы она содержала либо мутацию «выступ» (T366W) (SEQ ID NO: 12), либо три мутации, создающие «впадину» (T366S, L368A и Y407V) (SEQ ID NO: 13). Эта технология «выступ-во-впадину» (KiH) вызывает преимущественную гетеродимеризацию двух цепей. Полученная конструкция схематически изображена на фигуре 2.

Пример 4: Клонирование, экспрессия и очистка биспецифических молекул VHH и Fc-содержащих конструкций

Аминокислотные последовательности биспецифических молекул VHH обратно транслировали в кДНК, а затем оптимизировали по кодонам для экспрессии в клетках человека. Добавляли регуляторные элементы: N-концевую последовательность Козака и C-концевой стоп-кодон (включая сайты рестрикции BamH1 и Not1 для клонирования), и кДНК создавали в виде синтетического гена. кДНК клонировали в подходящий вектор и подтверждали их последовательности. Экспрессию белков осуществляли путем транзientной трансфекции полученных плазмид в клетки HEK293_E. Белки очищали из культурального супернатанта с помощью аффинной хроматографии с использованием белка-A и препаративной эксклюзионной хроматографии.

Аминокислотные последовательности двух белковых цепей Fc-содержащих конструкций обратно транслировали в кодирующую кДНК, добавляли необходимые регуляторные элементы (последовательность Козака, стоп-кодон и сайты клонирования BamH1 и Not1), и кодоны кДНК оптимизировали для экспрессии. кДНК получали путем синтеза синтетических генов, а экспрессионные плазмиды, кодирующие любую из двух

белковых цепей, получали путем клонирования кДНК по отдельности в подходящий вектор. У полученных плазмид проверяли последовательности, и затем их использовали для трансфекции клеток СНО, выращенных в суспензии, с использованием различных соотношений для двух плазмид (1:2, 1:1 и 2:1). Секретируемые белки очищали из супернатанта культуры с помощью аффинной хроматографии с использованием белка-А, и заменяли буфер на PBS. Белки дополнительно очищали препаративной эксклюзионной хроматографией.

Пример 5: Тестирование гуманизированных вариантов анти-PSMA VHH JVZ-007

Очищенные биспецифические VHH, содержащие гуманизированные варианты, тестировали в отношении их способности индуцировать зависимую от мишени активацию Т-клеток в 4-часовом анализе дегрануляции. V γ 9V δ 2 Т-клетки выделяли из PBMC с помощью магнитно-активированной сортировки клеток (MACS), и затем их размножали, как описано в Примере 1. Размноженные V γ 9V δ 2 Т-клетки, используемые для экспериментов, всегда проверяли на чистоту, и обнаруживали >95% двойных положительных результатов для V γ 9- и V δ 2-окрашивания в анализе FACS. Очищенные размноженные V γ 9V δ 2 Т-клетки инкубировали с таким же количеством PSMA-положительных клеток-мишеней LNCaP (ATCC, кат. № CRL-1740) при соотношении эффектор:клетки-мишени (Е:Т) равном 1:1, и в диапазоне различных концентраций биспецифической конструкции. Через 4 часа инкубации процент Т-клеток, экспрессирующих CD107a, определяли путем окрашивания в анализе FACS.

На фигуре 3 показано, что гуманизированные варианты PSMA VHH JVZ-007 показали высокую эффективность в отношении индукции дегрануляции V γ 9V δ 2 Т-клеток для антиген-положительной клеточной линии LNCaP. Однако одна высокая концентрация биспецифической конструкции не вызывала значительной активации Т-клеток, когда использовали антиген-негативную клеточную линию PC-3.

Пример 6: Цитотоксичность, опосредованная биспецифическим VHH и аналогом, содержащим Fc

Две последовательности VHH биспецифического VHH LV1050-5C8var1 перематировали в молекулу с увеличенным периодом полужизни, содержащую Fc IgG1 человека, как описано выше, в результате чего получены конструкции, представленные в SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26 (5C8var1-Fc и LV1050-Fc).

Как биспецифическую конструкцию VHH LV1050-5C8var1, так и Fc-содержащий аналог 5C8var1-Fc x LV1050-Fc (также называемый здесь LV1050-Fc x 5C8var1) тестировали в отношении их способности индуцировать цитотоксичность клеток LNCaP за счет активации V γ 9V δ 2 Т-клеток.

На фигуре 4 показано, что как биспецифический VHH, так и Fc-содержащий аналог, содержащий одинаковые последовательности VHH, были способны индуцировать 100% лизис опухолевых клеток через 24 часа при соотношении E:T, равном 1:1. Биспецифический VHH LV1044-5C8, содержащий исходный анти-PSMA VHH JVZ-007, был столь же активен, как и гуманизированный вариант LV1050-5C8var1, и оба они были немного более активны, чем Fc-содержащий аналог 5C8var1-Fc x LV1050-Fc. Полученные значения величин EC₅₀ составили 2,2 пМ и 1,6 пМ соответственно для LV1050-5C8var1 и LV1044-5C8, и 10,5 пМ для 5C8var1-Fc x LV1050-Fc. В последующих экспериментах для целей экспрессии к обеим конструкциям, кодирующим Fc-содержащие цепи, добавляли С-концевой лизин, что приводило к кодирующим последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28. Анализ полученных полипептидов показал, что С-концевые лизины были отсечены (данные не показаны), в результате чего были получены полипептиды, идентичные полипептидам, полученным из конструкций, не кодирующих С-концевой лизин.

Пример 7: Связывание LV1050-Fc x 5C8var1-Fc для нацеливания на положительные клетки в анализе FACS

Биспецифическую Fc-содержащую конструкцию 5C8var1-Fc x LV1050-Fc клонировали, экспрессировали и очищали, как описано выше. Для тестирования связывания молекулы с PSMA, диапазон концентраций антитела тестировали на связывание с PSMA-положительной клеточной линией рака предстательной железы LNCaP, и с антиген-негативной клеточной линией PC-3. Детекцию проводили с помощью поликлонального антитела против IgG человека.

Для проверки связывания LV1050-Fc x 5C8var1-Fc с V γ 9V δ 2 Т-клетками диапазон концентраций соединения (100 нМ и его половинное логарифмическое разведение) тестировали на связывание при окрашивании в анализе FACS с использованием двух разных моноклональных антител, направленных против VHH (45H8 и 96A3F5; Genscript, кат. номера CP001/18L001614 и A01994, соответственно).

На фигуре 5 показано, что молекула специфически связывается с PSMA (левая панель), поскольку она не окрашивает в заметной степени PSMA-отрицательную клеточную линию PC-3, но она показала сильное связывание с клетками LNCaP. Измеренная величина EC₅₀ для связывания составила 7,3 нМ. Аффинность к V γ 9V δ 2-TCR измеряли с помощью анализа FACS, и она составила 1,7 нМ (правая панель).

Пример 8: Ведущее биспецифическое антитело LV1050-Fc x 5C8var1-Fc индуцирует мощную зависимую от мишени активацию Т-клеток и лизис клеток-мишеней

Для измерения активности биспецифического активатора-рекрутера Т-клеток, клетки-мишени LNCaP инкубировали с различными концентрациями молекулы и фиксированным количеством V γ 9V δ 2 Т-клеток (соотношение эффектор:мишень = 1:1). Затем измеряли экспрессию CD107a на Т-клетках после четырех часов инкубации путем окрашивания в анализе FACS для оценки активации Т-клеток. Цитотоксичность измеряли через 24 часа путем измерения числа жизнеспособных клеток в анализе FACS (окрашивание 7AAD). На фигуре 6 показано, что LV1050-Fc x 5C8var1-Fc индуцирует мощную активацию Т-клеток, о чем свидетельствует экспрессия CD107a. Кроме того, это приводило к сильному цитотоксическому действию на клетки-мишени LNCaP. Полученные значения EC₅₀ для цитотоксичности были практически одинаковыми для обеих протестированных биспецифических молекул VHH (1,9 пМ для LV1044-5C8 (в этом эксперименте без метки AAAEPEA) и LV1050-5C8var1), и немного выше для LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (9,4 пМ).

Пример 9: Частота встречаемости V γ 9V δ 2 Т-клеток и экспрессия лигандов в опухоли пациента и в нормальной ткани

Опухолевую ткань предстательной железы получали от больных неметастатическим раком предстательной железы после радикальной простатэктомии. Анализу подвергали как макроскопически нормальную ткань, так и ткань опухоли. Ткань разрезали на мелкие кусочки хирургическим лезвием и ресуспендировали в среде для диссоциации, состоящей из модифицированной по Искову среды Дульбекко (IMDM), с добавлением 0,1% ДНКазы I (Roche), 0,14% коллагеназы А, 100 МЕ/мл пенициллина натрия/100 мкг/мл. сульфата стрептомицина/2,0 мМ L глутамина и 5% FCS. Кусочки ткани переносили в стерильную колбу и инкубировали на магнитной мешалке в течение 45 минут при 37°C. После этой инкубации клеточную суспензию пропускали через клеточный фильтр с размером пор 100 мкм. Опухолевую ткань диссоциировали три раза, а нормальную ткань - дважды, после этого клетки промывали и подготавливали образцы для подсчета жизнеспособных клеток с использованием исключения трипанового синего. Диссоциированные опухолевые и нормальные ткани анализировали на наличие V γ 9V δ 2 T-клеток в анализе FACS с окрашиванием AF700, используя в анализе меченные анти-CD45 Mab, PerCP-Cy5.5, меченные анти-CD3 mAb, APC, меченные анти-V γ 9-TCR mAb и BV711, меченные анти-V δ 2-TCR mAb. Экспрессию мишеней EpCAM, PSMA и CD277 на опухолевых и нормальных клетках определяли с использованием Mab против EpCAM, меченного BV421, Mab против PSMA, меченного FITC, и Mab против CD277, меченного PE.

На фигуре 7 показано, что между опухолевой и нормальной тканью существует значительная разница как в экспрессии PSMA, так и в экспрессии CD277. Резецированную ткань исследовали макроскопически, а затем определяли ее как опухолевую или нормальную ткань. Затем этот результат дополнительно подтверждали положительным окрашиванием опухоли EpCAM в анализе FACS, которое коррелировало с экспрессией PSMA. PSMA практически отсутствовал в нормальных тканях и значительно экспрессировался на диссоциированных опухолевых клетках. Экспрессия CD277 (BTN3A) также была более выражена в опухоли, хотя различия не имели статистической значимости. Напротив, частота встречаемости V γ 9V δ 2 T-клеток как в опухолевой, так и в нормальной ткани была в значительной степени сопоставима, при этом нормальная ткань имела несколько более высокий процент встречаемости.

Пример 10: Функциональный анализ LV1044-5C8 с использованием клеток-мишеней, полученных от пациентов

Для определения способности биспецифических конструкций опосредовать цитотоксичность V γ 9V δ 2 Т-клеток в отношении клеток-мишеней, полученных от пациентов, суспензии диссоциированных опухолевых и нормальных клеток инкубировали в течение 24 часов при 37°C с 50 нМ соединения или без него и с культурами V γ 9V δ 2 Т-клеток в соотношении эффектор:мишень (E:T) = 1:1. Количество живых клеток-мишеней определяли с использованием маркера 7AAD для индикации погибших/живых клеток и гранул 123 count eBeads.

На фигуре 8 показано, что V γ 9V δ 2 Т-клетки способны индуцировать гибель опухолевых клеток, полученных от пациента, зависимым от мишеней и V γ 9V δ 2 Т-клеток образом. Нормальная ткань, в значительной степени лишенная экспрессии PSMA, не реагировала на воздействие V γ 9V δ 2 Т-клеток даже в присутствии 50 нМ биспецифического антитела. Однако PSMA-положительные опухолевые клетки через 24 часа погибали в значительной степени, но только в присутствии как эффекторных клеток, так и биспецифического антитела.

Пример 11: Определение аффинности LV1050-Fc x 5C8var1-Fc для PSMA и V γ 9V δ 2-TCR человека с использованием биослойной интерферометрии

Аффинность LV1050-Fc x 5C8var1-Fc к рекомбинантному PSMA человека и V γ 9V δ 2-TCR человека определяли с помощью биослойной интерферометрии (BLI). В качестве лиганда на стрептавидиновые биосенсоры наносили 12,5 мкг/мл биотинилированного hPSMA или 5 мкг/мл hV γ 9V δ 2-Fc (состоящего из SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32). В качестве аналита использовали двукратные серийные разведения LV1050-Fc x 5C8var1-Fc: в диапазоне от 3,125 до 200 нМ в комбинации с лигандом hPSMA; в диапазоне от 0,03125 до 20 нМ в комбинации с лигандом hV γ 9V δ 2-Fc. Как показано в Таблице 2, LV1050-Fc x 5C8var1-Fc связывается с PSMA человека со значением K_D равным $32 \pm 1,2$ нМ, и с V γ 9V δ 2-TCR человека со значением K_D равным $0,64 \pm 0,16$ нМ.

Таблица 2: Определение аффинности LV1050-Fc x 5C8var1-Fc к PSMA и V γ 9V δ 2-TCR человека с использованием биослойной интерферометрии

Лиганд	K _d (M)		k _{on} (1/мс)		k _{dis} (1/с)	
	Среднее	SD	k _{on} (1/мс)	SD	k _{dis} (1/с)	SD
PSMA (n=3)	3,16E-08	1,24E-09	3,07E+05	7,41E+03	9,69E-03	4,73E-04
Vγ9Vδ2- TCR (n=4)	6,35E-10	1,60E-10	2,40E+05	8,64E+03	1,51E-04	3,40E-05

Пример 12: Картирование эпитопа

Для определения эпитопа на PSMA, связанного с VHH, включенным в LV1050-Fc x 5C8var1-Fc и LV1050-5C8var1-no-c-tag (SEQ ID NO: 29) (содержащий идентичный PSMA-связывающий домен VHH, как в LV1050-Fc x 5C8var1-Fc) использовали технологию картирования эпитопов, разработанную CovalX AG (Pimenova et al. (2008) J Mass Spectrom 43:185). Вкратце, рекомбинантному белку PSMA (SEQ ID NO: 30) давали возможность связываться с LV1050-5C8var1-no-c-tag, затем давали возможность перекрестного связывания и подвергали воздействию различных протеаз. Полученные пептиды, перекрестно связанные или нет, подвергались анализу с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения.

Полученные результаты показали, что VHH связывается с конформационным эпитопом, который показан на фигуре 9. Установлено, что следующие остатки непосредственно взаимодействуют с антителом: R149, S156, R163, S276, R279, S281, K283, H577, S590, K688, R689 и Y692. Эти остатки соответствуют остаткам R190, S197, R204, S317, R320, S322, K324, H618, S631, K729, R730 и Y733 в последовательности UniProt Q04609-1. Ни один из редких однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), которые были идентифицированы в гене FOLH1, не присутствовал в эпитопе, что позволяет предположить, что LV1050-5C8var1-no-c-tag и, следовательно, LV1050-Fc x 5C8var1-Fc способны к связыванию всех релевантных идентифицированных SNP-вариантов мишеней.

Пример 13: Дальнейший функциональный анализ LV1050-Fc x 5C8var1-Fc с использованием клеточных линий опухоли

Способность LV1050-Fc x 5C8var1-Fc индуцировать PSMA-зависимую активацию Vγ9Vδ2 Т-клеток определяли в 4-часовом анализе *in vitro*, используя для оценки

экспрессию маркера дегрануляции CD107a (LAMP-1). Размноженные V γ 9V δ 2 Т-клетки, выделенные из PBMC от здоровых доноров, культивировали с PSMA-экспрессирующими линиями раковых клеток простаты LNCaP, VCaP или 22Rv1 в соотношении эффектор:клетки-мишени равном 1:1, в отсутствие или в присутствии различных концентраций LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (в диапазоне от 10 фМ до 3,16 нМ). Клетки собирали и определяли экспрессию CD107a на клеточной поверхности с помощью метода проточной цитометрии. В присутствии всех линий опухолевых клеток, экспрессирующих PSMA, антитело LV1050-Fc x 5C8var1-Fc индуцировало очень сильную активацию V γ 9V δ 2 Т-клеток (фигура 10) со значениями EC₅₀ в пМ-диапазоне (Таблица 3).

Таблица 3: Значения EC₅₀ в отношении дегрануляции V γ 9V δ 2 Т-клеток и опосредованной V γ 9V δ 2 Т-клетками цитотоксичности опухолевых клеток с LV1050-Fc x 5C8var1-Fc, в анализах in vitro, с использованием положительных по V γ 9V δ 2 Т-клеток и положительных по PSMA линий опухолевых клеток

Эффекторные клетки	Клеточная линия-мишень	Диапазон концентраций (нМ)	Соотношение Е:Т	Среднее значение EC ₅₀ (нМ), ($\pm$ SD)	Количество доноров (n) и экспериментов
Дегрануляция через 4 часа					
V γ 9V δ 2 Т-клетки	LNCaP	3,2-0,000010	1:1	0,016 (0,0049)	n=10 (10 доноров в 5 экспериментах)
V γ 9V δ 2 Т-клетки	22Rv1	3,2-0,000032	1:1	0,029 (0,0049)	n=4 (4 донора в 2 экспериментах)
V γ 9V δ 2 Т-клетки	VCaP	3,2-0,000032	1:1	0,028 (0,0064)	n=4 (4 донора в 2 экспериментах)
Цитотоксичность через 24 часа					
V γ 9V δ 2 Т-клетки	LNCaP	3,2-0,000010	1:1	0,017 (0,013)	n=10 (10 доноров в 7 экспериментах, 4 донора протестированы дважды)
V γ 9V δ 2 Т-клетки	22Rv1	3,2-0,000032	1:1	0,013 (0,0069)	n=4 (4 донора в 2

					экспериментах)
V γ 9V δ 2 Т-клетки	VCaP	3,2-0,000032	1:1	0,015 (0,011)	n=3 (3 донора в 2 экспериментах)

Затем определяли способность LV1050-Fc x 5C8var1-Fc индуцировать зависимую от мишени гибель опухолевых клеток, опосредованную V γ 9V δ 2 Т-клетками, в тех же совместных культурах через 24 часа, используя люминесцентный анализ для количественного определения высвобождения внутриклеточной протеазы из умирающих/погибших опухолевых клеток (анализ цитотоксичности CytoTox-Glo™, Promega). Антитело LV1050-Fc x 5C8var1-Fc индуцировало сильную, независимую от мишени и опосредованную V γ 9V δ 2 Т-клетками цитотоксичность в отношении клеток LNCaP, VCaP и 22Rv1 (фигура 11B) со значениями EC₅₀ в том же диапазоне, что и для дегрануляции (Таблица 3).

Кроме того, установили, что V γ 9V δ 2 Т-клетки не активировались под действием только LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (в отсутствие опухолевых клеток), и также не наблюдали лизиса опухолевых клеток, которые не экспрессируют PSMA (LNCaP.koPSMA) (фигура 11A).

Для изучения влияния различных соотношений Е:Т на эффективность LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (диапазон протестированных концентраций: от 10 фМ до 3,2 нМ) количество клеток-мишеней LNCaP поддерживали постоянным (т.е. 50000) в 24-часовом анализе цитотоксичности, в то время как количество эффекторных V γ 9V δ 2 Т-клеток варьировали с целью получения различных соотношений Е:Т (1:1, 1:10 и 1:100). Как показано в Таблице 4, средние значения EC₅₀ для цитотоксичности, опосредованной V γ 9V δ 2 Т-клетками, индуцированной LV1050-Fc x 5C8var1-Fc, были сопоставимы при соотношении Е:Т = 1:1 и 1:10 (17 ± 13 пМ и 9,9 ± 6,5 пМ соответственно), в то время как при соотношении Е:Т = 1:100 наблюдаемый уровень цитотоксичности был слишком низким для точного расчета значения EC₅₀. Когда активность (EC₅₀) LV1050-Fc x 5C8var1-Fc в анализе не была задействована, то максимальный процент наблюдаемого лизиса был значительно снижен при соотношении Е:Т = 1:10, по сравнению с соотношением Е:Т = 1:1 (данные не показаны). Таким образом, активность (т.е. величина EC₅₀, определенная по результатам анализа) LV1050-Fc x 5C8var1-Fc не сильно зависит от изменения соотношения Е:Т.

Таблица 4: Значения EC₂₀, EC₅₀ и EC₉₀ в отношении цитотоксичности V γ 9V δ 2 Т-клеток, опосредованной LV1050-Fc x 5C8var1-Fc, при использовании различных соотношений Е:Т.

Соотношение Е:Т	Среднее значение EC₂₀ $\pm$ SD (пМ)	Среднее значение EC₅₀ $\pm$ SD (пМ)	Среднее значение EC₉₀ $\pm$ SD (пМ)	Количество доноров (n) и экспериментов
1:1	4,3 $\pm$ 3,0	17 $\pm$ 13	79 $\pm$ 48	п = 10 (10 доноров в 7 экспериментах, 4 донора протестированы дважды)
1:10	3,6 $\pm$ 1,3	9,9 $\pm$ 6,5	60 $\pm$ 59	п = 4 (4 донора в 2 экспериментах)

Пример 14: Функциональный анализ LV1050-Fc x 5C8var1-Fc с использованием клеток-мишеней, полученных от пациентов

От пациента получали ткань нематастатического рака предстательной железы, и затем обрабатывали опухолевую ткань и нормальную (незлокачественную) ткань, как описано в Примере 9.

В качестве меры степени активации V γ 9V δ 2 Т-клеток использовали степень активации маркера дегрануляции CD107a (LAMP-1, который определяли с помощью PE-меченого анти-CD107a человека, Thermofisher) на V γ 9V δ 2 Т-клетках, присутствующих в диссоциированных образцах простаты (0,5-1 $\times$ 10⁵ диссоциированных клеток из нормальной (незлокачественной) или из ткани первичной опухоли), в присутствии или в отсутствие 50 нМ LV1050-Fc x 5C8var1-Fc. Через 4 часа дегрануляцию V γ 9V δ 2 Т-клеток измеряли по экспрессии CD107a, и анализировали методом проточной цитометрии (определяли процентное содержание клеток EpCAM-/CD45+/CD3+/V γ 9+/V δ 2+/CD107a+).

Также определяли способность LV1050-Fc x 5C8var1-Fc запускать дегрануляцию V γ 9V δ 2 Т-клеток в аутологичных PMBC клетках от пациентов. Для этого клетки культивировали в присутствии ткани опухоли предстательной железы или нормальной (незлокачественной) ткани. С этой целью использовали тот же способ, который описан

выше, за исключением того, что аутологичные РВМС добавляли при соотношении эффектор/мишень (Е:Т; РВМС:клетки предстательной железы) = 10:1, и инкубировали в течение 24 часов.

В диссоциированной ткани рака предстательной железы, но не в доброкачественной ткани предстательной железы, антитело LV1050-Fc x 5C8var1-Fc индуцировало статистически значимое увеличение дегрануляции ткани, инфильтрованной V γ 9V δ 2 Т-клетками. Наблюдали значительно более высокий процент CD107a-экспрессирующих V γ 9V δ 2 Т-клеток по сравнению с клетками ткани, инкубированных без биспецифического антитела (фигура 12A). В нормальной ткани LV1050-Fc x 5C8var1-Fc не индуцировало дегрануляцию ткани, инфильтрованной V γ 9V δ 2 Т-клетками (фигура 12B).

Затем определяли способность антитела LV1050-Fc x 5C8var1-Fc активировать V γ 9V δ 2 Т-клетки в аутологичных клетках РВМС при совместном культивировании с тканью опухоли предстательной железы от пациента или нормальной (незлокачественной) тканью. Совместное культивирование в присутствии LV1050-Fc x 5C8var1-Fc приводило к значительно более высокому проценту CD107a-экспрессирующих V γ 9V δ 2 Т-клеток, по сравнению с количеством таких клеток при инкубировании только клеток опухолевой ткани и аутологичных РВМС (фигура 13A). Активации V γ 9V δ 2 Т-клеток в аутологичных РВМС отсутствовала, когда LV1050-Fc x 5C8var1-Fc добавляли к культурам аутологичных РВМС и нормальной (незлокачественной) ткани предстательной железы (фигура 13B).

Специфическую цитотоксичность, индуцированную антителом LV1050-Fc x 5C8var1-Fc, оценивали по результатам тестирования совместных культур клеток опухоли предстательной железы или нормальных (незлокачественных) клеток предстательной железы и аутологичных РВМС, как описано в Примере 10, за исключением того, что использовали соотношение Е:Т, равное 10:1. Антитело LV1050-Fc x 5C8var1-Fc индуцировало статистически значимый лизис опухолевых клеток в присутствии аутологичных РВМС, тогда как нормальные (незлокачественные) клетки предстательной железы не подвергались лизису (фигура 14).

Пример 15. Терапевтическая эффективность LV1050-Fc x 5C8var1-Fc in vivo

Иммунодефицитным мышам NCG подкожно инокулировали 5×10^6 клеток 22Rv1, смешанных с РВМС человека в соотношении 2:1 (22Rv1:РВМС). В этом исследовании

использовали РВМС от 2 доноров, с разными частотами встречаемости V γ 9V δ 2 Т-клеток в CD3⁺ Т-клетках, в частности, от донора № 1 (21,9% V γ 9V δ 2 Т-клеток) и от донора № 2 (8,8% V γ 9V δ 2 Т-клеток). Антитело LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (0,2 мг/кг или 2 мг/кг) или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) вводили внутривенно каждую неделю (в дни 0, 7, 14 и 21), начиная со дня введения опухолевых клеток и РВМС. Размеры опухоли измеряли в двух измерениях два раза в неделю с помощью штангенциркуля. Мышей умерщвляли, когда средний объем опухоли в группе превышал 2000 мм³.

Для мышей, получивших РВМС от донора № 1, введение LV1050-Fc x 5C8var1-Fc в дозе 0,2 или 2 мг/кг приводило к статистически значимым значениям ингибирования роста опухоли (TGI), составившим 91% и 78%, соответственно, на 34-й день (когда мышей в контрольной (обработка только PBS) группе умерщвляли: фигура 15A). Для мышей, которым вводили РВМС от донора № 2, значения TGI, наблюдаемые на 41-й день (когда умерщвляли мышей в соответствующей группе, обработанной PBS), составили 23% и 52% для мышей, получавших соответственно 0,2 и 2 мг/кг LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (фигура 15B). Для клеток от донора № 2 статистическая значимость в TGI была обнаружена только для самой высокой дозы введенного соединения.

Пример 16: Оценка высвобождения цитокинов в цельной крови

Анализ высвобождения цитокинов *in vitro* проводили с использованием анализа раствора с использованием свежей цельной крови от 30 здоровых доноров. Различные концентрации LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (в диапазоне от 280 до 8,75 нМ) инкубировали в течение 24 часов с цельной кровью, и уровни семи цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ и фактор некроза опухоли (TNF- α)) в плазме измеряли с помощью иммунологического анализа. Erbitux® (цетуксимаб) и Campath® (алемтузумаб) включали в анализ в качестве контрольных соединений, вызывающих в клинических условиях соответственно низкое и высокое высвобождение цитокинов. Стафилококковый энтеротоксин В (SEB) использовали в качестве положительного контроля высвобождения всех протестированных цитокинов.

Обобщенные результаты представлены в Таблице 5. Антитело LV1050-Fc x 5C8var1-Fc индуцировало только высвобождение IL-8 и IFN- γ . Высвобождение IL-8,

индуцированное LV1050-Fc x 5C8var1-Fc, оказалось сравнимым с высвобождением IL-8, индуцированным Erbitux®, антителом, которое, как известно, не индуцирует синдрома высвобождения цитокинов (CRS) (или известно, что оно индуцирует низкие уровни цитокинов) у пациентов. Антитело LV1050-Fc x 5C8var1-Fc индуцировало высвобождение IFN- γ , которое было несколько выше по сравнению с Erbitux®, но максимальное наблюдаемое высвобождение IFN- γ было намного ниже, чем высвобождение в случае использования Campath®, антитела, клинически связанного с CRS. Важно отметить, что LV1050-Fc x 5C8var1-Fc не индуцировало никакого высвобождения IL-6, известного как характерный цитокин при CRS (Tanaka et al (2016) Immunotherapy 8: 959).

В анализе высвобождения цитокинов *in vitro*, когда LV1050-Fc x 5C8var1-Fc наносили на 96-луночные планшеты с высоким связыванием перед инкубацией со свежей цельной кровью от 10 здоровых доноров, были получены аналогичные результаты. Здесь LV1050-Fc x 5C8var1-Fc индуцировало очень низкие (средние) уровни IL-6 и IL-8, которые были сопоставимы со случаем использования препарата сравнения с низким ответом, таким как Erbitux®, и не наблюдалось высвобождения TNF α . Антитело LV1050-Fc x 5C8var1-Fc индуцировало более высокие (медианные) уровни IFN- γ по сравнению с Erbitux® при каждой концентрации тестируемого соединения, однако медианные уровни были значительно ниже, чем уровни, индуцируемые при использовании Campath®.

Таблица 5: Профиль высвобождения цитокинов (пг/мл), индуцированный LV1050-Fc x 5C8var1-Fc в образцах свежей крови здоровых доноров

Тестируемые образцы		IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IFN- γ	TNF α
PBS	(отрицательный контроль)	0	0	0	0	0	0	0
SEB	(положительный контроль)	24470,9	53,3	5613,2	8936,3	1010,3	61792,2	4302,2
Erbitux®	280 нМ	0	0	0	15,1	0	0	0
	140 нМ	0	0	0	24,8	0	1,1	0
	70 нМ	0	0	4,7	15,6	0	0,5	0
	35 нМ	0	0	17,4	20,0	0	0	0

	17,5 нМ	0	0	46,0	16,6	0	0	0
	8,75 нМ	0	0	6,2	15,4	0	3,6	0
Campath®	280 нМ	0	0	1732,1	578,2	0,2	3409,9	18,1
	140 нМ	0	0	1360,3	392,7	0	4029,0	12,9
	70 нМ	0	0	896,5	326,5	0	4732,9	8,3
	35 нМ	0	0	714,9	255,5	0	5313,4	14,5
	17,5 нМ	0	0	422,4	195,1	0	4353,3	16,9
	8,75 нМ	0	0	400,9	180,5	0	4932,2	20,6
LV1050-Fc x 5C8var1-Fc	280 нМ	0	0	0	35,4	0	9,4	0
	140 нМ	0	0	0	25,4	0	24,4	0
	70 нМ	0	0	0	24,2	0	37,9	0
	35 нМ	0	0	0	20,3	0	49,6	0
	17,5 нМ	0	0	0	28,2	0	50,0	0
	8,75 нМ*	0	0	0	19,2	0	81,4	0

Средние уровни цитокинов (пг/мл) для каждой комбинации лекарство/доза, измеренные в образцах свежей крови 30 здоровых доноров с помощью анализа высвобождения цитокинов *in vitro*.

Пример 17: Фармакокинетика

Антитело LV1050-Fc x 5C8var1-Fc содержит домен Fc человека, который, как ожидается, продлит период полужизни соединения *in vivo* за счет связывания с рецептором FcRn человека. Для подтверждения это, LV1050-Fc x 5C8var1-Fc вводили совместно с контрольным IgG человека в трех однократных внутривенных дозах 2 мг/кг, 5 мг/кг и 10 мг/кг мышам FcRn Tg32 SCID человека (Jackson labs: JAX). Образцы крови собирали в разные моменты времени (5 мес, 8 ч, 1, 3, 7, 10, 14, 17, 21 и 28 дней) после введения, и концентрации LV1050-Fc x 5C8var1-Fc оценивали с помощью анализа ELISA с захватом антигена. Результаты, полученные в этой модельной системе, показывают, что период полужизни LV1050-Fc x 5C8var1-Fc у этих трансгенных мышей составляет от 140 до 172 часов (5,8-7,2 дня, фигура 16), что сравнимо с периодом полужизни антитела на основе IgG в этой системе.

Фармакокинетику LV1050-Fc x 5C8var1-Fc также оценивали на приматах, отличных от человека (NHP). Трех самкам яванских макаков вводили однократную внутривенную дозу LV1050-Fc x 5C8var1-Fc (0,14, 0,77 и 2,27 мг/кг (1 животное на дозу)) путем 30-минутной внутривенной инфузии. Период полужизни LV1050-Fc x 5C8var1-Fc колебался от 150 до 166 часов (6,3-6,9 дня) (фигура 17), что соответствует периодам полужизни гуманизированных антител на основе IgG, которые не связываются с мишенью для ортолога яванских макаков (Walker et al. (2019) PLOS ONE 14: e0217061). Наблюдали увеличение показателей пропорциональное дозе. Фармакокинетические параметры представлены в Таблице 6.

Таблица 6: Фармакокинетические параметры LV1050-Fc x 5C8var1-Fc у яванских макаков после однократного внутривенного введения

№. живот- ного	Вводимая доза (мг/кг)	T _{max} . (часы)	C _{max} . (мкг/мл)	(n)C _{max} . (мкг/мл)/ (мг/кг)	T _{1/2} (часы)	AUC _{0-∞} (мкг·ч/мл)	(n)AUC _{0-∞} (мг·ч/мл)/ (мг/кг)	Cl (мл/ч/кг)	Vz (мл/кг)
61	0,14	1	3,17	22,6	162,1	297,9	2127,9	0,47	109,9
62	0,77	1	17,1	22,2	150,0	1513,2	1965,2	0,51	110,1
63	2,27	1	53,6	23,6	165,9	5548,7	2444,4	0,41	97,9

CL=клиренс; (n)C_{max} = (нормализованная) максимальная концентрация после дозирования; (n)AUC_∞ = (нормализованная) площадь под кривой зависимости концентрации от времени от момента времени t = 0 ч до бесконечности; T_{max} = время после введения дозы, при котором достигается максимальная концентрация; T_{1/2} = период полужизни; Vz = кажущийся объем распределения.

Пример 18: Однородный продукт, независимый от коэффициента трансфекции

кДНК, кодирующие соответствующие две тяжелые цепи антитела LV1050-Fc x 5C8var1-Fc, клонировали в векторах экспрессии, подходящих для продуцирования. Для трансфекции клеток, подходящих для продуцирования, использовали различные соотношения векторов экспрессии, содержащих LV1050-Fc или 5C8var1-Fc, равные 1:1, 1:1,25, 1:1,5, 1,25:1 и 1,5:1. Затем клетки отбирали по их устойчивости к двум разным антибиотикам, и из отобранных клеточных пулов получали антитела посредством

периодической культивации с подпиткой. Анализ полученных антител с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с эксклюзией по размеру (SE-HPLC) показал высокую чистоту продукта (по содержанию димеров): от 93,2% до 96,4% секретируемого белка соответствовали ожидаемому молекулярному захвату, независимо от коэффициента трансфекции (основной пик площади в Таблице 7). Для дальнейшего различения мономеров (LV1050-Fc и 5C8var1-Fc) и гомодимеров (LV1050-Fc x LV1050-Fc и 5C8var1-Fc x 5C8var1-Fc) от предполагаемых гетеродимеров LAVA (LV1050-Fc x 5C8var1-Fc) выполняли анализ ВЭЖХ с обращенной фазой (RP-HPLC). Во всех образцах пула клонов обнаружено высокое содержание предполагаемого гетеродимера LAVA LV1050-Fc x 5C8var1-Fc, которое составило от 86,1 до 94,9%. Пулы клонов DGC8-T1P, -T3P и -T5P продуцировали повышенный процент димера 5C8var1-Fcx5C8var1-Fc.

Таблица 7: Результаты SE-HPLC для пулов клонов, полученных путем трансфекции векторов экспрессии, содержащих LV1050-Fc или 5C8var1-Fc при различных соотношениях

Пул клона	Соотношение LV1050-Fc: 5c8var1-Fc	Относит. площади пиков [%]		
		НМВ виды	Главный пик	LMW виды
DGC8-T1P	1 : 1	4.1	95,8	0,0
DGC8-T3P	1 : 1,25	4,5	94,1	1,4
DGC8-T5P	1 : 1,5	4.3	93,2	2,5
DGC8-T7P	1,25 : 1	3,6	96,4	0,1
DGC8-T9P	1,5 : 1	3,6	96,3	0,0

НМВ-высокомолекулярные; LMW-низкомолекулярные

Пример 19: Композиция на основе LV1050-Fc x 5C8var1-Fc

Продукт LV1050-Fc x 5C8var1-Fc получали из выбранного клеточного клона путем культивирования в биореакторной системе, и после сбора и очистки продукта готовили композиции с концентрациями белка 0,5 мг/мл и 10 мг/мл, используя для этого четыре типа буферных составов:

Буфер	Состав композиции
-------	-------------------

Буфер 1	10 мМ гистидина + 280 мМ сахарозы + 0,02% полисорбата 80, рН 6,0
Буфер 2	10 мМ гистидина + 280 мМ сахарозы + 0,02% полисорбата 80, рН 6,0 + 1 мМ метионин
Буфер 3	10 мМ ацетат натрия + 280 мМ сахароза + 0,02% полисорбат 80, рН 5,5
Буфер 4	10 мМ ацетат натрия + 280 мМ сахароза + 0,02% полисорбат 80, рН 5,5 + 1 мМ метионин

Полученные образцы хранили при нескольких условиях (показаны ниже) в течение времени до 12 недель. Дополнительно были выполнены несколько стресс-тестов:

- Хранение при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Хранение при $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$
- Условия ускоренного хранения при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ и 60% относительной влажности (RH) $\pm 5\%$
- Тепловой стресс при $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ и 75% относительной влажности $\pm 5\%$
- Циклы замораживания/оттаивания: образцы полностью замораживали до $-80 \pm 10^{\circ}\text{C}$. Затем проводили пять циклов замораживания/оттаивания до полного оттаивания образцов при комнатной температуре ($15-25^{\circ}\text{C}$)
- Стресс перемешивания: образцы перемешивали при 240 об/мин в течение 7 дней при комнатной температуре ($15^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$)
- Окисление: образцы обогащали 0,01% (об./об.) перекисью водорода (H_2O_2) и инкубировали в течение 7 дней при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ /60% относительной влажности $\pm 5\%$
- Фотостабильность: $> 1,2$ миллиона люкс-часов и > 200 ватт-часов/кв. метр ближнего ультрафиолета при температуре $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ и относительной влажности $60\% \pm 5\%$.

Исходные (= t0) образцы при температуре $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ служили эталоном. Образцы анализировали с использованием следующих аналитических методов:

Метод	Оценка
Прозрачность	Внешний вид
Цвет	Внешний вид
рН	рН
A_{280} (УФ/видный)	Содержание

Светорассеяние	Выявление изменений
ВЭЖХ с эксклюзией по размеру (SE-HPLC)	Выявление изменений
Катионообменная ВЭЖХ (CIEX- HPLC)	Выявление изменений
Капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия (CE-SDS (невосстановленный))	Выявление изменений
CE-SDS (восстановленный)	Выявление изменений
Активность связывания PSMA (в анализе ELISA)	Сохранение
Пептидное картирование	Выявление изменений
Дифференциальное сканирование	Выявление изменений
Жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (LC-MS) (окисление)	Выявление изменений

Полученные результаты исследования стабильности с течением времени оказались приемлемыми в отношении изменений показателей прозрачности, цвета, pH, A_{280} (УФ/видимый), светорассеяния, результатов анализов SE-HPLC, CIEX-HPLC, CE-SDS и активности связывания PSMA, дифференциального сканирования и пептидного картирования для условий хранения при температурах: $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ и $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ и относительной влажности $60\% \pm 5\%$. Результаты измерений показывают, что продукт был очень стабилен при выбранных буферах, и в течение времени хранения наблюдали только незначительные отклонения показателей.

Более заметные результаты были получены в анализах при хранении в условиях стресса при $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ и относительной влажности $75\% \pm 5\%$, особенно в течение пяти недель, что позволяет различать тестируемые буферы и концентрации. Анализ CIEX-HPLC образцов, хранившихся в течение 5 недель при $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ и 75% относительной влажности $\pm 5\%$, показал, что в этот момент времени содержание основного компонента

упало ниже 60% для всех испытанных буферов и концентраций продукта. В композициях на основе гистидина наблюдали несколько меньшее снижение процентного содержания основного компонента по сравнению с композицией на основе ацетатного буфера.

Результаты анализа CE-SDS показали, что хранение в течение времени при 40°C привело к небольшому увеличению (до 5%) содержания низкомолекулярных частиц в продукте. Этот эффект был несколько более выражен для образцов с концентрацией 10 мг/мл в буферах 1 и 3. Тем не менее, антитело оказалось очень стабильным даже при хранении в течение 5 недель в условиях сильного стресса при 40°C $\pm$ 2°C и 75% относительной влажности $\pm$ 5%.

Данные по связыванию PSMA для образцов, хранившихся в течение 5 недель при 40°C $\pm$ 2°C и относительной влажности 75% $\pm$ 5%, показали значительное увеличение значения EC₅₀ для образцов с концентрацией 10 мг/мл в буферах 1 и 3. Увеличение значения EC₅₀, измеренное в анализе связывания PSMA, коррелировало с небольшим увеличением относительного количества HMW-видов, наблюдаемых в анализе SE-HPLC, которое соответственно составило от 0,3 и 0,2% до 0,6 и 0,7%.

Результаты стресс-тестов (замораживание/оттаивание (пять циклов), фотостабильность, перемешивание и окислительный стресс) показали другой рейтинг результатов, чем результаты исследования по температурной стабильности. В исследовании по температурной стабильности образцы с концентрацией 10 мг/мл в буфере 3 показали наибольшее количество результатов за пределами предварительно заданного аналитического порога, в то время как исследование устойчивости в стресс-тестах показало большее количество результатов за пределами предварительно заданного аналитического порога для образцов с концентрацией 0,5 мг/мл в буфере 1 по сравнению с другими условиями.

Анализ методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS) показал, что добавление метионина (присутствующего в буфере 2 и буфере 4) эффективно для предотвращения окисления продукта.

В заключение следует отметить, что антитело LV1050-Fc x 5C8var1-Fc было наиболее стабильно в композиции, приготовленной с буфером 2 и буфером 4. В таблице 8 обобщены рейтинги результатов, выраженных как сумма результатов анализов, показатели которых выходили за пределы предварительно заданного аналитического порога в

отношении температурной стабильности, стрессоустойчивости и общей стабильности (температура плюс стресс).

В качестве окончательного состава композиции выбран состав, состоящий из 10 мМ гистидина + 280 мМ сахарозы + 0,02% полисорбата 80, рН 6,0 + 1 мМ метионина при концентрации белка от 0,5 до 10 мг/мл.

Таблица 8: Сумма результатов анализов, показатели в которых выходили за пределы предварительно заданного аналитического порога в отношении температурной стабильности, стрессоустойчивости и общей стабильности (температура плюс стресс)

Буфер	Буфер 1		Буфер 2		Буфер 3		Буфер 4	
Конц. белка (мг/мл)	0,5	10	0,5	10	0,5	10	0,5	10
Температурная стабильность	0	2	0	0	1	6	0	0
Стрессоустойчивость	11	5	5	4	5	5	5	4
Общая стабильность	11	7	5	4	6	11	5	4

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мультиспецифическое антитело, содержащее первую антигенсвязывающую область, способную связывать PSMA человека, и вторую антигенсвязывающую область, способную связывать V γ 9V δ 2 рецептор Т-клеток человека.
2. Мультиспецифическое антитело по п.1, где мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело.
3. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором первая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело.
4. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором вторая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело.
5. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором мультиспецифическое антитело конкурирует за связывание с PSMA человека с антителом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и при этом мультиспецифическое антитело предпочтительно связывает тот же самый эпитоп на PSMA человека, что и антитело, имеющее последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.
6. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, представленную в SEQ ID NO: 14, последовательность CDR2 VH, представленную в SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR3 VH, представленной в SEQ ID NO: 16.
7. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором первая антигенсвязывающая область является гуманизированной, при этом первая антигенсвязывающая область предпочтительно содержит или состоит из: последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, или последовательности, которая по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 92%, например по меньшей мере на 94%, например по меньшей мере на 96%, например по меньшей мере на 98% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.
8. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где мультиспецифическое антитело способно активировать V γ 9V δ 2 Т-клетки человека.
9. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где мультиспецифическое антитело способно связываться с V δ 2 человека.

10. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где мультиспецифическое антитело конкурирует за связывание с Vδ2 человека с антителом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или конкурирует за связывание с Vδ2 человека с антителом, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

11. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где мультиспецифическое антитело связывает тот же эпитоп на Vδ2 человека, что и антитело, имеющее последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или связывает тот же эпитоп на Vδ2 человека, что и антитело, имеющее последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

12. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, представленную в SEQ ID NO: 17, последовательность CDR2 VH, представленную в SEQ ID NO: 18, и последовательность CDR3 VH, представленную в SEQ ID NO: 19, или содержит последовательность CDR1 VH, представленную в SEQ ID NO: 21, последовательность CDR2 VH, представленную в SEQ ID NO: 22, и последовательность CDR3 VH, представленную в SEQ ID NO: 23.

13. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором вторая антигенсвязывающая область является гуманизированной, и при этом вторая антигенсвязывающая область предпочтительно содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, или последовательности, которая по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 92%, например по меньшей мере на 94%, например по меньшей мере на 96%, например по меньшей мере на 98% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5.

14. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, представленную в SEQ ID NO: 14, последовательность CDR2 VH, представленную в SEQ ID NO: 15, и последовательность CDR3 VH, представленной в SEQ ID NO: 16, и вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, представленную в SEQ ID NO: 15, последовательность CDR2 VH, представленную в SEQ ID NO: 18, и последовательность CDR3 VH, представленную в SEQ ID NO: 19.

15. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-8, где мультиспецифическое антитело способно связываться с V γ 9 человека.

16. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где мультиспецифическое антитело способно опосредовать гибель клеток, экспрессирующих PSMA, таких как клетки LNCaP, V γ 9V δ 2 Т-клетками.

17. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, где мультиспецифическое антитело способно опосредовать гибель клеток, экспрессирующих PSMA человека, у пациента с раком предстательной железы.

18. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором первая антигенсвязывающая область и вторая антигенсвязывающая область ковалентно связаны через пептидный линкер.

19. Мультиспецифическое антитело по п.18, в котором пептидный линкер содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6.

20. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором первая антигенсвязывающая область, способная связывать PSMA человека, расположена на N-конце второй антигенсвязывающей области, способной связывать V γ 9V δ 2 рецептор Т-клеток человека.

21. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором мультиспецифическое антитело дополнительно содержит домен продления периода полужизни.

22. Мультиспецифическое антитело по п.20, где мультиспецифическое антитело имеет конечный период полужизни, превышающий приблизительно 168 часов, при его введении человеку.

23. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-17, 21 или 22, где мультиспецифическое антитело содержит Fc-участок.

24. Мультиспецифическое антитело по п.23, в котором Fc-участок представляет собой гетеродимер, содержащий два полипептида Fc, при этом первая антигенсвязывающая область слита с первым полипептидом Fc, а вторая антигенсвязывающая область слита со вторым полипептидом Fc, и при этом первый и второй полипептиды Fc содержат асимметричные аминокислотные мутации, которые

благоприятствуют образованию гетеродимеров, по сравнению с образованием гомодимеров.

25. Мультиспецифическое антитело по п.24, в котором CH3 области полипептидов Fc содержат указанные асимметричные аминокислотные мутации, и при этом предпочтительно, что первый полипептид Fc содержит замену T366W, а второй полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, или наоборот, где положения аминокислот соответствуют положениям аминокислот в IgG1 человека в соответствии с системой нумерации ЕС.

26. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 23-25, в котором цистеиновые остатки в положении 220 в первом и втором полипептидах Fc делетированы или заменены, где положения аминокислот соответствуют положениям аминокислот в IgG1 человека в соответствии с системой нумерации ЕС.

27. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 23-26, в котором первый и второй полипептиды Fc дополнительно содержат мутацию в положении 234 и/или 235, и при этом предпочтительно, что первый и второй полипептиды Fc содержат замену L234F и L235E, где положения аминокислот соответствуют положениям аминокислот в IgG1 человека в соответствии с системой нумерации ЕС.

28. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 23-27, в котором первая антигенсвязывающая область содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и при этом:

- первый полипептид Fc содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, а второй полипептид Fc содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, или

- первый полипептид Fc содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, а второй полипептид Fc содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемый эксципиент.

30. Фармацевтическая композиция по п.29, в которой мультиспецифическое антитело представляет собой антитело по любому из пп. 23-28, и фармацевтическая

композиция содержит буфер, сахарозу, полисорбат 80 и метионин, при этом рН композиции составляет от 5,4 до и 7,4, например от 5,4 до 6,1.

31. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-28 для применения в качестве лекарственного средства.

32. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-28 для применения при лечении рака.

33. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-28 для применения при лечении рака предстательной железы.

34. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-28 для применения при лечении рака, при котором PSMA экспрессируется на новообразованных сосудах опухоли или на ассоциированных с опухолью эндотелиальных клетках первичных или метастатических опухолей, включая колоректальный рак, рак легкого, рак молочной железы, рак эндометрия и яичников, рак желудка, почечно-клеточный рак, уротелиальный рак, гепатоцеллюлярный рак, плоскоклеточный рак полости рта, опухоли щитовидной железы и глиобластомы.

35. Мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-28 для применения при лечении аденоидно-кистозной карциномы головы и шеи.

36. Способ лечения заболевания, предусматривающий введение мультиспецифического антитела по любому из пп. 1-28 субъекту-человеку, нуждающемуся в этом.

37. Способ по п.36, в котором заболевание представляет собой рак.

38. Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая мультиспецифическое антитело по любому из пп. 1-28.

39. Вектор экспрессии, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты по п.38.

40. Клетка-хозяин, такая как клетка-хозяин млекопитающего, предпочтительно клетка СНО, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты по п.38 или вектор экспрессии по п.39.

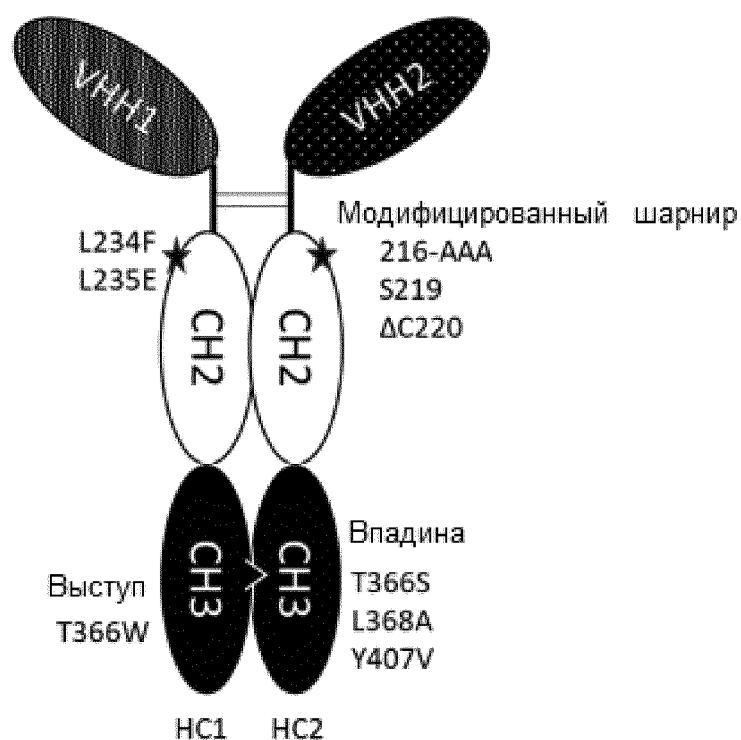
41. Способ получения мультиспецифического антитела по любому из пп. 1-28, предпочтительно мультиспецифического антитела по любому из пп. 23-28, путем коэкспрессии одной или нескольких конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих мультиспецифическое антитело в подходящей клетке-хозяине, такой как клетка

млекопитающего, предпочтительно клетка CHO, с последующей очисткой полученного рекомбинантного антитела.

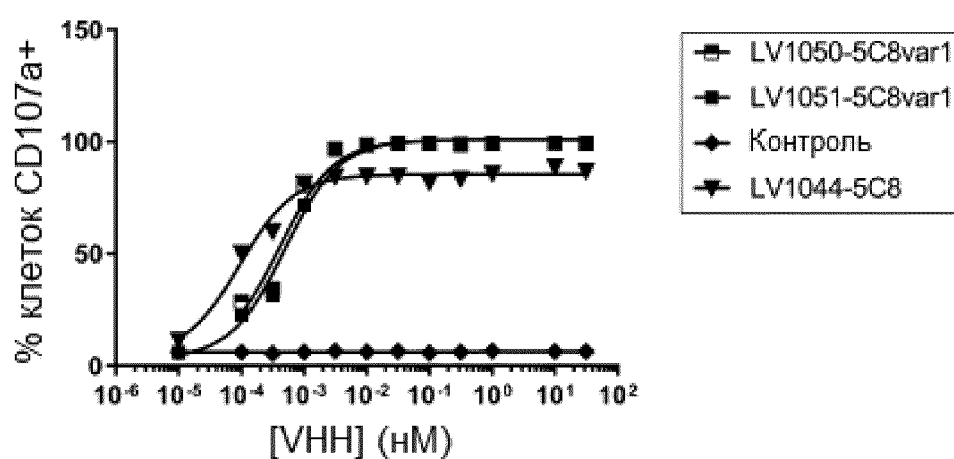
Фиг. 1

LV1044	EVQLVESGGGLVQPGGSLTISCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSS
LV1050	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSS
LV1051	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGLGTQVTVSS

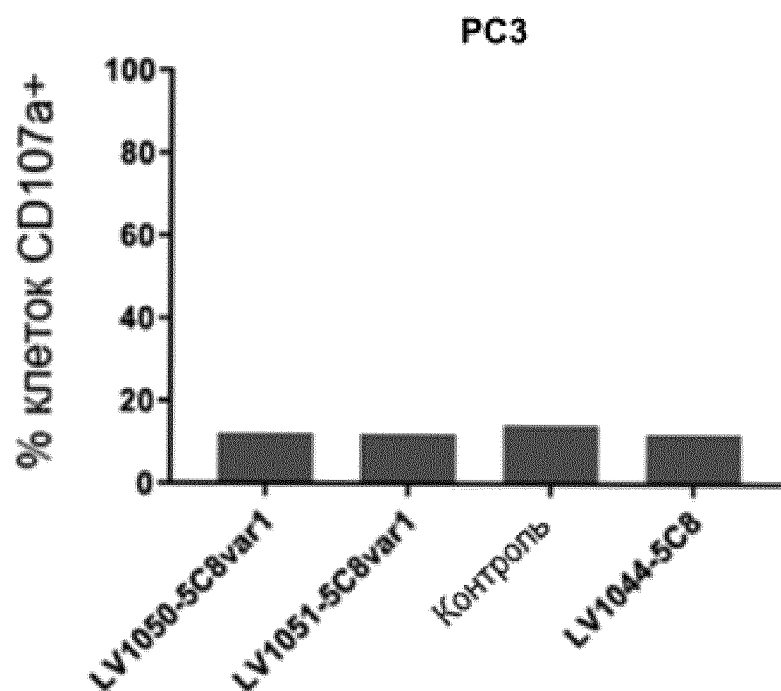
Фиг. 2



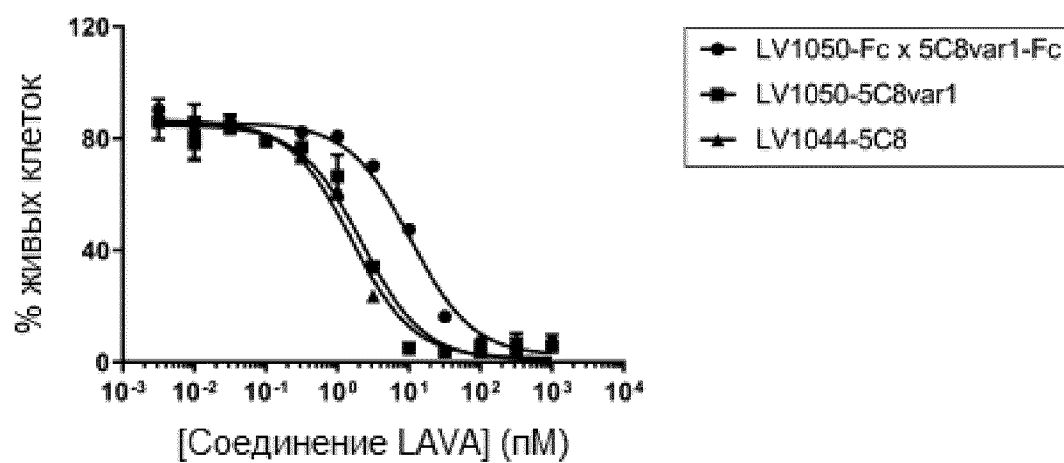
Фиг. 3А



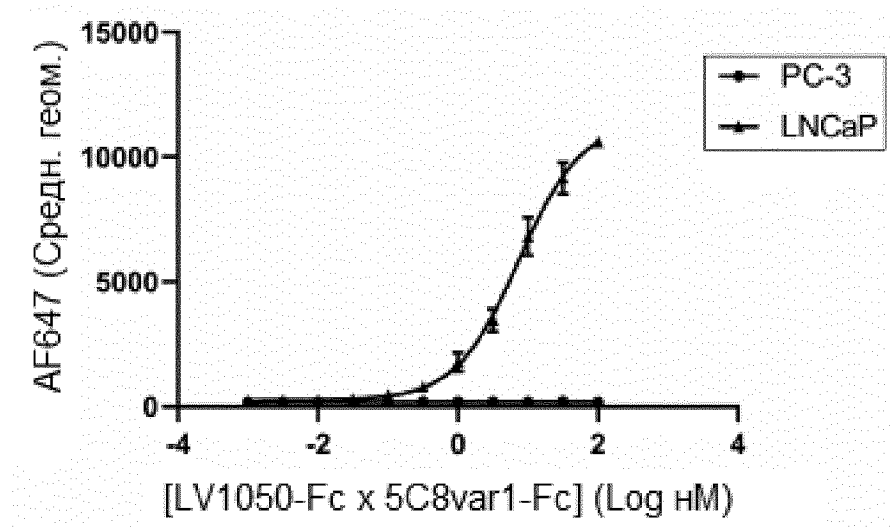
Фиг. 3В



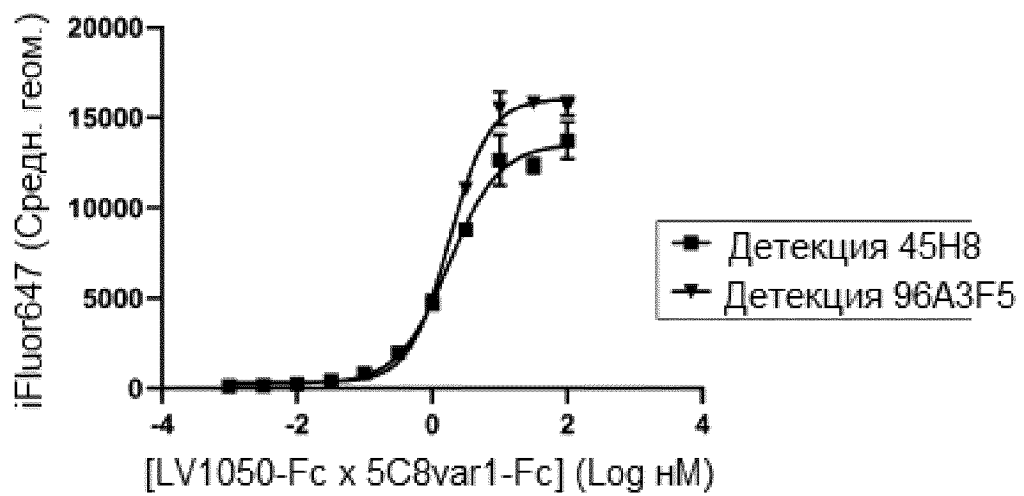
Фиг. 4



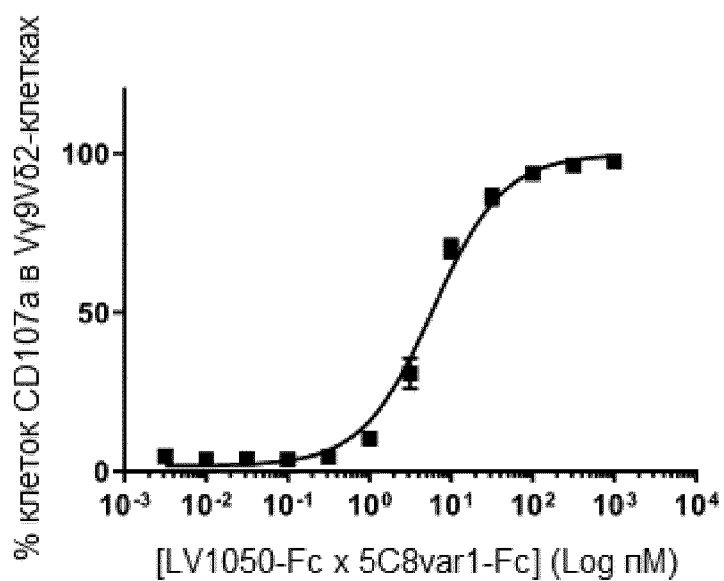
Фиг. 5А



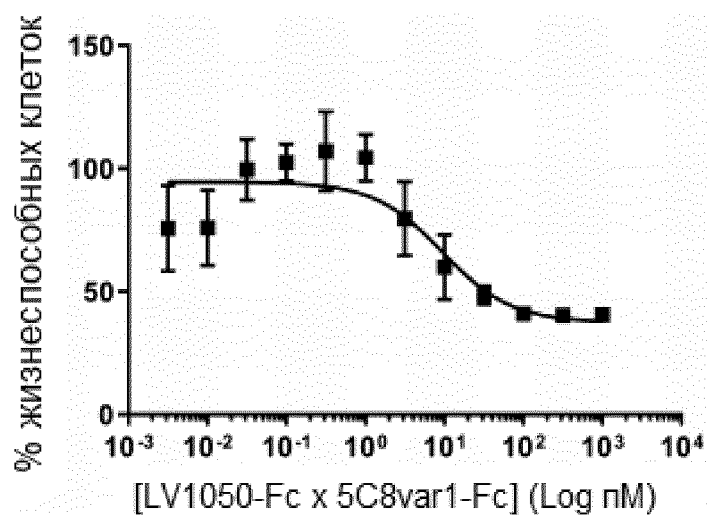
Фиг. 5В



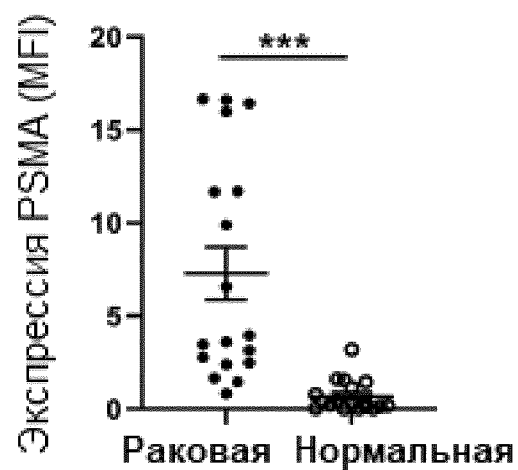
Фиг. 6А



Фиг. 6В

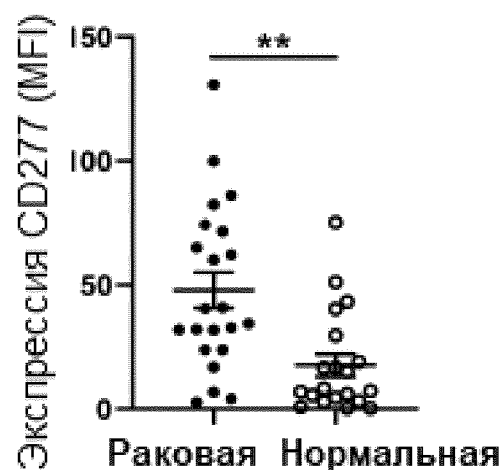


Фиг. 7А



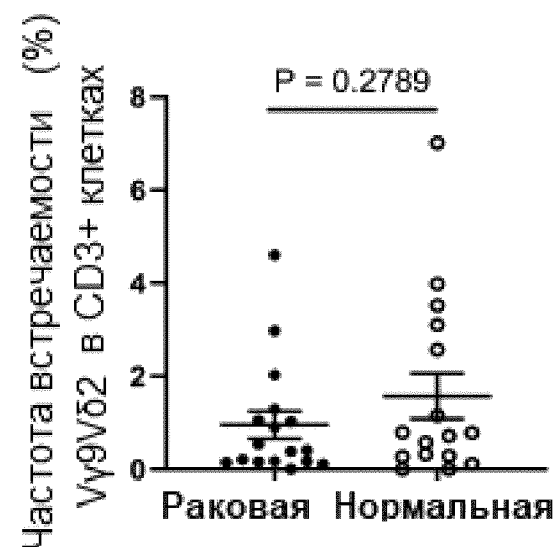
Рак.: n=18, средн. +/- SEM
 Норм.: n=17, средн. +/- SEM
 ***p < 0,001

Фиг. 7В



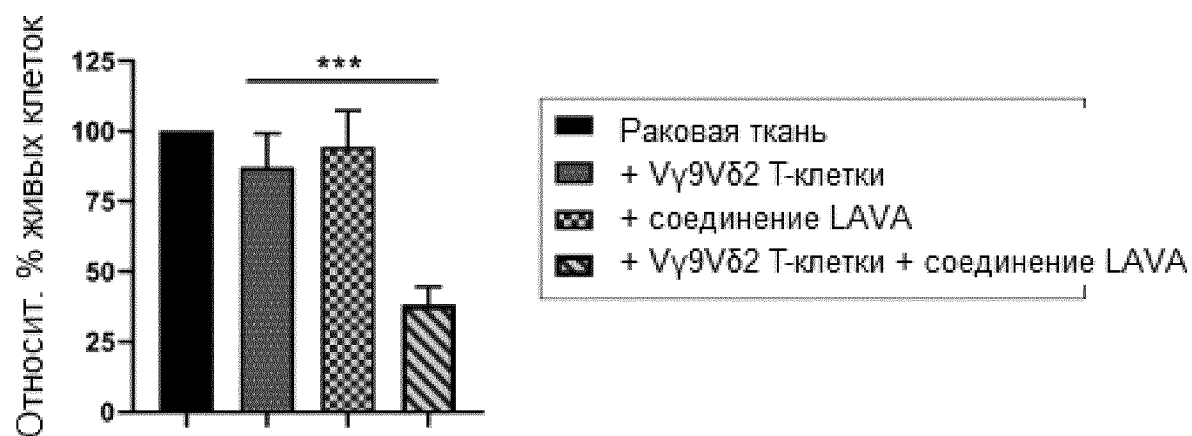
Рак.: n=22, средн. +/- SEM
 Норм.: n=20, средн. +/- SEM
 ***p < 0,01

Фиг. 7С

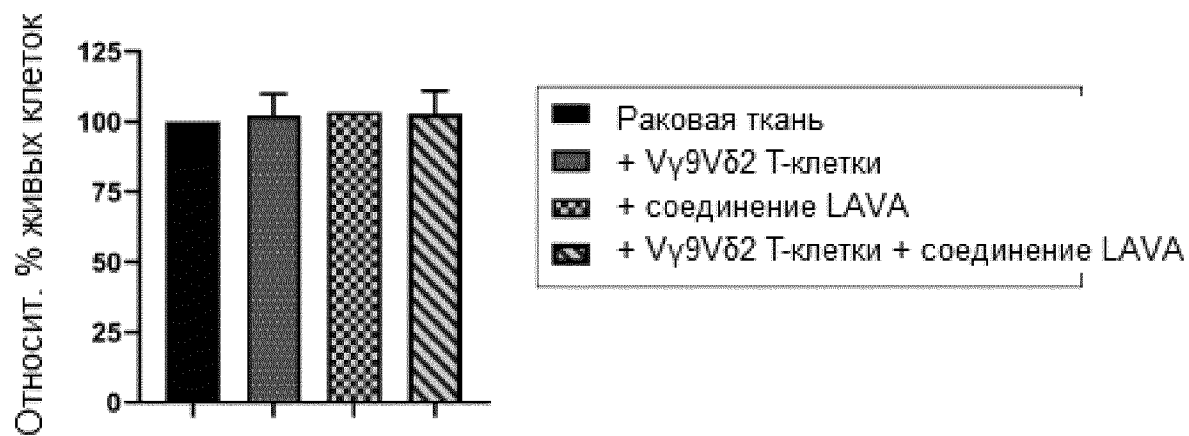


Рак.: n=17, средн. +/- SEM
 Норм.: n=16, средн. +/- SEM

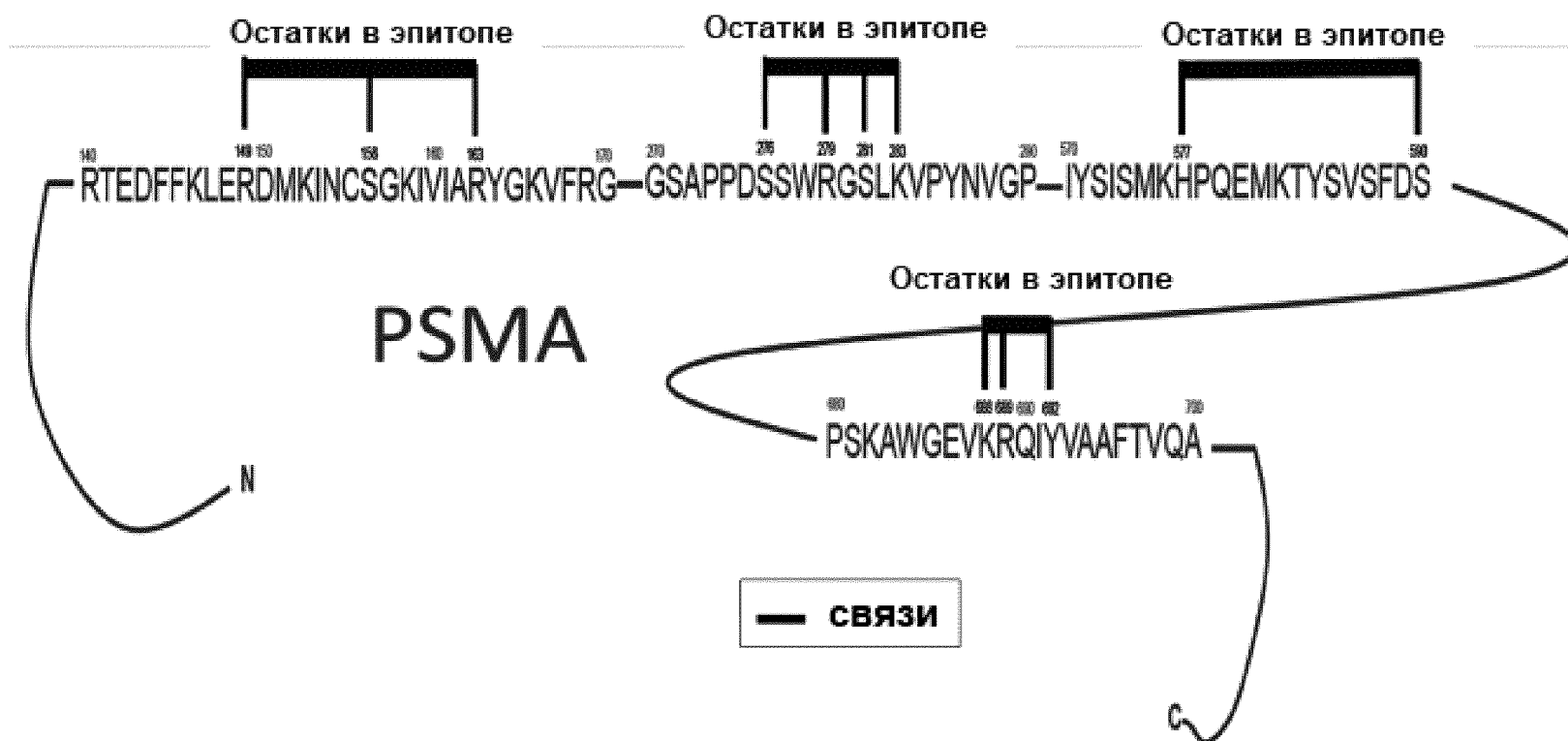
Фиг. 8А



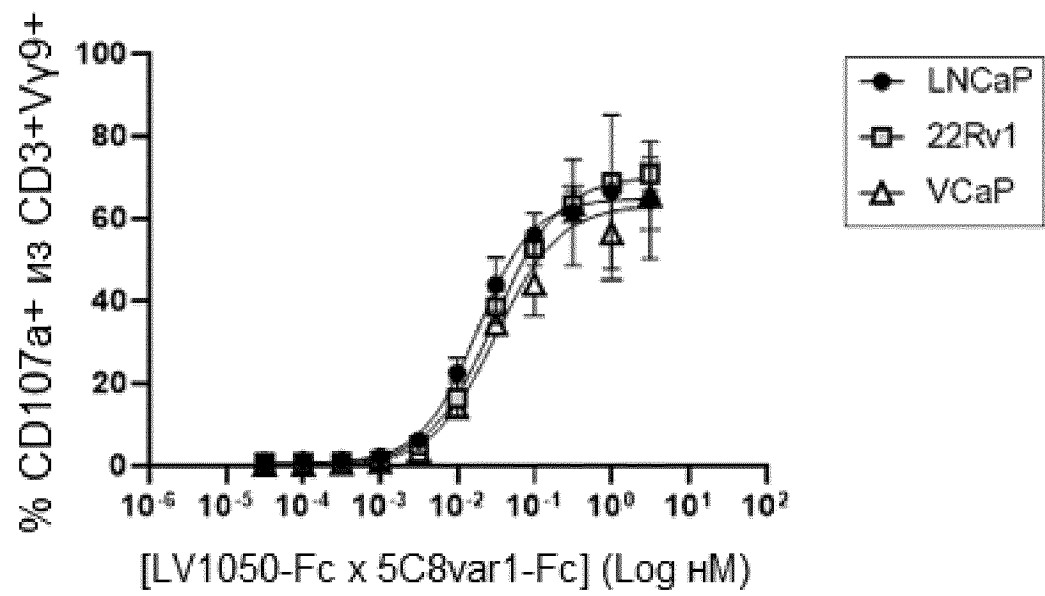
Фиг. 8В



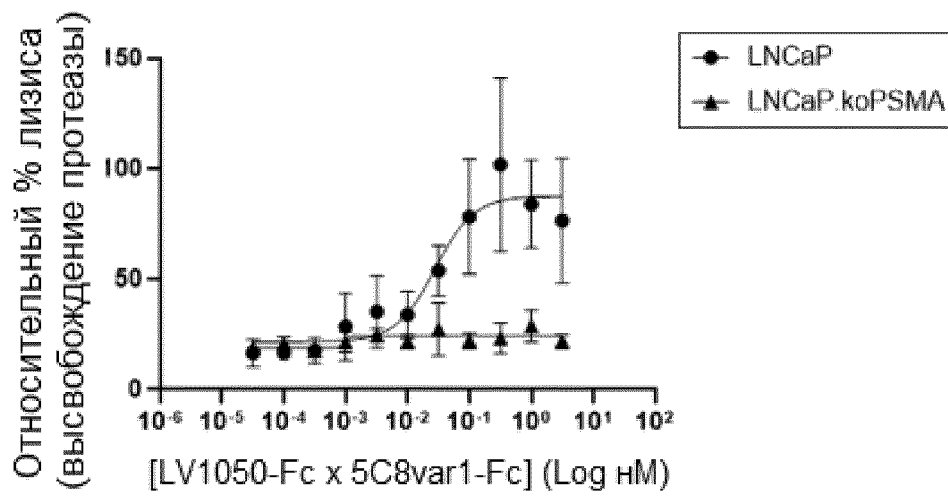
Фиг. 9



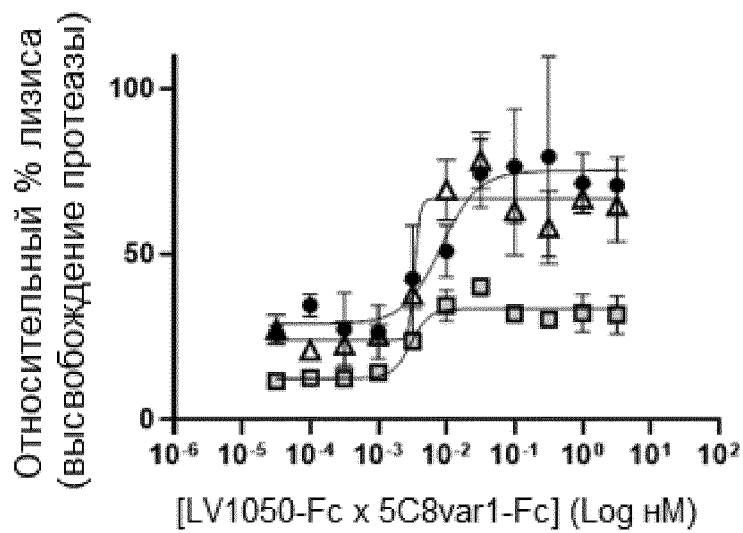
Фиг. 10



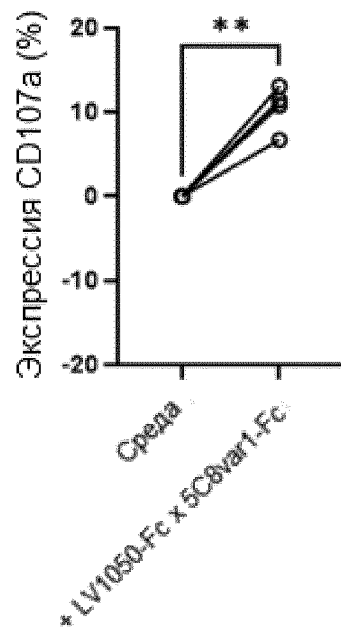
Фиг. 11А



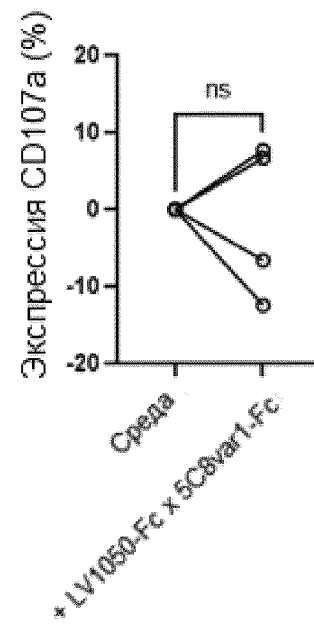
Фиг. 11В



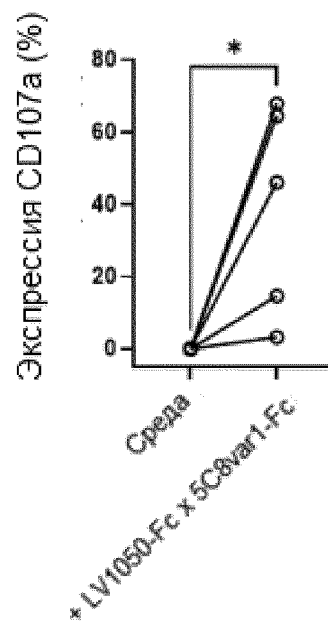
Фиг. 12А



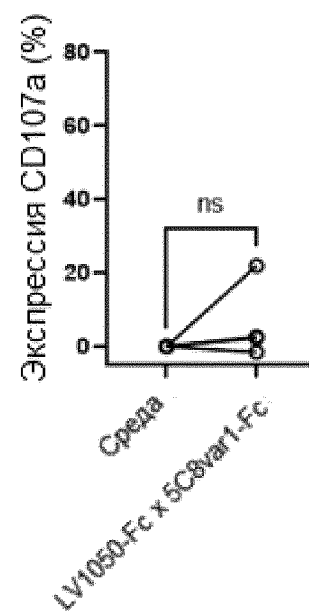
Фиг. 12В



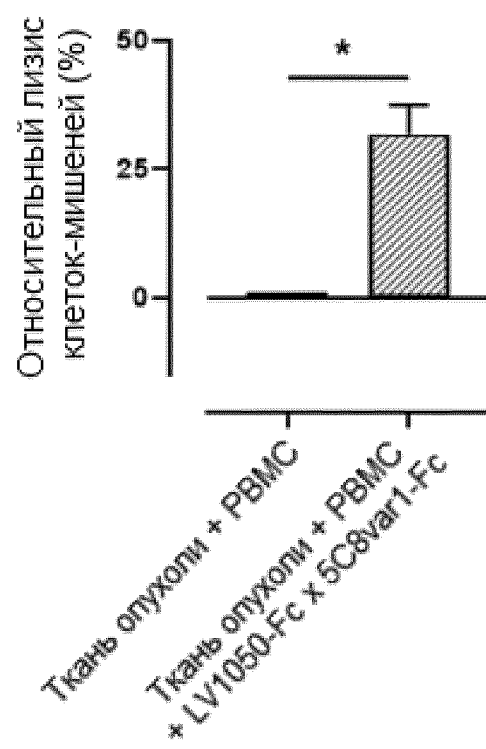
Фиг. 13А



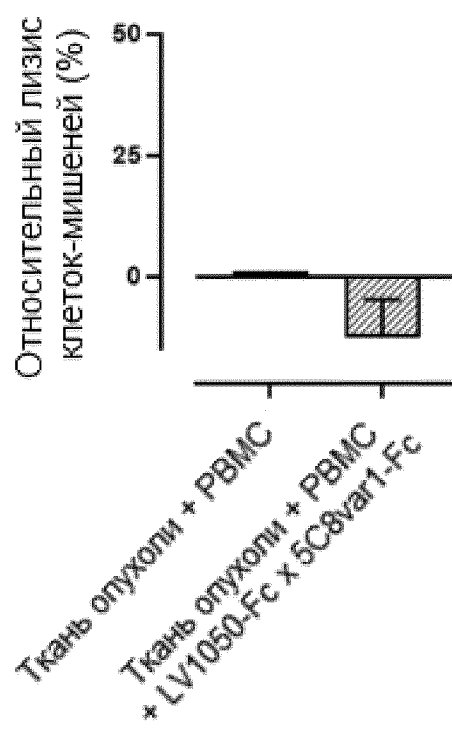
Фиг. 13В



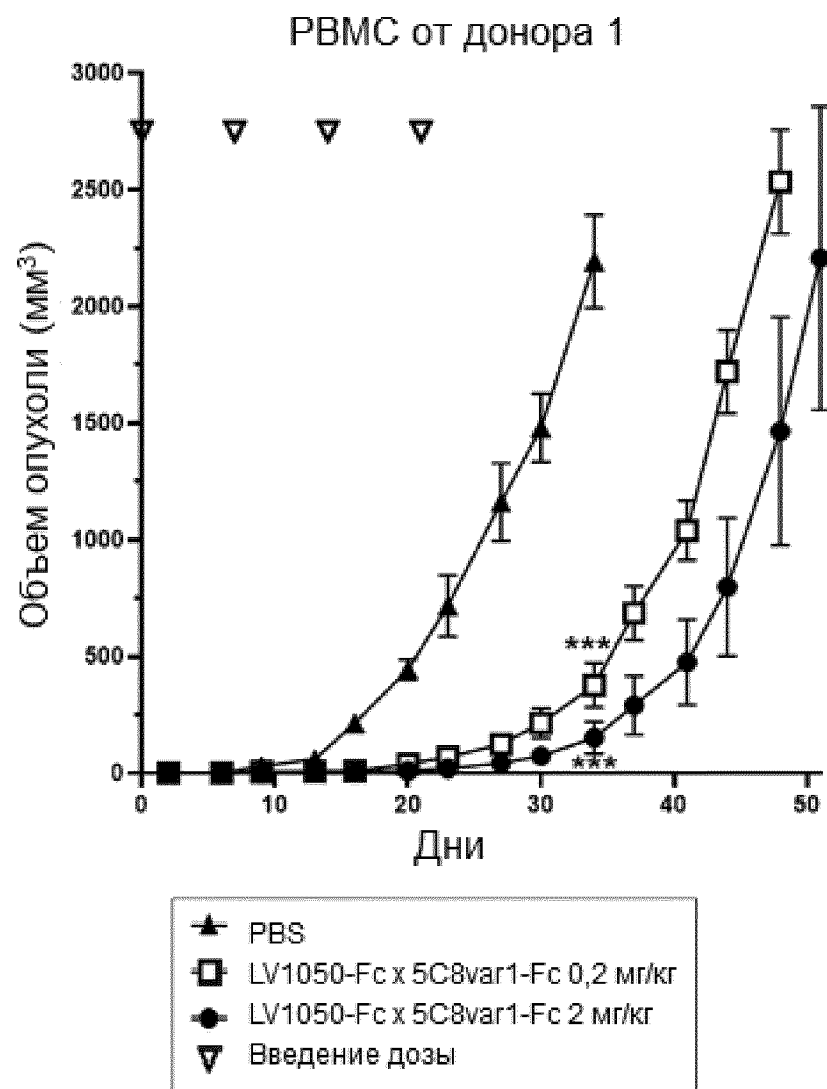
Фиг. 14А



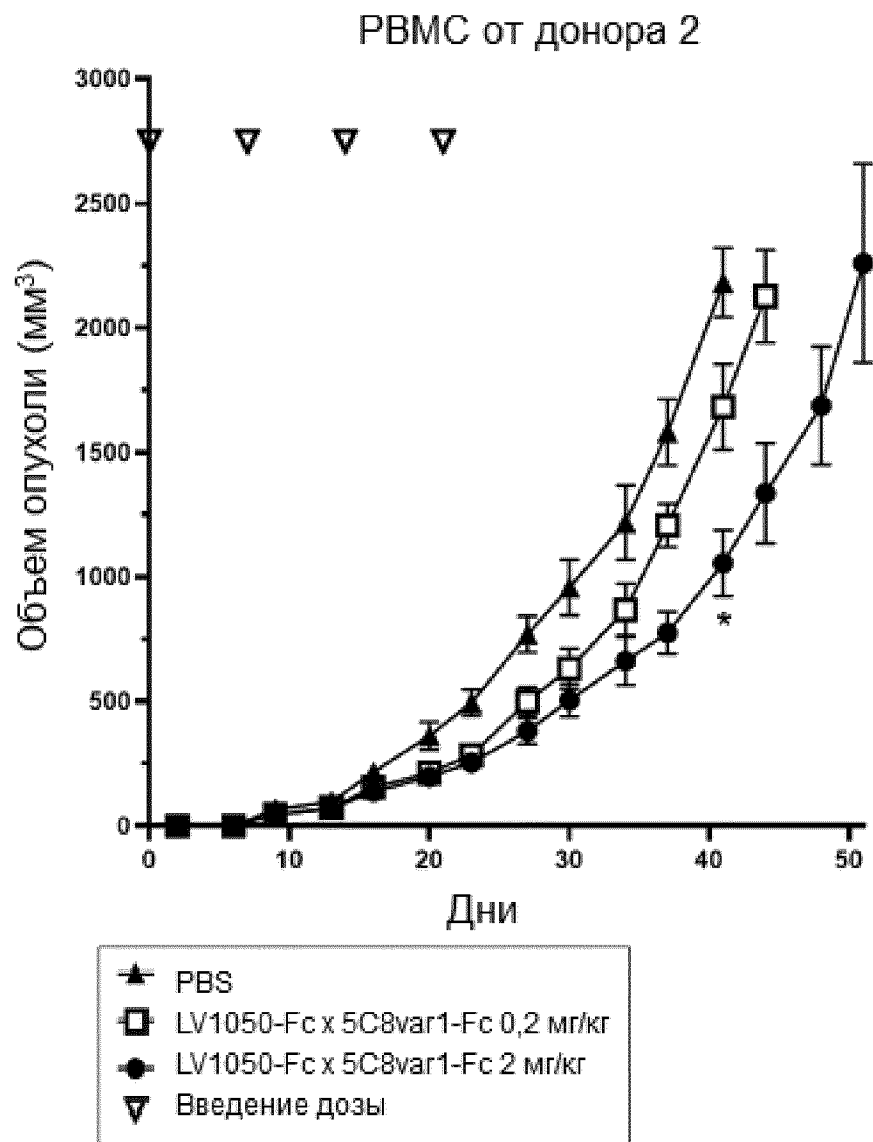
Фиг. 14В



Фиг. 15А

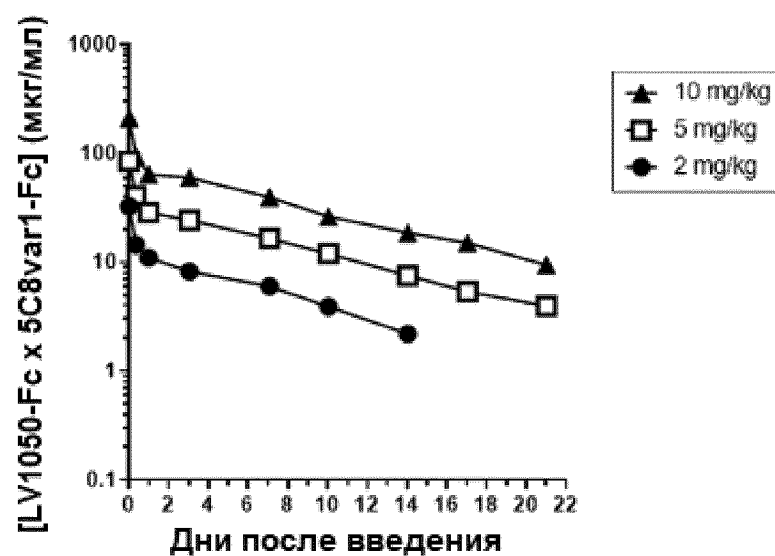


Фиг. 15В



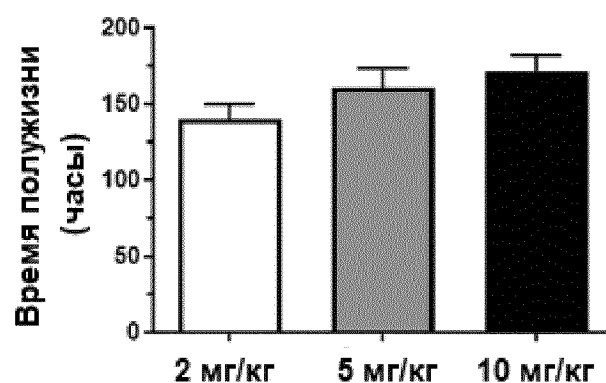
Фиг. 16А

Концентрация LV1050-Fc x 5C8var1-Fc



Фиг. 16В

Время полужизни LV1050-Fc x 5C8var1-Fc



Время полужизни (часы)

2 мг/кг 139,9 ± 10,2

5 мг/кг 160,2 ± 13,4

10 мг/кг 171,7 ± 10,6

Фиг. 17

