(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202390586 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.23

(22) Дата подачи заявки
2021.08.14

(51) Int. Cl. ***A61P 35/00*** (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01)

(54) ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К V-ОБЛАСТИ ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ДЕЛЬТА-ЦЕПИ 1 TCR

(31) **PCT/GB2020/051959; 2102222.3; 2102224.9**
(32) **2020.08.14; 2021.02.17; 2021.02.17**
(33) **GB**
(86) **PCT/IB2021/057509**
(87) **WO 2022/034562 2022.02.17**

(71) Заявитель:
ГАММАДЕЛЬТА ТЕРАПЬЮТИКС ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Уден Марк, Туна Михрибан, Маунт Натали, Гуд Роберт, Фридман Джошуа, Бхумбра Шефали, Нуссбаумер Оливер, Мехта Радж Джайсукхлал (GB)

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

(57) Изобретение относится к полиспецифическим, в частности биспецифическим, антителам и их фрагментам и вариантам, которые специфически связывают Т-клеточный рецептор гамма-дельта Т-клеток и еще один антиген. Более конкретно, настоящее изобретение обеспечивает по меньшей мере два новых класса биспецифических антител: биспецифические привлекающие Т-клетки активаторы, которые связывают V-область вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR) и раковый антиген или ассоциированный с раком антиген, и биспецифические двойные иммуномодуляторы (DI), которые связывают V-область вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR) и иммуномодулирующий антиген.

202390586 A1

202390586 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577191EA/032

ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К V-ОБЛАСТИ ВАРИАБЕЛЬНОГО ДОМЕНА ДЕЛЬТА-ЦЕПИ 1 TCR

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к полиспецифическим, в частности биспецифическим, антителам и их фрагментам и вариантам, которые специфически связывают Т-клеточный рецептор гамма-дельта Т-клеток и еще один антиген.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Растущий интерес к Т-клеточной иммунотерапии рака сфокусирован на очевидной способности субпопуляций CD8+ и CD4+ альфа-бета (αβ) Т-клеток распознавать раковые клетки и опосредовать иммунологические защитные функциональные потенциалы, в частности при дерепрессии клинически опосредованным антагонизмом ингибирующих путей, определяющихся PD-1, CTLA-4 и другими рецепторами. Однако αβ Т-клетки являются MHC-ограниченными, что может привести к болезни «трансплантат против хозяина».

Гамма-дельта Т-клетки (γδ Т-клетки) представляют собой субпопуляцию Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности отличающийся специфический γδ Т-клеточный рецептор (TCR). Этот TCR состоит из одной гамма (γ) и одной дельта (δ) цепи, каждая из которых подвергается перестройке цепи, однако имеет ограниченное количество V-генов по сравнению с αβ Т-клетками. Основными сегментами гена TRGV кодирующими Vγ, являются TRGV2, TRGV3, TRGV4, TRGV5, TRGV8, TRGV9 и TRGV11 и нефункциональные гены TRGV10, TRGV11, TRGVA и TRGVB. Наиболее частые сегменты гена TRDV кодируют Vδ1, Vδ2 и Vδ3, а также несколько V-сегментов, которые имеют обозначение Vδ и Vα (Adams et al., 296:30-40 (2015) Cell Immunol.). Человеческие γδ Т-клетки можно в общих чертах классифицировать на основании их цепей TCR, так как определенные типы γ и δ обнаруживаются на клетках чаще, хоть и не исключительно, в одном или более типах тканей. Например, большинство присущих крови γδ Т-клеток экспрессируют Vδ2 TCR, обычно Vγ9Vδ2, тогда как это является менее распространенным среди присущих тканям γδ Т-клеток, таких как клетки кожи, которые чаще используют Vδ1 TCR, спаренную с гамма-цепями, например, часто спаренную с Vγ4 в кишечнике.

γδ Т-клетки играют решающую роль в иммунном надзоре, распознавая злокачественные или трансформированные клетки (такие как раковые клетки) с помощью набора маркеров стресса, а затем проявляя мощную и селективную цитотоксичность. Поэтому γδ Т-клетки могут функционировать как регуляторы иммунного ответа. Модуляция этих клеток in situ дает возможность увеличить иммуногенность даже в опухолях с низкой мутационной нагрузкой, которые оказались неэффективными при использовании других видов иммунотерапии. Распознавание опухолей γδ Т-клетками не зависит от какого-либо одного опухолевого антигена, поэтому модуляторы γδ Т-клеток

могут применяться для лечения целого ряда заболеваний, включая гематологические и солидные злокачественные опухоли. Механизм распознавания γδ Т-клеток не ограничивается МНС.

Авторы WO2019147735 предполагают, что некоторые γδ клетки обладают проопухолевой активностью или ингибируют противораковый иммунный ответ, опосредованный αβ Т-клетками. Авторы утверждают, что γδ Т-клетки являются иммуносупрессантами, и поэтому предлагают истощать, подавлять или блокировать их при злокачественном новообразовании с помощью антител.

Однако, несмотря на доминирующее мнение о том, что антитела к γδ будут негативно модулировать функцию γδ клеток, блокируя или уничтожая такие клетки, было обнаружено, что существует положительная корреляция между инфильтрацией γδ Т-клеток и прогнозом и/или выживаемостью пациентов.

По сравнению с пониманием взаимодействия рецептора/лиганда αβ TCR, понимание взаимодействия рецептора vδ1 TCR/лиганда ограничено. В отсутствие такого понимания антитела, которые распознают vδ1 TCR, на сегодняшний день являются в значительной степени исследовательскими инструментами для изучения этого взаимодействия. Такие инструменты, как правило, представляют собой грубые блокирующие антитела, которые предполагают, что взаимодействие рецептора TCR/лиганда приводит к блокированию, подавлению или разрушению vδ1+ клеток. Например, инструментальные антитела TS8.2 и TS-1 используются в качестве блокирующих антител к γδ в исследованиях, которые предполагают, что указанные антитела снижают цитотоксичность vδ1 клеток. Эти исследования, в сочетании с другими, предполагают, что использование таких антител к vδ1 для благоприятной модуляции цитотоксичности vδ1 клеток в условиях заболевания in situ немыслимо, и поэтому существует потребность в антителах, которые увеличивают, а не снижают цитотоксичность vδ1.

Для использования γδ Т-клеток в иммунотерапии необходимы либо средства для экспансии клеток in situ, либо для их сбора и экспансии ex vivo перед реинфузией. Последний подход ранее был описан с использованием добавления экзогенных цитокинов, например, см. WO 2017/072367 и WO 2018/212808. Были описаны способы экспансии собственных γδ Т-клеток пациентов с использованием фармакологически модифицированных форм гидроксиметилбут-2-енилпирофосфата (HMBPP) или клинически одобренных аминобисфосфонатов. С помощью этих подходов лечили более 250 пациентов со злокачественным новообразованием, казалось бы, безопасно, но полная ремиссия наблюдалась лишь в редких случаях. Однако по-прежнему существует потребность в активирующих агентах, обладающих доказанной способностью к экспансии большого количества γδ Т-клеток.

Кроме того, весьма перспективным в качестве лекарственного препарата может быть связывающий или активирующий агент, способный предпочтительно нацеливаться

или связываться, или распознавать, или специфически модулировать, или увеличивать количество Vδ1+ клеток in situ.

Однако, хотя существуют лекарственные препараты, которые потенциально модулируют Vδ2+ клетки, включая аминобисфосфонаты, такие как Zometa® (золедроновая кислота), указанные лекарственные препараты в первую очередь предназначены для замедления костной реабсорбции. И независимо от указанной модуляции Vδ2+, существует необходимость в разработке лекарственных препаратов, специально предназначенных для связывания, нацеливания, модуляции, активации или увеличения количества Vδ1+ клеток. Это связано с тем, что, например, повторная модуляция Vδ2+ может привести к длительному и постепенно истощающемуся фенотипу.

Кроме того, учитывая преобладающую тканерезидентную природу Vδ1+, идеальный лекарственный препарат, способный модулировать Vδ1+, также будет проявлять меньше «нецелевых» нежелательных эффектов и быстрый почечный клиренс. Как правило, указанные нежелательные эффекты могут проявляться при использовании низкомолекулярных химических веществ. Например, вышеупомянутые аминобисфосфонаты, способные модулировать отдельный класс Vδ2+ клеток (в качестве вторичного эффекта по сравнению с первичным модулирующим эффектом на кости), связаны с почечной токсичностью, которая проявляется ухудшением почечной функции и потенциальной почечной недостаточностью (например, Markowitz et al. (2003) Kidney Int. 64(1):281-289). Дополнительные нежелательные эффекты, перечисленные Европейским медицинским агентством для Zometa, включают анемию, реакции гиперчувствительности, гипертонию, фибрилляцию артерий, миалгию, общую боль, недомогание, повышение уровня мочевины в крови, рвоту, отек суставов, боль в груди и т. д.

Необходимо также дополнительно учитывать среду in situ, в которой находятся vδ1+ клетки.Например, ранее было показано, что негематопоэтические присущие тканям γδ Т-клетки проявляли сильную пролиферативную реакцию при первом отделении от ткани, но только в том случае, если они не находились в прямом клеточном контакте с аутологичными фибробластами.Установлено, что для функционирования негематопоэтических присущих тканям Т-клеток (γδ Т-клеток) необходимо отделить их от негематопоэтических клеток (например, стромальных клеток, в частности, фибробластов). Это связано с тем, что прямой контакт лимфоцитов со стромальными или эпителиальными клетками, по-видимому, ингибирует экспансию присущих тканям γδ Т-клеток. Наблюдение, что предварительно активированные клетки in situ в дальнейшем находятся в подавленном состоянии, является еще одной причиной, по которой vδ1 клетки до настоящего времени не рассматривались в качестве перспективной терапевтической мишени. Действительно, до описанных в данном документе открытий не представлялось, как можно благоприятно и селективно модулировать эти клетки in situ, причем vδ1+ клетки крови и тканей, как правило, считаются «покоящимися», «предварительно активированными» или «неактивированными».

Различные форматы биспецифических и полиспецифических антител были разработаны для различных терапевтических целей. Би- и полиспецифические антитела можно разделить на отдельные, хотя и перекрывающиеся, классы, основанные на типах биологических мишеней и механизмах действия. Например, такие полиспецифические антитела можно разделить на классы, такие как перенаправляющие цитотоксические эффекторные клетки соединения (также известные как рекрутирующие Т-клетки биспецифические антитела, привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы, TCE или BiTE) и двойные иммуномодуляторы (DI).

TCE предназначены для усиления иммунного ответа пациента на опухоли путем нацеливания Т-клеток на опухолевые клетки или наоборот, и работают путем нацеливания на первый эпитоп комплекса Т-клеточного рецептора Т-клетки (обычно CD3) и второй эпитоп, который представляет собой раковый антиген или ассоциированный с раком антиген, такой как опухолеассоциированный антиген (TAA). Такие антитела обеспечивают совместную локализацию опухолевых клеток и Т-клеток, что способствует уничтожению опухолевых клеток. Примеры BiTE включают биспецифическое антитело к CD3 x CD19 блинатумомаб, биспецифическое антитело к CD3 x EpCAM катумаксомаб и биспецифическое антитело к CD3 x HER2 эртумаксомаб. TCE, такие как BiTE, как правило, представлены в формате scFv, хотя были представлены и в других форматах. Например, BiKE похожи на BiTE, но нацелены на CD16 на NK-клетках, а не на CD3.

Т-клеточный рецептор был описан как наиболее сложная рецепторная структура иммунной системы млекопитающих. Он включает трансмембранный многобелковый рецепторный комплекс, включающий Т-клеточный рецептор в непосредственной близости от ряда цепей CD3. Например, у млекопитающих типичный такой комплекс включает Т-клеточный рецептор, цепь CD3γ, цепь CD3δ и две цепи CD3ε. Эти цепи связываются с Т-клеточным рецептором (TCR) вместе с ζ-цепью (дзета-цепью), которые в сочетании затем образуют типичные сигналы активации в Т-лимфоцитах. Однако были зарегистрированы и альтернативные комплексы. Например, были описаны комплексы Т-клеточного рецептора, содержащие Т-клеточный рецептор и гомодимер дзета-цепи. Дополнительные корецепторы, такие как CD4 и CD8, также могут способствовать функционированию TCR.

Независимо от состава рецепторного комплекса, хорошо известно, что эти комплексы передают сигналы о связывании с клеточной поверхностью во внутриклеточный сигнальный каскад фосфорилирования. Такие события фосфорилирования завершаются активацией факторов транскрипции, таких как NFAT и NFkB, что приводит к увеличению экспрессии цитокинов и эффекторных белков, таких как гранзимы и перфорин.

Тем не менее, несмотря на то, что использование таких TCE для лечения злокачественного новообразования остается убедительной концепцией, на сегодняшний день и даже после 30 лет объединенных усилий по продвижению TCE на ранних стадиях клинических исследований многие из таких биспецифических антител

продемонстрировали низкую безопасность, эффективность и технологичность. Действительно, по состоянию на январь 2020 года блинатумомаб остается единственным одобренным TCE, который затем не был отозван. Этот полиспецифический фрагмент антитела TCE связывает комплекс Т-клеточного рецептора на первом связывающем плече и мишень CD19 на втором связывающем плече.

Рекрутирующие Т-клетки биспецифические антитела обсуждаются в Lejeune et al., 2020, Front Immunol., 11:762. Однако существующие биспецифические антитела этой категории, в частности те, которые рекрутируют Т-клетки посредством связывания с CD3, обладают существенными нецелевыми эффектами, которые приводят к серьезным побочным эффектам, учитывая эффективность антигена CD3 в качестве трансдуктора сигнала и его повсеместное присутствие в популяции Т-клеток пациента. Следовательно, для биспецифических агентов, нацеленных на CD3, таких как катумаксомаб (в настоящее время снят с производства), системная доставка (например, внутривенная) не является реальной перспективой. Вместо этого чаще предполагается более узконаправленная доставка, например, интраоперационная, интраперитонеальная, интраабдоминальная и т. д. Таким образом, это ограничивает опциональность и применение указанных биспецифических соединений в качестве лекарственных препаратов. Действительно, даже для эффектор-аттенуированных антител к CD3 (т. е. взаимодействующего с Т-клеточным комплексом активатора, нацеленного на CD3, но не биспецифического), связанная с этим токсичность затрудняет внутривенную доставку. Например, для ограничения воздействия и снижения токсичности в настоящее время чаще всего рассматривается возможность перорального введения антитела к CD3 форалумаба (например, при лечении заболеваний кишечника).

Часто утверждается, что многие из наблюдающихся в настоящее время проблем с такими TCE в ранних клинических исследованиях связаны с использованием высокоаффинных связывающих Т-клеточный комплекс доменов. Кроме того, было высказано предположение, что это происходит потому, что при разработке этих TCE не было уделено должного внимания низкой аффинности естественного связывания TCR-комплексов, и этому препятствовала тяжелая дозолимитирующая токсичность, что привело к чрезмерно узкому терапевтическому окну. В связи с этим было подчеркнуто, что многие ранние разработчики лекарственных препаратов TCE использовали три домена, связывающие Т-клеточный комплекс CD3, полученные из OKT3, SP34 и UCHT1. И все эти исходные связывающие домены связываются с относительно высокой аффинностью в диапазоне от однозначных до низких двухзначных чисел в нМ, что примерно в 1000 раз превышает аффинность для естественного связывания. В свою очередь было высказано предположение, что это может привести к совершенно разным (и часто неблагоприятным) эффектам в отношении активации Т-клеток по сравнению с естественным связыванием комплекса Т-клеточного рецептора. Например, разработчики TCE, использующие платформы, основанные на OKT3 с более высокой аффинностью,

могут быть сбиты с толку тем фактом, что OKT3 вызывают апоптоз Т-клеток в присутствии IL-2.

По этим причинам стало очевидным, что связывание комплексов Т-клеток с более низкой аффинностью является важным фактором для определения параметров дизайна терапевтических средств на основе привлекающих Т-клетки биспецифических антител.

Другой проблемой при разработке указанных TCE является необходимость ослабления функции Fc. Действительно, как правило, TCE требуют полного подавления Fc-опосредованных эффекторных функций, чтобы максимизировать терапевтическую эффективность и минимизировать нецелевую токсичность, поскольку связывание Fc с Fc-гамма-рецептором (FcγR) приводит к активации эффекторных иммунных клеток. В действительности, большинство нацеленных на CD3 биспецифических антител, которые в настоящее время используются в клинической практике, имеют домены Fc со сниженной активностью связывания с FcγR или преднамеренно представляют собой биспецифические фрагменты без области Fc. Обычно ожидается, что TCE с неаттенуированной функцией Fc будет индуцировать эффект антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и тем самым истощать популяцию γδ Т-клеток, распознаваемых антителом. Однако, опять же, ослабляя такую функциональность, чтобы избежать сложностей с токсичностью/безопасностью, можно также ослабить потенциально важные аспекты эффективности, например, взаимодействие с CD16+ или CD32+ или CD64+ иммунными клетками, или уменьшение периода полужизни биспецифического соединения (например, при использовании меньших фрагментов биспецифических антител, таких как BITE). Ожидается, что способы уменьшения взаимодействия FcγR и TCE (такие как использование формата IgG, предназначенного для уменьшения указанного взаимодействия) уменьшат Fc-опосредованную иммобилизацию TCE и уменьшат кластеризацию TCR путем перекрестного связывания с иммобилизованным TCE.

Для решения некоторых, но не всех этих проблем, многие компании, такие как Xencor (Пасадена, штат Калифорния), Macrogenics (Гейтерсбург, штат Мэриленд) и Genentech (Сан-Франциско, штат Калифорния), недавно сообщили о снижении аффинности плеча, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, на соответствующих платформах TCE. Однако снижение аффинности указанного связывания может привести к меньшей эффективности и меньшей опциональности с точки зрения дизайна и функциональности TCE. Например, в настоящее время продемонстрировано, что аффинность связывающих доменов в таких TCE определяет профиль распределения in vivo. В частности, как правило, наблюдается, что распределение TCE смещено в сторону мишени с наивысшей аффинностью. Следовательно, за счет снижения аффинности связывающего домена TCE к Т-клеточному комплексу обычно происходит смещение распределения от Т-клеток - тех самых клеток, которые необходимы для обеспечения эффективности таких TCE. Частично по этим причинам терапевтические окна для TCE были названы «запредельно узкими».

Таким образом, существует потребность в улучшенных лекарственных препаратах типа TCE, которые решают эти проблемы существующих терапий и кандидатных терапий, включая платформу, которая предоставляет больше возможностей и не зависит от деактивации или ослабления домена Fc, или от специфической аффинности к комплексу TCR, и обеспечивает более безопасное терапевтическое средство с уменьшенными неблагоприятными побочными эффектами.

Антитела по типу двойных иммуномодуляторов (DI) представляют собой антитела, которые связывают две различные иммуномодулирующие мишени. Иммуномодулирующие мишени включают, например, ингибиторы иммунных контрольных точек PD-L1, PD-1, OX40, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT и VISTA (см., например, Qin et al., 2019, Molecular cancer, 18:155). Типичные примеры соединений этого класса сочетают нацеливание на два иммуномодулирующих сигнальных пути. Примеры таких DI обычно содержат по меньшей мере два связывающих домена, где оба домена соответственно нацелены на эпитопы на двух отдельных белках-мишенях или комплексных белках, присутствующих на иммунных клетках, таких как Т-клетки. До настоящего времени не было придумано или не считалось возможным создать DI, нацеленный по меньшей мере на две иммуномодулирующие мишени, где одной из таких мишеней является δ1-цепь TCR, чтобы облегчить преодоление иммуносупрессивного опухолевого микроокружения и превратить его из «холодного» в «горячее», способствующего накоплению провоспалительных цитокинов и инфильтрации Т-клеток, а также уничтожению опухолевых клеток. Существующие подходы к DI изучаются в попытке снизить или преодолеть высокую токсичность, связанную с комбинированной терапией (а также повысить эффективность по сравнению с комбинированной терапией), но многие из них требуют тщательного контроля, а показатели успеха неоднозначны. Остается потребность в альтернативных иммуномодулирующих подходах для лечения таких патологических состояний, как злокачественное новообразование, и настоящее изобретение обеспечивает совершенно новый и альтернативный подход к антителам DI, который никогда ранее не рассматривался.

Следовательно, существует потребность в улучшенных лекарственных препаратах, в частности поли- и биспецифических антителах, для лечения инфекций, аутоиммунных состояний и злокачественного новообразования.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к полиспецифическим антителам, нацеленным на γδ Т-клетки и другой антиген. Соответственно, в первом аспекте изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с первым целевым эпитопом, причем первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп V-области вариабельного домена дельта-цепи (Vδ) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и второй целевой эпитоп. В предпочтительных вариантах осуществления полиспецифические антитела связываются с первым целевым эпитопом,

при этом первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп V-области вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и второй целевой эпитоп.

Полиспецифические антитела по настоящему изобретению можно разделить на два класса. Первые представляют собой полиспецифические антитела, которые являются привлекающими Т-клетки активаторами. Ко вторым относятся полиспецифические антитела, которые являются двойными иммуномодуляторами.

Соответственно, во втором аспекте изобретения предложено полиспецифическое антитело, которое специфически связывается с первым целевым эпитопом, где первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп V-области вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и второй целевой эпитоп, где второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп ракового антигена или ассоциированного с раком антигена.

В третьем аспекте изобретения предложено полиспецифическое антитело, которое специфически связывается с первым целевым эпитопом, где первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп V-области вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и второй целевой эпитоп, где второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп иммуномодулирующего антигена.

В четвертом аспекте изобретения предложена полинуклеотидная последовательность, кодирующая полиспецифическое антитело или его фрагмент по изобретению.

В пятом аспекте изобретения предложен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность по изобретению. Также предложена клетка-хозяин, содержащая полинуклеотидную последовательность по изобретению или вектор экспрессии по изобретению. Также предложен способ получения любого полиспецифического антитела или его фрагмента по изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина по изобретению в среде для культивирования клеток.

В еще одном аспекте изобретения предложена композиция, содержащая полиспецифическое антитело или его фрагмент по изобретению. Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая полиспецифическое антитело или его фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

В другом аспекте изобретения предложен набор, содержащий полиспецифическое антитело или его фрагмент по настоящему изобретению, или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, необязательно содержащий инструкции по применению и/или дополнительный терапевтически активный агент.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента по изобретению, или фармацевтической композиции по изобретению. Также предложен способ модулирования иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента по изобретению, или фармацевтической композиции по изобретению.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ получения фармацевтической композиции, включающий получение антитела, полученного в соответствии со способом получения полиспецифического антитела или его фрагмента по изобретению, и совместное составление полиспецифического антитела с по меньшей мере одним или более фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ получения полиспецифического антитела по изобретению, включающий стадии выбора первого моноспецифического антитела, которое специфически связывается с первым целевым эпитопом, где первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп V-области вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и объединение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента указанного первого антитела с антителом или его фрагментом, содержащим связывающий домен, нацеленный на второй эпитоп, с получением рекомбинантного полиспецифического антитела.

В еще одном аспекте изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент по настоящему изобретению, или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, или набор по настоящему изобретению для применения в медицине. Также предложено применение полиспецифического антитела или его фрагмента по изобретению в производстве лекарственного препарата.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1: Обнаружение антигена с непосредственным нанесением с использованием Ат к Vδ1 при помощи ИФА (REA173, Miltenyi Biotec). Обнаружение наблюдалось только с теми антигенами, которые содержат домен Vδ1. Формат лейциновой молнии (LZ) кажется более эффективным, чем формат Fc, что согласуется с клеточным конкурентным анализом на основе проточной цитометрии (данные не показаны).

Фиг. 2: Данные DELFIA для поликлональных фагов для селекции DV1. (A) Селекция гетеродимеров: гетеродимерный формат LZ TCR в раундах 1 и 2 с деселекцией гетеродимерного LZ TCR в обоих раундах. **(B)** Селекция гомодимеров: раунд 1 проводили с использованием гомодимерного Fc-слитого TCR с деселекцией Fc IgG1 человека, за которым следует раунд 2 для гетеродимерного LZ TCR с деселекцией гетеродимерного LZ TCR. Каждый график содержит две полосы для каждой цели, чтобы представить выборки из разных библиотек.

Фиг. 3: Захват IgG: слева) Сенсограммы взаимодействия IgG к L1 с L1, справа) стационарные аппроксимации, если они доступны. Все эксперименты выполняли при комнатной температуре на приборе MASS-2. Стационарные аппроксимации в соответствии со связыванием Ленгмюра 1:1.

Фиг. 4: Результаты анализа снижения количества TCR для клонов 1245_P01_E07, 1252_P01_C08, 1245_P02_G04, 1245_P01_B07 и 1251_P02_C05 (**A**) или клонов 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06 1245_P01_G09, 1138_P01_B09, 1251_P02_G10 и 1252_P01_C08 (**B**).

Фиг. 5: Результаты анализа дегрануляции Т-клеток для клонов 1245_P01_E07, 1252_P01_C08, 1245_P02_G04, 1245_P01_B07 и 1251_P02_C05 (**A**) или клонов 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06, 1245_P01_G09, 1138_P01_B09, и 1251_P02_G10 (**B**).

Фиг. 6: Результаты для анализа уничтожения (анализ THP-1 на основе проточной цитометрии) для клонов 1245_P01_E07, 1252_P01_C08, 1245_P02_G04, 1245_P01_B07 и 1251_P02_C05 (**A**) или клонов 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06, 1245_P01_G09, 1138_P01_B09 и 1251_P02_G10 (**B**).

Фиг. 7: Общее количество клеток во время эксперимента 1 Примера 10. Образцы культивировали с различной концентрацией антител к Vδ1, описанных в данном документе, и сравнивали с образцами, культивируемыми с антителами сравнения или контролями. Графики демонстрируют общее количество клеток на (**A**) 7 день, (**B**) 14 день и (**C**) 18 день.

Фиг. 8: Анализ Vδ1 Т-клеток во время эксперимента 1 Примера 10.Графики демонстрируют (**A**) процент Т-клеток Vδ1, (**B**) количество Т-клеток Vδ1 и (**C**) кратность изменения Vδ1 в образцах на 18-й день.

Фиг. 9: Общее количество клеток во время эксперимента 2 из Примера 10. Образцы культивировали с различной концентрацией антител к Vδ1, описанных в данном документе, и сравнивали с образцами, культивируемыми с антителами сравнения или контролями. Графики демонстрируют общее количество клеток на (**A**) 7 день, (**B**) 11 день, (**C**) 14 день и (D) 17 день.

Фиг. 10: Анализ Vδ1 Т-клеток во время эксперимента 2 Примера 10. Графики демонстрируют (**A**) процент Т-клеток Vδ1, (**B**) количество Т-клеток Vδ1 и (**C**) кратность изменения Vδ1 в образцах на 17-й день.

Фиг. 11: Анализ клеточного состава. Типы клеток, присутствующие в образцах (включая клетки, отличные от Vδ1 клеток), измеряли на 17 день эксперимента 2. Клетки собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии на поверхностную экспрессию Vδ1, Vδ2 и αβTCR. Процентные значения также представлены в **таблице** 7.

Фиг. 12: Результаты анализа уничтожения на основе проточной цитометрии SYTOX. Функциональность клеток тестировали с использованием анализа уничтожения на основе проточной цитометрии SYTOX, а результаты представлены для (**A**) эксперимента 1 на 14 день с использованием клеток в соотношении эффектор-мишень (E:T) 10:1, и (**B**) эксперимента 2 на 17 день (после замораживания-оттаивания) с использованием клеток в соотношении 1:1 и 10:1 E:T.

Фиг. 13: Общее количество клеток после замораживания-оттаивания. На графике показано общее количество клеток после 7 дней культивирования клеток после замораживания-оттаивания для культур, которые приводили в контакт с антителами B07, C08, E07, G04 или OKT-3 до замораживания.

Фиг. 14: Мониторинг экспансии клеток. Общее количество клеток контролировали до 42 дня для клеток, культивируемых после замораживания-оттаивания.

Фиг. 15: Исследования эквивалентности связывания модифицированных антител к Vδ1.

Фиг. 16: Исследования эквивалентности связывания антитела к Vδ1 с антигеном Vδ1 зародышевой линии человека и его полиморфным вариантом.

Фиг. 17: Антитело к Vδ1 вызывало повышение уровня секреции цитокинов Vδ1+ клетками. Полученные из ткани γδ Т-клетки инкубировали с антителами, как указано. **(A)** Наблюдаемые уровни TNF-альфа. **(B)** Наблюдаемые уровни IFN-гамма.

Фиг. 18: Антитело к Vδ1, вызывающее увеличение уровней/активности гранзима B Vδ1+ клеток. Раковые клетки, совместно культивированные с γδ Т-клетками тканевого происхождения в течение одного часа при заданном соотношении 1:20 T:E и с указанными антителами. Результаты подчеркивают количество гранзима B, обнаруженного в раковых клетках в конце совместного культивирования.

Фиг. 19: Антитело к Vδ1 вызывает модуляцию и пролиферацию иммунных клеток в тканях человека. Биоптаты кожи человека (от пяти разных доноров) инкубировали в течение 21 дня в культуре с указанными антителами. **(A)** Количество жизнеспособных пан-γδ+ клеток. **(B)** Количество жизнеспособных Vδ1+ клеток. **(C)** Процент жизнеспособных, дважды положительных Vδ1+ CD25+ клеток.

Фиг. 20: Антитело к Vδ1 вызывало модуляцию и пролиферацию инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в опухолях человека. Исследования почечно-клеточной карциномы (ПКР) +/- антитела (A) Кратность увеличения Vδ1+ клеток TIL. (B) Общее количество Vδ1+ клеток TIL. (C) Пример стратегии гейтирования (D) Сравнительный фенотипический профиль поверхности Vδ1+ клеток TIL. (E) Анализ TIL Vδ1-отрицательной гейтированной фракции.

Фиг. 21: Антитело к Vδ1 вызывало усиление цитотоксичности, опосредованной Vδ1+, и цитотоксичности, специфичной для пораженных клеток. Анализы цитотоксичности/эффективности в модельных системах, включающих тройную культуру эффекторных Vδ1+ клеток, моноцитарных раковых клеток THP-1 и здоровых первичных моноцитов. **(A)** Количественное определение числа клеток THP-1 и моноцитов в тройной совместной культуре с γδ Т-клетками в присутствии моноклональных антител к Vδ1 или контролей. **(B)** Представление гистограммы, показывающее окно между специфическим уничтожением пораженных клеток и здоровыми непораженными клетками: левая гистограмма; кратное увеличение уничтожения пораженных клеток (THP-1) по сравнению с уничтожением здоровых клеток (первичные моноциты человека); правая гистограмма; те же данные, но представленные как гибель в процентах по сравнению с контролем **(C)** Сведенные в таблицу результаты, обобщающие процентное улучшение эффективности уничтожения эффекторными Vδ1+ клетками целевых клеток THP-1 +/- мкАт. **(D)** Сведенные в таблицу результаты значений EC50, рассчитанные из Фиг. (A), представлены в виде числа γδ Т-клеток, необходимого для обеспечения 50% уничтожения клеток THP-1.

Фиг. 22: Полиспецифические антитела усиливали цитотоксичность, опосредованную эффекторными Vδ1+ клетками. Нацеливание на антиген, ассоциированный с заболеванием соединительной ткани: **(A-D)** Пример совместного культивирования эффекторных Vδ1+ клеток с раковыми клетками A-431 +/- полиспецифические антитела, содержащие биспецифические связывающие фрагменты к Vδ1 x TAA (EGFR), где связывающий домен VL+VH к Vδ1 (к первой мишени) объединяется с доменом CH1-CH2-CH3 связывающего фрагмента к EGFR (со второй мишенью). **(E-H)** Пример совместного культивирования эффекторных Vδ1+ клеток с раковыми клетками A-431 +/- полиспецифические антитела, содержащие биспецифические связывающие фрагменты к Vδ1 x TAA (EGFR), где связывающий домен к Vδ1 (к первой мишени) содержит полноразмерное антитело (VH-CH1-CH2-CH3/VL-CL), затем объединенное со связывающим фрагментом scFv, полученным из цетуксимаба, к EGFR (ко второй мишени). **(I-J)** Альтернативный подход к представлению данных: Процентное улучшение, обеспечиваемое полиспецифическими антителами в отношении цитотоксичности эффекторных Vδ1+ клеток по отношению к EGFR+ клеткам по сравнению с составными частями.

Фиг. 23: Полиспецифические антитела вызывали усиление опосредованной Vδ1+ цитотоксичности и цитотоксичности, специфичной для пораженных клеток. Нацеливание на антиген, связанный с гемопоэтическим заболеванием (A) Соотношение E:T, необходимое для индуцирования 50% уничтожения клеток Raji (B) Процентное улучшение при добавлении полиспецифических антител к Vδ1-CD19

Фиг. 24: Биспецифические антитела к Vδ1/CD19 демонстрируют высокую аффинность связывания с Vδ1 человека и Vδ1 яванского макака, сравнимую с исходным моноклональным мкАт к Vδ1. Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) проводили с биспецифическим соединением к Vδ1/CD19 для оценки связывания с человеческим антигеном Vδ1 и CD19. Биспецифическое антитело связывает Vδ1 как человека, так и яванского макака, лишь с небольшим снижением аффинности к обоим антигенам.

Фиг. 25: Биспецифические привлекающие Т-клетки активаторы к Vδ1-CD19 усиливают цитотоксичность CD19+ целевых клеток и активацию γδT-клеток, не затрагивая при этом здоровые CD19+ B-клетки. (A) Экспрессию CD19 на раковых NALM-6, Raji, B-клетках и Vδ1 γδT-клетках определяли с помощью проточной цитометрии. (B-D) Влияние BiTE к Vδ1-CD19 на клетки NALM-6 (B), клетки Raji (C) и цитотоксичность B-клеток (D). Антитела титровали в присутствии 1:1 E:T с Vδ1 γδT-клетками в течение 12 часов. Процент живых клеток рассчитывали с помощью конфокальной микроскопии для многопараметрического анализа и нормализовали к количеству живых клеток в отсутствие Vδ1 γδT-клеток. (E) Гистограмма, представляющая процентное количество живых клеток через 12 часов совместного культивирования Vδ1 γδT-клеток либо с NALM-6, Raji, либо а B-клетками в присутствии BiTE к Vδ1 и контролей, как показано на (B), (C) и (D). (F-G) Влияние BiTE к Vδ1-CD19 на

поверхностную экспрессию Vδ1 TCR в присутствии целевых клеток NALM-6 (F) и здоровых B-клеток (G), как определено с помощью проточной цитометрии после четырехчасового совместного культивирования. (H) Гистограмма, представляющая максимальное процентное снижение количества TCR, представленное в (F) и (G) при максимальной концентрации (3 мкг/мл). (I-J) Влияние биспецифических соединений к Vδ1-CD19 на активацию CD107a на поверхности Vδ1 клеток в присутствии целевых клеток NALM-6 (I) и здоровых B-клеток (J), как определено с помощью проточной цитометрии через четыре часа совместного культивирования. (K) Повышение количества CD107a в B-клетках и клетках NALM-6. Все данные указывают среднее значение ± стандартное отклонение и являются репрезентативными для n=3. Блинатумомаб (BiTE к CD3-CD19) был включен в качестве контроля во все анализы.

Фиг. 26: Клоны к Vδ1 с созревшей аффинностью в биспецифическом формате связываются с Her2$^+$ целевыми клетками и проявляют усиленное связывание с γδT-клетками Vδ1 и повышенную цитотоксичность в отношении Her2$^+$ целевых клеток. (A) Экспрессия Her2 и Vδ1 на клеточной поверхности в линиях клеток рака молочной железы и Vδ1 γδT-клетках (B). (C-E) Связывание биспецифических антител к Vδ1-Her2 и контроля мкАт к Her2 (трастузумаб) с Her2+ (SK-BR-3 (C), BT-474 (D)), Her2$^-$ (MDA-MD-231 (E)) и Vδ1$^+$ клетками (F). (G-I) Процент живых клеток, оставшихся через 24 часа совместного культивирования в соотношении 1:1 E:T с Vδ1 γδT-клетками и клетками SK-BR-3 (G), BT-474 (H) и MDA-MB-231 (I) в присутствии биспецифических антител к Vδ1-Her2. (J) Гистограмма, представляющая процентное увеличение цитотоксичности через 24 часа Vδ1 γδT-клеток в присутствии биспецифических антител к Vδ1-Her2.

Фиг. 27: Биспецифические антитела к Vδ1/EGFR демонстрируют высокую аффинность связывания с EGFR человека и аффинность связывания Vδ1 человека, сравнимую с исходными мкАт. (A, B) Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) проводили с биспецифическим соединением к Vδ1/EGFR для оценки связывания с человеческим Vδ1 (A) и антигеном EGFR человека (B). Для целей сравнения были включены исходные мкАт, цетуксимаб и мкАт отрицательного контроля.

Фиг. 28: Биспецифическое антитело к Vδ1/EGFR связывается с EGFR+ целевыми клетками A431 и Vδ1 γδ-T-клетками. (A-D) Экспрессия EGFR на клеточной поверхности в линии клеток A431 и первичных Vδ1 γδT-клетках. **(E, F)** Уровень связывания биспецифических антител к Vδ1/EGFR с линией клеток A431 или первичными Vδ1 γδ-T-клетками. Целевые клетки окрашивали различными концентрациями антитела, а затем флуоресцентным антителом для обнаружения IgG человека. Все стадии инкубации выполняли при 4°C, и связывание мкАт определяли с помощью проточной цитометрии для измерения медианного уровня флуоресценции. Логарифмические четырехпараметрические кривые доза-ответ были построены с использованием GraphPad Prism 9.

Фиг. 29: Биспецифические антитела к Vδ1/EGFR индуцируют активацию и дегрануляцию EGFR-специфических Т-клеток, что приводит к повышению опосредованной γδ Т-клетками цитотоксичности целевых клеток A431.

(A) Экспрессия γδTCR на клеточной поверхности первичных Vδ1 γδ Т-клеток после культивирования с биспецифическими антителами в течение 24 часов в присутствии или в отсутствие клеток A431. **(B, C)** Количество жизнеспособных клеток A431 **(B)** и статус активации первичных Vδ1 γδ-Т-клеток после совместного культивирования в соотношении 1:1 с различными концентрациями антител в течение 24 часов. Жизнеспособность измеряли с помощью красителя жизнеспособности и статуса активации с использованием антитела к CD25. **(D)** Дегрануляция первичных Vδ1 γδ-Т-клеток после совместного культивирования с клетками A431 в соотношении 1:1 вместе с различными концентрациями антител в течение четырех часов. Дегрануляцию определяли путем добавления конъюгированного с флуорофором антитела к CD107α непосредственно в смесь клеток и антител в начале совместного культивирования. **(E)** Количество жизнеспособных клеток A431 после 24-часового совместного культивирования с 10 пМ антитела и различным количеством первичных Vδ1 γδ-Т-клеток. **(A-E)** Во всех случаях флуоресценцию определяли с помощью проточной цитометрии для измерения медианного уровня флуоресценции. Логарифмические четырехпараметрические кривые доза-ответ были построены с использованием GraphPad Prism 9. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение для двух биологических повторов

Фиг. 30: Снижение количества CD3. На **(A)** показана MFI vδ1 TCR при стимуляции антителом как показатель взаимодействия с мишенью мкАт. На **(B)** показана MFI экспрессии CD3 на положительно гейтированных vδ1 клетках. Стимуляция антителом к vδ1 приводила к взаимодействию с vδ1 клетками и снижению количества как vδ1, так и CD3 на vδ1 клетках.

Фиг. 31: Биспецифические антитела к Vδ1xFAPα усиливают активацию Vδ1 γδT-клеток и лизис FAPα$^+$ фибробластов. На **(A)** показана кинетика связывания антитела к Vδ1, моноклональных антител к FAPα и биспецифических антител к Vδ1xFAPα в отношении рекомбинантных человеческих Vδ1 и FAPα, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР). **(B, C)** Связывание антител к Vδ1 и антител к FAPα с FAPα$^+$ фибробластами **(B)** и Vδ1 γδT-клетками **(C).**

(D, E) Влияние биспецифических антител к Vδ1xFAPα и моноклональных контролей на снижение количества Vδ1 TCR на Vδ1 γδT-клетках в отсутствие **(D)** или в присутствии FAPα$^+$ фибробластов **(E). (F-G)** Влияние биспецифических антител к Vδ1xFAPα и моноклональных контролей на повышение количества CD107a на Vδ1 γδT-клетках в отсутствие **(F)** или в присутствии FAPα$^+$ фибробластов **(G). (H)** Влияние биспецифического антитела к Vδ1xFAPα и моноклональных контролей на лизис фибробластов Vδ1 γδT-клетками через 24 часа совместного культивирования. Процент живых клеток рассчитывали с помощью конфокальной микроскопии для

многопараметрического анализа и нормализовали к количеству живых клеток в отсутствие Vδ1 γδT-клеток.

Фиг. 32: Биспецифические антитела к Vδ1xMSLN усиливают активацию Vδ1 γδT-клеток и лизис MSLN$^+$ целевых клеток. (A) кинетика связывания моноклональных антител к Vδ1, к MSLN и биспецифических антител к Vδ1xMSLN в отношении рекомбинантного человеческого Vδ1 и MSLN, определенная методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР). **(B, C)** Связывание антител к Vδ1 и антител к MSLN с MSLN$^+$ клетками HeLa **(B)** и Vδ1 γδT-клетками **(C)**. **(D, E)** Влияние биспецифических и моноклональных антител к Vδ1xMSLN на снижение количества Vδ1 TCR на Vδ1 γδT-клетках в отсутствие **(D)** или в присутствии MSLN$^+$ клеток OVCAR-3 **(E)**. **(F, G)** Влияние биспецифических антител к Vδ1xMSLN и моноклональных контролей на повышение количества CD107a на Vδ1 γδT-клетках в отсутствие **(F)** или в присутствии MSLN$^+$ клеток OVCAR-3 **(G)**. **(H)** Влияние биспецифического антитела к Vδ1xMSLN и моноклональных контролей на лизис клеток HeLa Vδ1 γδT-клетками через 24 часа совместного культивирования. Процент живых клеток рассчитывали с помощью конфокальной микроскопии для многопараметрического анализа и нормализовали к количеству живых клеток в отсутствие Vδ1 γδT-клеток.

Фиг. 33: Биспецифические антитела к Vδ1xPD-1 усиливают активацию Vδ1 γδT-клеток и ингибируют блокаду контрольных точек PD-1$^+$ T-клеток. A) Анализ методом ППР антитела к Vδ1, антитела к PD-1, контроля IgG к RSV x анти-PD-1 и биспецифических антител к Vδ1xPD-1, связывающихся с рекомбинантными человеческими Vδ1 и PD-1**. B)** Двойное связывание биспецифических антител к Vδ1 и к PD-1 с рекомбинантными человеческими PD-1 и Vδ1, как определено с помощью ППР. **C)** Экспрессия PD-1 на CD4 и CD8 T-клетках, активированных Dynabead к CD3/CD28. **D)** Связывание антител к Vδ1 и к PD-1 с активированными PD-1$^+$ CD4 и CD8 T-клетками и Vδ1 γδT-клетками. **E)** Влияние биспецифических антител к Vδ1xPD-1 и моноклональных контролей на снижение количества Vδ1 TCR на Vδ1 γδT-клетках в отсутствие или в присутствии PD-1$^+$ CD4 T-клеток. **F)** EC50 биспецифических антител к Vδ1xPD-1 на снижение количества Vδ1 TCR на Vδ1 γδT-клетках в присутствии или в отсутствие PD-1$^+$ CD4 T-клеток. **G)** Влияние Vδ1-сшитого биспецифического антитела к Vδ1xPD-1 на активацию PD-1$^+$ T-клеток.

Фиг. 34: Биспецифические антитела к Vδ1×4-1BB усиливают активацию Vδ1 γδT-клеток и 4-1BB$^+$ T-клеток. A) Анализ методом ППР антитела к Vδ1, антитела к 4-1BB, контроля IgG к RSV x анти-4-1BB и биспецифических антител к Vδ1×4-1BB, связывающихся с рекомбинантными человеческими Vδ1 и 4-1BB. **B)** Двойное связывание биспецифических антител к Vδ1 и к 4-1BB с рекомбинантными человеческими 4-1BB и Vδ1, как определено с помощью ППР. **C)** Экспрессия 4-1BB на CD4 и CD8 T-клетках, активированных Dynabead к CD3/CD28. **D)** Связывание антител к Vδ1 и к 4-1BB с активированными 4-1BB$^+$ CD8 T-клетками и Vδ1 γδT-клетками. **E-F)** Влияние биспецифических антител к Vδ1×4-1BB и моноклональных контролей на снижение

количества Vδ1 TCR на Vδ1 γδT-клетках в отсутствие (**E**) или в присутствии 4-1BB$^+$ CD8 T-клеток (**F**). **G**) Влияние Vδ1-сшитого биспецифического антитела к Vδ1×4-1BB на активацию 4-1BB$^+$ T-клеток.

Фиг. 35: Биспецифические антитела к Vδ1xOX40 усиливают активацию Vδ1 γδT-клеток и OX40$^+$ T-клеток. A) Анализ методом ППР антитела к Vδ1, антитела к OX40, контроля IgG к RSV x анти-OX40 и биспецифических антител к Vδ1 x анти-OX40, связывающихся с рекомбинантными человеческими Vδ1 и OX40. **B**) Двойное связывание биспецифических антител к Vδ1 и к OX40 с рекомбинантными человеческими OX40 и Vδ1, как определено с помощью ППР. **C**) Экспрессия OX40 на CD4 и CD8 T-клетках, активированных Dynabead к CD3/CD28. **D**) Связывание антител к Vδ1 и к OX40 с активированными OX40$^+$ CD4 T-клетками и Vδ1 γδT-клетками. **E-F**) Влияние биспецифических антител к Vδ1xOX40 и моноклональных контролей на снижение количества Vδ1 TCR на Vδ1 γδT-клетках в отсутствие (**E**) или в присутствии OX40$^+$ CD4 T-клеток (**F**). **G**) Влияние Vδ1-сшитого биспецифического антитела к Vδ1xOX40 на активацию OX40$^+$ T-клеток.

Фиг. 36: Биспецифические антитела к Vδ1xTIGIT усиливают активацию Vδ1 γδT-клеток и ингибируют блокаду контрольных точек TIGIT$^+$ T-клеток. A) Анализ методом ППР антитела к Vδ1, антитела к TIGIT, контроля IgG к RSV x анти-TIGIT и биспецифических антител к Vδ1xTIGIT, связывающихся с рекомбинантными человеческими Vδ1 и TIGIT. **B**) Двойное связывание биспецифических антител к Vδ1 и к TIGIT с рекомбинантными человеческими TIGIT и Vδ1, как определено с помощью ППР. **C**) Экспрессия TIGIT на CD4 и CD8 T-клетках, активированных Dynabead к CD3/CD28. **D**) Связывание антител к Vδ1 и к TIGIT с активированными TIGIT$^+$ CD4 и CD8 T-клетками и Vδ1 γδT-клетками**. E**) Влияние биспецифических антител к Vδ1xTIGIT и моноклональных контролей на снижение количества Vδ1 TCR на Vδ1 γδT-клетках в отсутствие или в присутствии TIGIT$^+$ CD8 T-клеток. **F**) EC50 биспецифических антител к Vδ1xTIGIT на снижение количества Vδ1 TCR на Vδ1 γδT-клетках в присутствии или в отсутствие TIGIT$^+$ CD8 T-клеток. **G**) Влияние Vδ1-сшитого биспецифического антитела к Vδ1xTIGIT на активацию TIGIT$^+$ T-клеток.

Фиг. 37: Репортерный биологический анализ ADCC не демонстрирует ADCC в результате воздействия антител к vδ1. Целевые клетки, т.е. γδ инкубировали с эффекторными клетками для биоанализа ADCC в присутствии антител к vδ1, LAGA антител к vδ1 (нефункциональный Fc) и изотипического контроля к RSV. Сигнал люминесценции регистрировали в относительных световых единицах (RLU) и рассчитывали кратность индукции, как описано в способах. N=2 γδ донора (выполнено в технических повторностях) для «антитела к vδ1», «LAGA антитела к vδ1», «RSV», «OKT3». N=1 линии клеток Raji для условия «ритуксимаб+Raji» (в технических повторностях) и n=1 γδ доноры для условий «антитело к vδ1+эффектор» и «LAGA антитело к vδ1+эффектор» (выполнено в технических повторностях и в одну повторность, соответственно). Соотношение эффектор:мишень 3:1.

Фиг. 38: Биспецифические привлекающие Т-клетки активаторы к Vδ1-CD19 усиливают цитотоксичность в отношении CD19+ целевых клеток и активацию γδТ-клеток, не затрагивая при этом здоровые CD19+ В-клетки. A-F) Влияние биспецифических антител к Vδ1xCD19 и к CD3xCD19 на опосредованный γδ Т-клетками или αβ Т-клетками лизис клеток Raji или здоровых первичных В-клеток. Процент положительных Raji или здоровых первичных В-клеток определяли через 24 часа с помощью конфокальной микроскопии в тройных культурах: Vδ1 γδТ-клеток с клетками Raji (**A**) и первичными здоровыми В-клетками (**B**); тройные культуры αβТ-клеток с клетками Raji (**C**) и первичными здоровыми В-клетками (**D**); или четверные культуры Vδ1 γδТ-клеток и αβТ-клеток с клетками Raji (**E**) и первичными здоровыми В-клетками (**F**). **G-I**) Количественная оценка секреции IL-17A из γδТ-клеток или αβ Т-клеток через 24 часа после стимуляции биспецифическими антителами к Vδ1xCD19 и к CD3xCD19. Супернатанты клеточных культур из совместных культур клеток Raji, первичных В-клеток и: γδТ-клеток (**G**); или αβ Т-клеток (**H**); или γδТ-клеток и αβ Т-клеток (**I**), собирали и определяли секрецию IL-17A с помощью MSD. Пунктирные линии представляют самый низкий уровень количественного определения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новому классу полипецифических антител, нацеленных на вариабельный домен дельта-цепи, например, V-область вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) рецептора γδ Т-клеток (TCR) и второй антиген. Второй антиген может быть, например, раковым антигеном или ассоциированным с раком антигеном (таким как TAA), следовательно, антитело можно назвать привлекающим Т-клетки активатором (TCE). Альтернативно второй антиген может быть, например, иммуномодулирующим антигеном, и, таким образом, антитело может быть антителом по типу двойного иммуномодулятора.

TCE по настоящему изобретению обеспечивают несколько преимуществ по сравнению с TCE предшествующего уровня техники. В частности, TCE могут преодолеть многие проблемы, связанные с TCE предшествующего уровня техники, путем нацеливания на комплекс Т-клеточного рецептора с помощью совершенно нового и дискретного механизма. Действительно, путем специфического нацеливания на (и активации) комплекс Т-клеточного рецептора исключительно посредством связывания с эпитопом в домене TRDV1 реализуется ряд преимуществ, включая:

Взаимодействие только с субпопоряцией Т-клеток, а не всеми Т-клетками (например, взаимодействие с регуляторными Т-клетками при злокачественном новообразовании может быть нежелательным);

Взаимодействие только с субпопоряцией Т-клеток (TRDV1+ Т-клетки), которые преимущественно «присущи тканям» и присутствие которых часто положительно коррелирует с хорошим прогнозом при злокачественном новообразовании/опухоли;

Активация комплекса Т-клеточного рецептора посредством взаимодействия с TRDV1, что обеспечивает большую необязательность (например, увеличение аффинности

этого связывающего домена). Например, путем разработки рекомбинантных TCE, которые взаимодействуют с комплексом Т-клеточного рецептора исключительно через домен TRDV1, а не через CD3, повышенная аффинность может способствовать более предпочтительной функциональности. Например, TCE, связывающие TRDV1 с высокой аффинностью, могут активировать, но не истощать Т-клетки; и/или

Взаимодействие с комплексом TCE с помощью указанных новых средств и с помощью рекомбинантных TRDV1-связывающих доменов может привести к менее вредным эффектам и, таким образом, снизить потребность в ослаблении функциональности Fc в указанных фрагментах TCE. Затем это может обеспечить дополнительные возможности, например, позволяя TCE к TRDV1 взаимодействовать с TRDV1+ клетками через один связывающий домен, взаимодействуя со вторым типом клеток (например, раковые клетки) с помощью второго связывающего плеча и взаимодействуя с другими эффекторными клетками, такими как CD16+ или CD32+ или CD64+ иммунные клетки через функционирующий домен Fc.

Таким образом, благодаря открытиям, описанным в данном документе, авторы настоящего изобретения создали новый класс рекомбинантных TCE. В частности, авторы настоящего изобретения открыли новый класс TCE, которые взаимодействуют с Т-клеточным рецептором через домен TRDV1, а не через другие домены в указанных сигнальных комплексах Т-клеточного рецептора. В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили новый класс TCE, которые взаимодействуют с этим комплексом через активирующий эпитоп на TRDV1 и которые могут связываться с более высокой аффинностью, потенциально не вызывая некоторых из ранее описанных вредных эффектов, связанных с взаимодействием с высокоаффинным комплексом Т-клеточного рецептора. Кроме того, этот новый класс TCE может взаимодействовать таким образом, что также может обеспечиваться функциональность Fc дикого типа, что также обеспечивает дополнительный потенциал эффективности.

DI по настоящему изобретению обеспечивают совершенно новый способ двойного иммуномодулирующего воздействия на мишень, который является совершенно уникальным, обеспечивая огромный возможный спектр новых видов терапии, требующих иммуномодуляции, таких как злокачественное новообразование. Платформа DI по настоящему изобретению обеспечивает новый класс терапевтических средств, которые могут обеспечить важную альтернативу или улучшение существующих подходов DI. Ранее не предполагалось, что функция связывания, специфичная для TRDV1, как описано в данном документе, может быть включена в формат DI.

Полиспецифические антитела по изобретению также могут проявлять улучшенные свойства по сравнению с эквивалентными моноспецифическими антителами. Например, полиспецифические антитела по изобретению могут также проявлять улучшенные свойства по сравнению с моноспецифическими антителами, имеющими те же антигенсвязывающие домены, что и составные части полиспецифических антител. В некоторых вариантах осуществления, например, рекомбинантное полиспецифическое

антитело придает повышенную опосредованную гамма-дельта-Т-клетками цитотоксичность по отношению к пораженной клетке, экспрессирующей второй эпитоп, по сравнению с цитотоксичностью, придаваемой эквивалентным количеством указанного первого моноспецифического антитела. Полиспецифические антитела по изобретению могут также проявлять улучшенную цитотоксичность по отношению к пораженным клеткам, сохраняя при этом здоровые клетки.

Определения

Если не указано иное, все употребляемые в настоящем документе технические и научные термины имеют общепринятое значение, понятное специалисту в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. В контексте настоящего документа, следующие термины имеют значения, присвоенные им ниже.

Гамма-дельта (γδ) Т-клетки представляют собой небольшую субпопуляцию Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности отдельный определяющий Т-клеточный рецептор (TCR). Этот TCR состоит из одной гамма (γ) и одной дельта (δ) цепи. Каждая цепь содержит вариабельную (V) область, константную (C) область, трансмембранную область и цитоплазматический хвост. V-область содержит антигенсвязывающий сайт. Существует два основных подтипа γδ Т-клеток человека: один, который доминирует в периферической крови, и второй, который доминирует в негематопоэтических тканях. Эти два подтипа могут определяться по типу δ и/или γ, присутствующих на клетках. Например, γδ Т-клетки, которые преобладают в периферической крови, в первую очередь экспрессируют вариабельный домен дельта-цепи 2 (Vδ2). γδ Т-клетки, которые преобладают в негематопоэтических тканях (*m.e.* являются резидентными в тканях), в первую очередь экспрессируют V-область вариабельного домена дельта-цепи 1. Ссылки на «Vδ1 Т-клетки» или « Vδ1+Т-клетки» относятся к γδ Т-клеткам с Vδ1-цепью, *m.e.* $V\delta1^+$ клеткам.

Ссылки на «V-область вариабельного домена дельта-цепи 1» также могут обозначаться как Vδ1 или Vd1, а нуклеотидную последовательность, кодирующую цепь TCR, содержащую эту область, или белковый комплекс TCR, содержащий эту область, может обозначаться как «TRDV1». Антитела или их фрагменты, которые взаимодействуют с Vδ1цепью γδ TCR, являются эффективными антителами или их фрагментами, которые связываются с Vδ1, и могут упоминаться как «антитела к V-области вариабельного домена дельта-цепи 1 TCR или их фрагменты» или «антитела к Vδ1 или их фрагменты» или «антитела к TRDV1 или их фрагменты» или «антитела к TRDV1 или их фрагменты».

В данном документе сделаны дополнительные ссылки на другие дельта-цепи, такие как «V-область вариабельного домена дельта-цепи 2». Они могут быть обозначены аналогичным образом. Например, вариабельные домены дельта-цепей 2 могут обозначаться как Vδ2, тогда как нуклеотид, кодирующий цепь TCR, содержащую эту область, или белковый комплекс TCR, содержащий эту область, может обозначаться как «TRDV2». В предпочтительных воплощениях антитела или их фрагменты, которые

взаимодействуют с Vδ1-цепью γδ TCR, не взаимодействуют с другими дельта-цепями, такими как Vδ2. В изобретении антитела специфичны к TRDV1 и не связываются с TRDV2 (SEQ ID NO: 174) или другими антигенами, такими как TRDV3 (SEQ ID NO: 175).

В данном документе также сделаны ссылки на «вариабельные домены гамма-цепей». Они могут называться γ-цепями или Vγ, тогда как нуклеотидная последовательность, кодирующая цепь TCR, содержащую эту область, или белковый комплекс TCR, содержащий эту область, может обозначаться как TRGV. Например, TRGV4 относится к цепи Vγ4. В предпочтительных вариантах осуществления антитела или их фрагменты, которые взаимодействуют с Vδ1-цепью γδ TCR, не взаимодействуют с гамма-цепями, такими как Vγ4 (TRGV4, SEQ ID NO: 173). В предпочтительных вариантах осуществления антитела также не связываются и не взаимодействуют с другими доменами, присутствующими в γδ TCR, такими как TRDJ, TRDC, TRGJ или TRGC.

Термин «комплекс Т-клеточного рецептора» представляет собой комплекс белков, включающий «Т-клеточный рецептор» (или «TCR»), обнаруженный на поверхности Т-клеток, ответственный за распознавание множества антигенов. Комплекс Т-клеточного рецептора включает либо альфа- и бета-цепи Т-клеточного рецептора, либо, в случае гамма-дельта Т-клеток, гамма- и дельта-цепи Т-клеточного рецептора и до 6 дополнительных цепей или более, таких как CD3δ, CD3γ, CD3ε и CD3ζ, хотя точный состав комплексов Т-клеточных рецепторов может варьироваться. Комплекс Т-клеточного рецептора опосредует внутриклеточный сигналинг в Т-клетке, что может привести к активации Т-клетки.

Термин «антитело» включает в себя любую белковую конструкцию антитела, содержащую по меньшей мере один вариабельный домен антитела, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт (antigen binding site - ABS). Антитела включают в себя, помимо прочего, иммуноглобулины типов IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также все их подтипы). Общая структура иммуноглобулинов G (IgG), собранных из двух идентичных полипептидов тяжелой (H) цепи и двух идентичных полипептидов легкой (L) цепи, хорошо известна и является высококонсервативной у млекопитающих (Padlan (1994) Mol. Immunol. 31:169-217).

Обычное антитело или иммуноглобулин (Ig) представляет собой белок, содержащий четыре полипептидные цепи: две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи. Каждая цепь разделена на константную область и вариабельный домен. Вариабельные домены тяжелой (H) цепи в настоящем документе сокращенно обозначаются как VH, а вариабельные домены легкой (L) цепи в настоящем документе сокращенно обозначаются как VL. Эти домены, родственные им домены и домены, полученные из них, могут обозначаться в настоящем документе как вариабельные домены цепей иммуноглобулина. Домены VH и VL (также называемые области VH и VL) могут быть дополнительно поделены на области, называемые «определяющими комплементарность областями» («CDR»), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми «каркасными областями» («FR»). Каркасные и определяющие комплементарность области

были точно определены (Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition U.S. Department of Health and Human Services, (1991) NIH Publication Number 91-3242). Существуют также альтернативные правила нумерации последовательностей CDR, например, те, которые изложены в Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883 или как обобщено в IMGT.org в обычном антителе каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Тетрамер обычного антитела из двух тяжелых цепей иммуноглобулина и двух легких цепей иммуноглобулина образуется тяжелой и легкой цепями иммуноглобулина, связанными между собой, *например,* дисульфидными связями, и тяжелыми цепями, связанными аналогичным образом. Константная область тяжелой цепи включает в себя три домена CH1, CH2 и CH3. Константная область легкой цепи состоит из одного домена - CL. Вариабельный домен тяжелых цепей и вариабельный домен легких цепей представляют собой связывающие домены, которые взаимодействуют с антигеном. Константные области антител обычно опосредуют связывание антитела с тканями или факторами организма-хозяина, включая различные клетки иммунной системы (*например*, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Фрагмент антитела (который также может называться «антительный фрагмент», «фрагмент иммуноглобулина», «антигенсвязывающий фрагмент» или «антигенсвязывающий полипептид») в контексте данного документа относится к части антитела (или конструкции, которая содержит указанную часть), которая специфически связывается с мишенью - V-областью вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (*например*, молекула, в которой одна или большее количество цепей иммуноглобулина не являются полноразмерными, однако которая специфически связывается с мишенью). Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином фрагмент антитела, включают в себя:

(i) Fab-фрагмент (одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1);

(ii) F(ab')2-фрагмент (двухвалентный фрагмент, состоящий из двух Fab-фрагментов, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области);

(iii) Fd-фрагмент (состоящий из доменов VH и CH1);

(iv) Fv-фрагмент (состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела);

(v) одноцепочечный вариабельный фрагмент scFv (состоящий из доменов VL и VH, соединенных с использованием рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, который позволяет им быть в виде единой белковой цепи, в которой пары областей VL и VH образуют одновалентные молекулы);

(vi) VH (вариабельный домен цепи иммуноглобулина, состоящий из домена VH);

(vii) VL (вариабельный домен цепи иммуноглобулина, состоящий из домена VL);

(viii) однодоменное антитело (dAb, состоящее из домена VH или VL);

(ix) минитело (состоящее из пары фрагментов scFv, которые соединены посредством доменов CH3); и

(x) диатело (состоящее из нековалентного димера фрагментов scFv, которые состоят из домена VH одного антитела, соединенного посредством небольшого пептидного линкера с доменом VL другого антитела).

Фрагменты полиспецифических антител, упоминаемые в данном документе, представляют собой антигенсвязывающие фрагменты. Более конкретно, фрагменты полиспецифических антител связывают те же антигены, что и полные полиспецифические антитела. Например, фрагмент полиспецифического антитела, которое специфически связывает TRDV1 и второй антиген, также специфически связывает TRDV1 и тот же второй антиген.

Термин «антитело человека» относится к антителам, которые имеют вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Субъекты-люди, которым вводят указанные антитела человека, не генерируют межвидовые гуморальные ответы (например, ответы человеческого антимышиного антитела (HAMA)) на первичные аминокислоты, содержащиеся в указанных антителах. Указанные антитела человека могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфическим мутагенезом или соматической мутацией), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако термин не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты к человеческим каркасным последовательностям. Антитела человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, например, антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина, антитела, выделенные из рекомбинантной библиотеки комбинаторных антител человека, антитела, выделенные из животного (*например,* мыши), трансгенного по генам иммуноглобулина человека, или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК, также могут называться «рекомбинантными антителами человека».

Замена по меньшей мере одного аминокислотного остатка в каркасной области вариабельного домена иммуноглобулина нечеловеческого происхождения соответствующим остатком вариабельного домена человека называется «гуманизацией». Гуманизация вариабельного домена может снизить иммуногенность у людей.

«Специфичность» относится к числу разных типов антигенов или антигенных детерминант, с которыми может связываться определенное антитело или его фрагмент. Специфичность антитела - это способность антитела распознавать конкретный антиген как уникальный молекулярный объект и отличать его от других. Антитело, которое

«специфически связывается» с антигеном или эпитопом, является термином, хорошо известным в данной области техники. Молекула, как сообщается, проявляет «специфическое связывание», если она реагирует чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретным целевым антигеном или эпитопом, чем с альтернативными мишенями. Антитело «специфически связывается» с целевым антигеном или эпитопом, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими веществами.

Антитела по настоящему изобретению представляют собой полиспецифические антитела. «Полиспецифическое антитело» представляет собой антитело, способное одновременно или последовательно связывать множество различных эпитопов. Как правило, эпитопы не будут находиться на одном и том же антигене. Следовательно, полиспецифическое антитело обладает способностью селективно связываться с эпитопами, присутствующими на разных антигенах, посредством множества различных связывающих доменов. Это контрастирует с обычными моноспецифическими антителами, которые не обладают такой способностью. Скорее, «моноспецифическое антитело» имеет связывание, специфичное только для одного антигена, хотя они могут иметь несколько сайтов связывания для этого одного антигена (например, валентность полного человеческого антитела IgG равна 2, а валентность других антител может быть выше, но если антитело распознает только один антиген, оно все равно классифицируется как моноспецифическое антитело). Следовательно, полиспецифические антитела по изобретению связывают несколько различных антигенов одновременно и/или последовательно.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитела представляют собой биспецифические антитела. «Биспецифическое антитело» представляет собой антитело, способное одновременно и/или последовательно связывать два разных эпитопа. Как правило, эпитопы не будут находиться на одном и том же антигене. Следовательно, биспецифические антитела обладают способностью селективно связываться с двумя разными эпитопами, присутствующими на двух разных антигенах, через два разных связывающих домена. Это контрастирует с обычными моноспецифическими антителами, которые не обладают такой способностью. Следовательно, биспецифические антитела по изобретению связывают два разных антигена одновременно и/или последовательно.

«Аффинность», представленная равновесной константой для диссоциации антигена с антигенсвязывающим полипептидом (KD), является мерой силы связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим сайтом антитела (или его фрагмента): чем ниже значение KD, тем сильнее сила связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим полипептидом. В альтернативном варианте, аффинность также может быть выражена как константа аффинности (KA), которая составляет 1/KD. Аффинность может быть определена известными способами в зависимости от

конкретного антигена, представляющего интерес. Например, KD можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Считается, что любое значение KD менее 10^{-6} указывает на связывание. Специфическое связывание антитела или его фрагмента с антигеном или антигенной детерминантой может определяться любым пригодным способом, включая, например, анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания, такие как радиоиммуноанализы (РИА), иммуноферментные анализы (ИФА) и конкурентные сэндвич-анализы, равновесный диализ, равновесное связывание, гель-фильтрацию, ИФА, поверхностный плазмонный резонанс или спектроскопию (например, с помощью флуоресцентного анализа) и их различные варианты, известные в данной области техники.

«Авидность» является мерой силы связывания между антителом или его фрагментом и соответствующим антигеном. Авидность связана как с аффинностью между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим сайтом на антителе, так и числом соответствующих сайтов связывания, присутствующих на антителе.

«In situ» означает в естественном или первоначальном месте, вместо того, чтобы быть перемещенным в другое место. Например, Vδ1+ клетка in situ у пациента относится к vδ1 клетке in vivo, в отличие от клетки in vitro или ex vivo.

«Vδ1+ клетки тканей человека», и «гемопоэтические и кровяные Vδ1+ клетки», и «Vδ1+ инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL)» определены как Vδ1+ клетки, содержащиеся или полученные из тканей человека, или гемопоэтической и кровеносной систем, или опухолей человека, соответственно. Все указанные типы клеток могут быть идентифицированы по их (i) местоположению или месту, откуда они были получены, и (ii) их экспрессии Vδ1+ TCR.

«Модулирующие антитела» представляют собой антитела, которые вызывают измеримое изменение, включая, помимо прочего, измеримое изменение клеточного цикла, и/или количества клеток, и/или жизнеспособности клеток, и/или одного или большего количества маркеров клеточной поверхности, и /или секреции одной или большего количества секреторных молекул (например, цитокинов, хемокинов, лейкотриенов и т.д.) и/или функции (такой как цитотоксичность по отношению к целевой клетке или пораженной клетке) при контакта или связывания с клеткой, экспрессирующей мишень, с которой связывается указанное антитело. Способ «модулирования» клетки или их популяции относится к способу, в котором по меньшей мере одно измеримое изменение в указанной клетке или клетках или их секреции инициируется для образования одной или большего количества «модулированных клеток».

«Иммунный ответ» представляет собой измеримое изменение по меньшей мере одной клетки, или одного типа клеток, или одного эндокринного пути, или одного экзокринного пути иммунной системы (включая, помимо прочего, клеточно-опосредованный ответ, гуморальный ответ, цитокиновый ответ, хемокиновый ответ) при добавлении модулирующего антитела.

«Иммунная клетка» определяется как клетка иммунной системы, включая, помимо прочего, клетки CD34+, В-клетки, CD45+ клетки (общий антиген лимфоцитов), альфа-бета-Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, хелперные Т-клетки, плазматические клетки, нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эритроциты, тромбоциты, дендритные клетки, фагоциты, гранулоциты, врожденные лимфоидные клетки, естественные клетки-киллеры (NK) и гамма-дельта Т-клетки. Как правило, иммунные клетки классифицируют с помощью комбинаторного анализа молекул клеточной поверхности (например, с помощью проточной цитометрии) для идентификации или группировки или кластеризации с целью дифференциации иммунных клеток на субпопуляции. Затем клетки могут быть дополнительно подразделены с помощью соответствующего анализа. Например, CD45+ лимфоциты можно дополнительно подразделить на vδ-положительные популяции и vδ-отрицательные популяции.

«Модельные системы» представляют собой биологические модели или биологические имитации, предназначенные для помощи в понимании того, как лекарство, такое как антитело или его фрагмент, может функционировать в качестве лекарственного препарата для облегчения признака или симптома заболевания. Такие модели обычно включают использование пораженных клеток, непораженных клеток, здоровых клеток, эффекторных клеток, тканей и т. д. in vitro, ex vivo, и in vivo, и в которых изучают и сравнивают действие указанных лекарственных препаратов.

«Пораженные клетки» проявляют фенотип, связанный с прогрессированием заболевания, такого как рак, инфекция, например, вирусная инфекция, или воспалительное состояние или воспалительное заболевание. Например, пораженная клетка может быть опухолевой клеткой, клеткой аутоиммунной ткани или инфицированной вирусом клеткой. Соответственно, указанные пораженные клетки могут быть определены как опухолевые, инфицированные вирусом или воспалительные.

«Здоровые клетки» относятся к нормальным клеткам, которые не являются пораженными. Их также можно назвать «нормальными» или «непораженными» клетками. Непораженные клетки включают нераковые, неинфицированные или невоспалительные клетки. Указанные клетки часто используют наряду с соответствующими пораженными клетками для определения специфичности пораженных клеток, придаваемой лекарственным средством, и/или для лучшего понимания терапевтического индекса лекарственного средства.

«Специфичность к пораженным клеткам» является мерой того, насколько эффективно эффекторная клетка или ее популяция (такая как, например, популяция Vδ1+ клеток) различает и уничтожает пораженные клетки, такие как раковые клетки, сохраняя при этом непораженные или здоровые клетки. Этот потенциал может быть измерен в модельных системах и может включать сравнение склонности эффекторной клетки или популяции эффекторных клеток к избирательному уничтожению или лизису пораженных клеток с потенциалом указанной эффекторной клетки (клеток) к уничтожению или лизису непораженных или здоровых клеток. Указанная специфичность к пораженным клеткам

может информировать о потенциальном терапевтическом индексе лекарственного препарата.

«Повышенная специфичность к пораженным клеткам» описывает фенотип эффекторной клетки, такой как, например, Vδ1+ клетка или ее популяция, которая была модулирована для дальнейшего повышения ее способности специфически уничтожать пораженные клетки. Это усиление может быть измерено различными способами, включая кратное изменение или процентное увеличение специфичности или селективности уничтожения пораженных клеток.

«ADCC» или «антителозависимая клеточная цитотоксичность» описывает иммунный ответ на клетки, покрытые антителами, связанными с поверхностными антигенами клетки. Это клеточно-опосредованный процесс, при котором иммунная эффекторная клетка (например, NK-клетка) распознает связанные с клеткой антитела, вызывая дегрануляцию и лизис клетки-мишени. Как правило, это опосредовано взаимодействиями Fc-Fcγ. Область Fc связанного с клеткой антитела рекрутирует эффекторные клетки, экспрессирующие Fcγ-рецепторы (например, NK-клеток), что приводит к дегрануляции эффекторных клеток и гибели целевой клетки.

«Функциональная Fc» относится к антителу, которое содержит функциональную область Fc (кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина), то есть область Fc, которая не стала нефункциональной в результате мутации или иным образом. Антитела с функциональным Fc демонстрируют неаттенуированную функцию Fc. Антитело с функциональным Fc может содержать последовательность тяжелой цепи IGHC человека, как указано IMGT, которая не была модифицирована или создана или сконструирована для уменьшения связывания с одним или более Fc-гамма-рецепторами. Например, посредством мутации шарнира IGHC или путем конструирования антитела, содержащего константные домены тяжелой цепи, которые являются химерными или гибридными для последовательностей IGHC IgG1/IgG2A или IgG1/IgG4. Предпочтительно, антитело или его фрагмент (*т. е.* полипептид) по изобретению являются выделенными. «Выделенный» полипептид представляет собой полипептид, удаленный из первоначального окружения. Термин «выделенный» может использоваться для обозначения антитела, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (*например*, выделенное антитело, которое специфически связывается с Vδ1, или его фрагмент по существу не содержат антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от Vδ1). Термин «выделенный» также может быть использован для обозначения препаратов, в которых выделенное антитело является достаточно чистым для терапевтического введения, когда оно составлено в виде активного ингредиента фармацевтической композиции, или по меньшей мере на 70-80% (масс./масс.) чистым, более предпочтительно по меньшей мере на 80-90% (масс./масс.) чистым, еще более предпочтительно на 90-95% чистым; и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (масс./масс.) чистым.

Предпочтительно, полинуклеотиды, используемые в настоящем изобретении, являются выделенными. «Выделенный» полинуклеотид представляет собой полинуклеотид, удаленный из первоначального окружения. Например, встречающийся в природе полинуклеотид является выделенным, если он отделен от некоторых или всех сосуществующих материалов в естественной системе. Полинуклеотид считается выделенным, если, например, он клонируется в вектор, который не является частью его естественного окружения, или если он содержится внутри кДНК.

Антитело или его фрагмент могут представлять собой «функционально активный вариант», который также включает в себя встречающиеся в природе аллельные варианты, а также мутанты или любые другие не встречающиеся в природе варианты. Как известно в данной области техники, аллельный вариант представляет собой альтернативную форму (поли)пептида, который характеризуется как имеющий замену, делецию или добавление одной или большего количества аминокислот, которые существенным образом не меняют биологическую функцию полипептида. В качестве неограничивающего примера, указанные функционально активные варианты могут при этом функционировать, когда каркасы, содержащие CDR, подвергаются модификации, когда CDR сами по себе подвергаются модификации, когда указанные CDR прививаются к альтернативным каркасам или когда включаются N- или C-концевые удлинения. Более того, содержащие CDR связывающие домены могут быть спарены с различными партнерскими цепями, например, общими с другим антителом. При одинаковых так называемых «общих» легких или «общих» тяжелых цепях указанные связывающие домены при этом могут функционировать. Более того, указанные связывающие домены могут функционировать при мультимеризации. Более того, «антитела или их фрагменты» могут также содержать функциональные варианты, причем VH, или VL, или константные домены были модифицированы в направлении от или к отличной канонической последовательности (например, как указано в IMGT.org) и при этом функционируют.

В целях сравнения двух близкородственных полипептидных последовательностей «% идентичности последовательности» между первой полипептидной последовательностью и второй полипептидной последовательностью может быть рассчитан с помощью NCBI BLAST v2.0, используя стандартные настройки для полипептидных последовательностей (BLASTP). В целях сравнения двух близкородственных полинуклеотидных последовательностей «% идентичности последовательности» между первой полинуклеотидной последовательностью и второй полинуклеотидной последовательностью может быть рассчитан с помощью NCBI BLAST v2.0, используя стандартные настройки для полинуклеотидных последовательностей (BLASTN).

Полипептидные или полинуклеотидные последовательности считаются такими же или «идентичными» другим полипептидным или полинуклеотидным последовательностям, если они имеют 100% идентичности последовательности по всей

своей длине. Остатки в последовательностях нумеруются слева направо, *т. е.* от N- к C-концу для полипептидов; от 5'- к 3'-концу для полинуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления любой указанный % идентичности последовательности рассчитывается без последовательностей всех 6 CDR антитела. Например, антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать последовательность вариабельной области тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с указанной последовательностью вариабельной области тяжелой цепи, и/или последовательность вариабельной области легкой цепи, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с указанной последовательностью вариабельной области легкой цепи, причем любые аминокислотные вариации существуют только в каркасных областях последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. В таких вариантах осуществления антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающие определенной идентичностью последовательностей, сохраняют полные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой и легкой цепей соответствующего антитела к Vδ1 или его антигенсвязывающего фрагмента.

«Различие» между последовательностями относится к вставке, делеции или замене одного аминокислотного остатка в положении второй последовательности по сравнению с первой последовательностью. Две полипептидные последовательности могут содержать одно, два или более таких аминокислотных различий. Вставки, делеции или замены во второй последовательности, которая в остальном идентична (100% идентичности последовательности) первой последовательности, приводит к снижению % идентичности последовательностей. Например, если идентичные последовательности состоят из 9 аминокислотных остатков, одна замена во второй последовательности приводит к идентичности последовательностей в 88,9%. Если первая и вторая полипептидные последовательности состоят из 9 аминокислотных остатков и имеют 6 одинаковых остатков, первая и вторая полипептидные последовательности имеют более чем 66% идентичности (первая и вторая полипептидные последовательности имеют 66,7% идентичности).

В качестве альтернативы, для целей сравнения первой эталонной полипептидной последовательности со второй сравниваемой полипептидной последовательностью может быть установлено количество добавлений, замен и/или делеций, сделанных в первой последовательности для получения второй последовательности. «Добавление» представляет собой добавление одного аминокислотного остатка в последовательность первого полипептида (включая добавление на любом конце первого полипептида). «Замена» представляет собой замену одного аминокислотного остатка в последовательности первого полипептида на один другой аминокислотный остаток. Указанная замена может быть консервативной или неконсервативной. «Делеция»

представляет собой делецию одного аминокислотного остатка из последовательности первого полипептида (включая делецию на любом конце первого полипептида).

Используя трехбуквенные и однобуквенные коды, встречающиеся в природе аминокислоты могут быть обозначены следующим образом: глицин (G или Gly), аланин (A или Ala), валин (V или Val), лейцин (L или Leu), изолейцин (I или Ile), пролин (P или Pro), фенилаланин (F или Phe), тирозин (Y или Tyr), триптофан (W или Trp), лизин (K или Lys), аргинин (R или Arg), гистидин (H или His), аспарагиновая кислота (D или Asp), глутаминовая кислота (E или Glu), аспарагин (N или Asn), глутамин (Q или Gln), цистеин (C или Cys), метионин (M или Met), серин (S или Ser) и треонин (T или Thr). Когда остаток может представлять собой аспарагиновую кислоту или аспарагин, могут использоваться символы Asx или B. Когда остаток может представлять собой глутаминовую кислоту или глутамин, могут использоваться символы Glx или Z. Если остатком может быть любая аминокислота, можно использовать символ Xaa или X. Ссылки на аспарагиновую кислоту включают в себя аспартат, а на глутаминовую кислоту - глутамат, если в контексте не указано иное.

«Консервативная» аминокислотная замена представляет собой аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком сходной химической структуры и которая, как ожидается, не будет оказывать значительного влияния на функцию, активность или другие биологические свойства полипептида. Такие консервативные замены предпочтительно представляют собой замены, в которых одна аминокислота из следующих групп заменена другим аминокислотным остатком из этой же группы:

Группа	Аминокислотный остаток
Неполярные алифатические	Глицин
	Аланин
	Валин
	Метионин
	Лейцин
	Изолейцин
Ароматические	Фенилаланин
	Тирозин
	Триптофан
Полярные незаряженные	Серин
	Треонин
	Цистеин
	Пролин
	Аспарагин

	Глутамин
Отрицательно заряженные	Аспартат
	Глутамат
Положительно заряженные	Лизин
	Аргинин
	Гистидин

Предпочтительно, гидрофобный аминокислотный остаток представляет собой неполярную аминокислоту. Более предпочтительно, гидрофобный аминокислотный остаток выбран из V, I, L, M, F, W или C. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный аминокислотный остаток выбран из глицина, аланина, валина, метионина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, тирозина или триптофана.

В контексте данного документа нумерация полипептидных последовательностей и определения CDR и FR соответствуют системе нумерации EU и/или IMGT, как указано в контексте. «Соответствующий» аминокислотный остаток между первой и второй полипептидной последовательностью представляет собой аминокислотный остаток в аффинности первой последовательности, который занимает одно и то же положение в соответствии с системой нумерации EU и/или IMGT, как указано в контексте, с аминокислотным остатком во второй последовательности, тогда как аминокислотный остаток во второй последовательности может отличаться по идентичности от первой. Соответственно соответствующие остатки будут иметь один и тот же номер (и букву), если каркас и CDR имеют одинаковую длину в соответствии с определением EU или IMGT. Выравнивание может быть выполнено вручную или с помощью, например, известного компьютерного алгоритма для выравнивания последовательностей, такого как NCBI BLAST v2.0 (BLASTP или BLASTN), используя стандартные настройки.

Ссылки в настоящем документе на «эпитоп» относятся к части мишени, которая специфически связана антителом или его фрагментом. Эпитопы также могут называться «антигенными детерминантами». Антитело связывается «по существу с тем же эпитопом», что и другое антитело, когда они оба распознают идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы. Широко применяемые способы определения того, связываются ли два антитела с идентичными или перекрывающимися эпитопами, представляют собой конкурентные анализы, которые могут быть сконфигурированы в различных форматах (*например*, планшеты с лунками с использованием радиоактивных или ферментных меток или проточная цитометрия на экспрессирующих антигены клетках) с использованием меченного антигена или меченного антитела. Антитело связывается с «тем же эпитопом», что и другое антитело, когда они оба распознают идентичные эпитопы (т. е. все точки контакта между антигеном и антителом являются одинаковыми). Например, антитело может связываться с тем же эпитопом, что и другое антитело, когда все точки контакта в указанной области антигена определяются как одинаковые с помощью способа характеристики, такого как перекрестное сшивание

антитела с антигеном в комбинации с МС, HDX, рентгеновская кристаллография, крио-ЭМ или мутагенез.

Более того, с помощью таких способов характеристики также возможно характеризовать антитела, которые связываются по существу с тем же эпитопом, путем распознавания некоторых, но не всех идентичных точек контакта. В частности, такие антитела могут иметь достаточное количество идентичных точек контакта в указанной антигенной области, чтобы обеспечить широко эквивалентный технический эффект и/или эквивалентную селективность взаимодействия с антигеном. Кроме того, в некоторых случаях, когда антитела распознают по существу тот же эпитоп и обеспечивают широко эквивалентный технический эффект и/или селективность взаимодействия, также может быть полезным определить область связывания эпитопа по общему количеству контактов антигена, включая от крайней N-концевой точки контакта антигена до крайней C-концевой точки контакта антигена.Эпитопы, обнаруживаемые на белках-мишенях, могут быть определены как «линейные эпитопы» или «конформационные эпитопы». Линейные эпитопы образуются непрерывной последовательностью аминокислот в белковом антигене. Конформационные эпитопы образуются из аминокислот, которые являются прерывистыми в последовательности белка, но которые объединяются при сворачивании белка в его трехмерную структуру.

Термин «вектор» в контексте настоящего документа предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, причем дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к независимой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную природу репликации, и эписомные векторы млекопитающего и дрожжевые векторы). Другие векторы (*например*, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после внесения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем документе «рекомбинантными векторами экспрессии» (или просто «векторами экспрессии»). В целом, векторы экспрессии, используемые в технологиях рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид. В настоящем описании «плазмида» и «вектор» могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазмида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако настоящее изобретение предназначено для включения таких других форм векторов экспрессии, таких как вирусные векторы (*например*, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции, а также бактериофагов и фагмидных систем. Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или

просто «клетка-хозяин») в контексте настоящего документа предназначен для обозначения клетки, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Такие термины предназначены для обозначения не только конкретной рассматриваемой клетки, но и потомства такой клетки, например, когда указанное потомство используют для создания линии клеток или банка клеток, которые затем необязательно хранят, предоставляют, продают, переносят или используют для производства антитела или полиспецифического антитела или его фрагмента, как описано в данном документе.

Ссылки на «субъекта», «пациента» или «индивидуума» относятся к субъекту, в частности, субъекту-млекопитающему, подлежащему лечению. Субъекты-млекопитающие включают в себя людей, отличных от человека приматов, сельскохозяйственных животных (таких как коровы), спортивных животных или домашних питомцев, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы или мыши. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В альтернативных вариантах осуществления субъект представляет собой отличное от человека млекопитающее, такое как мышь.

Термин «достаточное количество» означает количество, достаточное для получения желаемого эффекта. Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество, которое эффективно для облегчения симптома заболевания или нарушения. Терапевтически эффективное количество может представлять собой «профилактически эффективное количество», поскольку профилактика может считаться терапией.

Заболевание или нарушение «облегчается», если тяжесть признака или симптома заболевания или нарушения, частота, с которой такой признак или симптом проявляются у субъекта, или и то, и другое уменьшаются.

В контексте настоящего документа термин «лечить заболевание или нарушение» означает снижение частоты и/или тяжести по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения, испытываемого субъектом.

«Рак» в контексте настоящего документа относится к аномальному росту или делению клеток. Как правило, рост и/или срок жизни раковых клеток превышают рост и/или срок жизни нормальных клеток и тканей вокруг них и не согласуются с ними. Раковые заболевания могут быть доброкачественными, предзлокачественными или злокачественными. Злокачественное новообразование возникает в различных клетках и тканях, включая полость рта (например, рот, язык, глотку и т. д.), пищеварительную систему (например, пищевод, желудок, тонкую кишку, толстую кишку, прямую кишку, печень, желчные протоки, желчный пузырь, поджелудочную железу и т. д.), дыхательную систему (например, гортань, легкие, бронхи и т. д.), кости, суставы, кожу (например, базально-клеточная, плоскоклеточная, менингиома и т. д.), молочную железу, половую систему (например, матку, яичник, простату, яичко и т. д.), мочевыделительную систему (например, мочевой пузырь, почку, мочеточник и т. д.), глаза, нервную систему (например, головной мозг и т. д.), эндокринную систему (например, щитовидную железу и

т. д.) и систему кроветворения (например, лимфома, миелома, лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, хронический лимфолейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и т. д.).

В контексте данного документа термин «около» включает до 10% включительно больше и до 10% включительно меньше указанного значения, предпочтительно до 5% включительно больше и до 5% включительно меньше указанного значения, особенно указанного значения. Термин «между» включает в себя значения в указанных границах.

Полиспецифические антитела или их фрагменты

В данном документе предложены полиспецифические (соответственно биспецифические) антитела или их фрагменты, способные специфически связываться с V-областью вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ-Т-клеточного рецептора (TCR) и другим антигеном. Изобретение относится к применению указанных полиспецифических антител в качестве лекарственных препаратов для введения субъекту, подлежащему лечению.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент представляют собой scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, вариабельный домен (*например*, VH или VL), диатело, минитело или моноклональное антитело. В дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент представляют собой scFv.

Полиспецифические антитела по изобретению могут относиться к любому классу, например, IgG, IgA, IgM, IgE, IgD или их изотипам, и могут содержать легкую цепь каппа или лямбда. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело представляет собой антитело IgG, например, по меньшей мере один из изотипов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело может быть в таком формате, как, например, формат IgG, который был модифицирован для придания желаемых свойств, таких как обеспечение мутации Fc с целью снижения эффекторной функции, увеличения - периода полужизни, изменения АЗКЦ или улучшения стабильности шарнира. Такие модификации хорошо известны в данной области техники.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент являются человеческими. Таким образом, полиспецифическое антитело или его фрагмент могут быть получены из последовательности человеческого иммуноглобулина (Ig). CDR, каркасная и/или константная область антитела (или его фрагмента) могут быть получены из последовательности Ig человека, в частности, последовательности IgG человека. CDR, каркасная и/или константная область могут быть по существу идентичными для последовательности Ig человека, в частности, последовательности IgG человека. Преимущество использования полиспецифических антител человека состоит в том, что они являются низкоиммуногенными или неиммуногенными для человека.

Полиспецифическое антитело или его фрагмент также могут быть химерными, например, химерой антитела мыши-человека.

В качестве альтернативы, полиспецифическое антитело или его фрагмент получают от отличных от человека видов, таких как мышь. Такие антитела нечеловеческого происхождения могут быть модифицированы для повышения их сходства с вариантами антител, естественным образом вырабатываемых у людей, таким образом, антитело или его фрагмент могут быть частично или полностью гуманизированными. Таким образом, в одном варианте осуществления антитело или его фрагмент являются гуманизированными.

Последовательности полиспецифических антител

Выделенные антитела к Vδ1 или их фрагменты по изобретению могут быть описаны со ссылкой на их последовательности CDR, которые обеспечивают связывание TRDV1. Однако настоящее изобретение не ограничивается такими последовательностями, поскольку изобретение основано на совершенно новом принципе нацеливания на TRDV1 с использованием полиспецифического антитела, например, для связывания TRDV1 на платформе TCE или на платформе DI. Аналогично, настоящее изобретение не ограничивается конкретными последовательностями доменов, которые обеспечивают связывание со вторым антигеном (таким как раковый или ассоциированный с раком антиген или иммуномодулирующий антиген).

В соответствии с одним аспектом изобретения предложено выделенное полиспецифическое антитело к Vδ1 или его фрагмент, которые содержат одно или более из:

CDR3, содержащей последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25;

CDR2, содержащей последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37 и SEQ ID NO: 160-171; и/или

CDR1, содержащей последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-61.

В соответствии с одним аспектом изобретения предложено выделенное полиспецифическое антитело к Vδ1 или его фрагмент, которые содержат CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 26-37 и SEQ ID NO: 160-171. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 38-61.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержит CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент

содержит CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37 и SEQ ID NO: 160-171. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-61.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержит CDR2, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 26-37 и SEQ ID NO: 160-171. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат CDR1, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-61.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые содержат область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и/или или область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14-25. В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые содержат область VH, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14-25.

В соответствии с конкретным аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которое содержит область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 2-7, в в частности 2-6, например, 2, 3 или 4, и/или область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14-19, в частности 14-18, например, 14, 15 или 16. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент, которое содержит область VH, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-7, в частности 2-6, такой как 2, 3 или 4, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-19, в частности 14-18, такой как 14, 15 или 16.

В соответствии с конкретным аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые содержат область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8-13, в частности 8, 9, 10 или 11, или область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 20- 25, в частности 20, 21, 22 или 23. В соответствии с другим аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые содержат область VH, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 8-13, в частности, 8, 9, 10 или 11, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 20-25, в частности, 20, 21, 22 или 23.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые содержат область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и/или или область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14-25. В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые содержат область VH, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14-25.

В соответствии с конкретным аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которое содержит область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 2-7, в в частности 2-6, например, 2, 3, 4 или 5, и/или область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14-19, в частности 14-18, например, 14, 15, 16 или 17. В одном варианте осуществления антитело или его фрагмент, которое содержит область VH, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-7, в частности 2-6, такой как 2, 3, 4 или 5, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-19, в частности 14-18, например, 14, 15, 16 или 17.

В соответствии с конкретным аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые содержат область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11, или область VL,

содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 20, 21, 22 или 23. В соответствии с другим аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые содержат область VH, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 20, 21, 22 или 23.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые содержат область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и/или или область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14-25. В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которое содержит область VH, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14-25.

В соответствии с конкретным аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которое содержит область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-7, в частности 2-6, например, 2, 3, 4 или 5, и/или область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14-19, в частности 14-18, например 14, 15, 16 или 17. В соответствии с конкретным аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которое содержит область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 2-7, в в частности 2-6, например, 2, 3, 4 или 5, и/или область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14-19, в частности 14-18, например, 14, 15, 16 или 17.

В соответствии с конкретным аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые содержат область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11, или область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 20, 21, 22 или 23. В соответствии с другим аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые содержат область VH, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11, и/или область

VL, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 20, 21, 22 или 23.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые содержат область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14-25. В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые содержат область VH, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и область VL, содержащую CDR3, состоящую из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 14-25.

Варианты осуществления, которые относятся в настоящем документе к «по меньшей мере 80%» или «80% или более», следует понимать как такие, которые включают в себя все значения, равные или превышающие 80%, например, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентичности последовательности. В одном варианте осуществления антитело или фрагмент по изобретению содержат по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с указанной последовательностью.

Вместо процента идентичности последовательности варианты осуществления также могут определяться одним или более аминокислотными изменениями, например, одной или более вставками, заменами и/или делециями. В одном варианте осуществления последовательность может содержать до пяти аминокислотных изменений, например, до трех аминокислотных изменений, в частности до двух аминокислотных изменений. В дополнительном варианте осуществления последовательность может содержать до пяти аминокислотных замен, например, до трех аминокислотных замен, в частности до одной или двух аминокислотных замен. Например, CDR3 полиспецифического антитела или его фрагмента по настоящему изобретению содержит или, более подходящим образом, состоит из последовательности, имеющей не более 2, более предпочтительно не более 1 замены по сравнению с любой из SEQ ID NO: 2-25.

Соответственно, любые остатки CDR1, CDR2 или CDR3, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 2-61 и SEQ ID NO: 160-171, представляют собой консервативные замены по отношению к их соответствующим остаткам. Например, любые остатки CDR3, отличающиеся от их соответствующих остатков в SEQ ID NO: 2-25, представляют собой консервативные замены по отношению к их соответствующим остаткам.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержит:

(i) область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13;

(ii) область VH, содержащую CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37;

(iii) область VH, содержащую CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-49;

(iv) область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25;

(v) область VL, содержащую CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 160-171; и/или

(vi) область VL, содержащую CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 50-61.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат тяжелую цепь с:

(i) областью VH, содержащей CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13;

(ii) областью VH, содержащей CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37; и

(iii) областью VH, содержащей CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-49.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат легкую цепь с:

(i) областью VL, содержащей CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25;

(ii) областью VL, содержащей CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 160-171; и

(iii) областью VL, содержащей CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 50-61.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат (или состоит из компонента (т.е. связывающего домена) полиспецифического антитела, обеспечивающего связывание TRDV1) область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 или 6, например, 2, 3, 4 или 5, в частности 2, 3 или 4. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержит (или компонент полиспецифического антитела, обеспечивающего связывание TRDV1, состоит из) область VH, содержащую CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29 или 30, например, 26, 27, 28 или 29, в частности 26, 27 или 28. В одном

варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат (или состоит из компонента полиспецифического антитела, обеспечивающего связывание TRDV1) область VH, содержащую CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41 или 42, например, 38, 39, 40 или 41, в частности 38, 39 или 40.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат (или состоит из компонента полиспецифического антитела, обеспечивающего связывание TRDV1) область VH, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат (или состоит из компонента полиспецифического антитела, обеспечивающего связывание TRDV1) область VH, содержащую CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 32, 33, 34 или 35. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержит (или состоит из компонента полиспецифического антитела, обеспечивающего связывание TRDV1) область VH, содержащую CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 44, 45, 46 или 47.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 2, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 26, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 38. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 26, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 38.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 27, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 39. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 3, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 27, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 39.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 28, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 40. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 4, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 28, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 5, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 29, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 41. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 5, CDR2 состоит из

последовательности SEQ ID NO: 29, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 41.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 30, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 42. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 6, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 30, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 42.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 8, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 44. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 8, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 32, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 44.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 45. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 9, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 33, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 45.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 34, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 46. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 10, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 34, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 46.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 35, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 47. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 11, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 35, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 47.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержит (или состоит из компонента полиспецифического антитела, обеспечивающего связывание TRDV1) область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25, например, SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17 или 18, например, 14, 15, 16 или 17, в частности 14, 15 или 16. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержит (или состоит из компонента полиспецифического антитела, обеспечивающего связывание TRDV1) область VL, содержащую CDR2, содержащую

последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 160-171, например, SEQ ID NO: 160, 161, 162, 163 или 164, такой как 160, 161, 162 или 163, в частности 160, 161 или 162. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат (или состоит из компонента полиспецифического антитела, обеспечивающего связывание TRDV1) область VL, содержащую CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 50-61, например, SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53 или 54, такой как 50, 51, 52 или 53, в частности 50, 51 или 52.

В одном варианте осуществления область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 14, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 160, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 50. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 14, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 160, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 50.

В одном варианте осуществления область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 161, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 51. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 15, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 161, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 51.

В одном варианте осуществления область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 162, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 52. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 16, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 162, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 52.

В одном варианте осуществления область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 163, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 53. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 17, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 163, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 53.

В одном варианте осуществления область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 164, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 54. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 18, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 164, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 54.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат (или состоит из компонента полиспецифического антитела, обеспечивающего

связывание TRDV1) область VL, содержащую CDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 20, 21, 22 или 23. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержит (или состоит из компонента полиспецифического антитела, обеспечивающего связывание TRDV1) область VL, содержащую CDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из последовательностей: 166, 167, 168 или 169. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержит (или состоит из компонента полиспецифического антитела, обеспечивающего связывание TRDV1) область VL, содержащую CDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 56, 57, 58 или 59.

В одном варианте осуществления область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 166, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 56. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 20, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 166, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 56.

В одном варианте осуществления область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 167, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 57. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 21, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 167, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 57.

В одном варианте осуществления область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 22, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 168, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 58. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 168, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 58.

В одном варианте осуществления область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 23, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 169, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 59. В одном варианте осуществления CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 23, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 169, а CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 59.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 2, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 26, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 38, и область VL, содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 14, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 160, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID

NO: 50. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 26, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 38, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 14, LCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 160, а LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 50.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 27, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 39, и область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID No: 161, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 51. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 3, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 27, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 39, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 15, LCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 161, и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 51.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 28, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 40, и область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 16, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID No: 162, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 52. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 4, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 28, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 40, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 16, LCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 162, и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 52.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 5, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 29, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 41, и область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 17, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID No: 163, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 53. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 5, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 29, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 41, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 17, LCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 163, и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 53.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 30, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 42, и область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID No: 164, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID

NO: 54. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 6, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 30, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 42, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 18, LCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 164, и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 54.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 31, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 43, и область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 19, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID No: 165, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 55. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 7, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 31, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 43, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 19, LCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 165, и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 55.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 8, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 44, и область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID No: 166, и CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 56. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 8, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 32, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 44, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 20, LCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 166, и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 56.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 33, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 45, и область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID No: 167, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 57. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 9, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 33, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 45, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 21, LCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 167, и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 57.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 34, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 46, и область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 22, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID No: 168, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID

NO: 58. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 10, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 34, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 46, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, LCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 168, и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 58.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 35, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 47, и область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 23, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID No: 169, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 59. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 11, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 35, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 47, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 23, LCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 169, и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 59.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 12, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 36, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 48, и область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 24, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID No: 170, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 60. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 36, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 48, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 24, LCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 170, и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 60.

В одном варианте осуществления область VH содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 37, CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 49, и область VL содержит CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 25, CDR2, содержащую последовательность SEQ ID No: 171, и CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 61. В одном варианте осуществления HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 13, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 37, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 49, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 25, LCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 171, и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 61.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат одну или более последовательностей CDR, как описано в **таблице 3**. В другом варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1252_P01_C08, как описано в **таблице 3**. В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или

его фрагмент содержат одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1245_P01_E07, как описано в **таблице 3**. В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1245_P02_G04, как описано в **таблице 3**. В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1245_P02_B07, как описано в **таблице 3**. В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1251_P02_C05, как описано в **таблице 3**. В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1139_P01_E04, как описано в **таблице 3**. В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1245_P02_F07, как описано в **таблице 3**. В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1245_P01_G06, как описано в **таблице 3**. В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1245_P01_G09, как описано в **таблице 3**. В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1138_P01_B09, как описано в **таблице 3**. В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1251_P02_G10, как описано в **таблице 3**.

Предпочтительно каждая область VH и VL, указанная выше, содержит четыре каркасные области (FR1-FR4). В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат каркасную область (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с каркасной областью в любой из SEQ ID NO: 62-85. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат каркасную область (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, 97% или 99% идентичности последовательности с каркасной областью в любой из SEQ ID NO: 62-85. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат каркасную область (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащую последовательность в любой из SEQ ID NO: 62-85. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат каркасную область (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), состоящую из последовательности в любой из SEQ ID NO: 62-85.

Антитела, описанные в данном документе, могут быть определены полными последовательностями вариабельных областей легкой цепи и/или тяжелой цепи, которые

обеспечивают связывание TRDV1. Таким образом, в соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложено выделенное полиспецифическое антитело к Vδ1 или его фрагмент, которые содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-85. В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложено выделенное полиспецифическое антитело к Vδ1 или его фрагмент, в которых компонент полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание с TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-85.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73. В другом варианте осуществления область VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65 или 66, например, 62, 63, 64 или 65, в частности 62, 63 или 64. В дополнительном варианте осуществления область VH состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65 или 66, такой как 62, 63, 64 или 65, в частности 62, 63 или 64. В дополнительным варианте осуществления область VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 или 73, например, 68, 69, 70 или 71. В другом варианте осуществления область VH состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 или 73, такой как 68, 69, 70 или 71.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 74-85. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85. В дополнительном варианте осуществления область VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74, 75, 76, 77 или 78, например, 74, 75, 76 или 77, в частности 74, 75 или 76. В дополнительном варианте осуществления область VL состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74, 75, 76, 77 или 78, например, 74, 75, 76 или 77, в частности 74, 75, или 76. В дополнительном варианте осуществления область VL содержит

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 80, 81, 82, 83, 84 или 85, например, 80, 81, 82 или 83. В дополнительном варианте осуществления область VL состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 80, 81, 82, 83, 84 или 85, такой как 80, 81, 82 или 83.

В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85. В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85.

В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85. В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73, и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85.

В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержит область VH, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 96% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73, и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 96% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85. В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 96% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73, и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 96% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 (1252_P01_C08). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, включающую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 62 (1245_P01_E07). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (1245_P02_G04). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (1139_P01_E04). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (1245_P02_F07). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (1245_P01_G06). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 (1245_P01_G09).

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63 (1252_P01_C08). В альтернативном варианте полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62 (1245_P01_E07). В альтернативном варианте полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 64 (1245_P02_G04). В альтернативном варианте полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 68 (1139_P01_E04). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 69 (1245_P02_F07). В альтернативном варианте полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 70 (1245_P01_G06). В альтернативном варианте полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71 (1245_P01_G09).

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 (1252_P01_C08). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 (1245_P01_E07). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76 (1245_P02_G04). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 (1139_P01_E04). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, включающую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 81 (1245_P02_F07). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 (1245_P01_G06). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 (1245_P01_G09).

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 75 (1252_P01_C08). В альтернативном варианте полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 74 (1245_P01_E07). В альтернативном варианте полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 76 (1245_P02_G04). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 80 (1139_P01_E04). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 81 (1245_P02_F07). В альтернативном варианте полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 82 (1245_P01_G06). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83 (1245_P01_G09).

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 (1252_P01_C08), и область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 (1252_P01_C08). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62 (1245_P01_E07), и область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74 (1245_P01_E07). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (1245_P02_G04), и область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76 (1245_P02_G04). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68 (1139_P01_E04), и область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80 (1139_P01_E04). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 (1245_P02_F07), и область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 (1245_P02_F07). В альтернативном варианте осуществления

полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 (1245_P01_G06), и область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82 (1245_P01_G06). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71 (1245_P01_G06), и область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 (1245_P01_G09).

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63 (1252_P01_C08), и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 75 (1252_P01_C08). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62 (1245_P01_E07), и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 74 (1245_P01_E07). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 64 (1245_P02_G04), и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 76 (1245_P02_G04). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержит область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 68 (1139_P01_E04), и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 80 (1139_P01_E04). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 69 (1245_P02_F07), и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 81 (1245_P02_F07). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 70 (1245_P01_G06), и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 82 (1245_P01_G06). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71 (1245_P01_G06), и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83 (1245_P01_G09).

Для фрагментов, содержащих как область VH, так и область VL, они могут быть связаны ковалентно (*например*, посредством дисульфидных связей или линкера) или нековалентно. Фрагмент полиспецифического антитела, описанный в данном документе, может содержать scFv, *т. е.* фрагмент, содержащий область VH и область VL, соединенные с помощью линкера. В одном варианте осуществления области VH и VL соединены с помощью (*например*, синтетического) полипептидного линкера. Полипептидный линкер может содержать линкер $(Gly_4Ser)_n$, где n=от 1 до 8, *например*, 2, 3, 4, 5 или 7. Полипептидный линкер может содержать линкер $[(Gly_4Ser)_n(Gly_3AlaSer)_m]_p$,

где n=от 1 до 8, *например*, 2, 3, 4, 5 или 7, m=от 1 до 8, *например*, 0, 1, 2 или 3, а p=от 1 до 8, *например*, 1, 2 или 3. В дополнительном варианте осуществления линкер содержит SEQ ID NO: 98. В дополнительном варианте осуществления линкер состоит из SEQ ID NO: 98.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 86-97. В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 86-97. В еще одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87 (1252_P01_C08). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86 (1245_P01_E07). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 (1245_P02_G04). В альтернативном варианте полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 (1139_P01_E04). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93 (1245_P02_F07). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94 (1245_P01_G06). В альтернативном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95 (1245_P01_G09).

В одном варианте осуществления компонент полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 86-97. В другом варианте осуществления компонент полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 86-97. В еще одном варианте осуществления компонент полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 87 (1252_P01_C08). В альтернативном варианте осуществления компонент полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86 (1245_P01_E07). В альтернативном варианте осуществления компонент полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 88 (1245_P02_G04). В альтернативном варианте осуществления компонент полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92 (1139_P01_E04). В альтернативном варианте осуществления компонент полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93 (1245_P02_F07). В альтернативном варианте осуществления компонент

полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 94 (1245_P01_G06). В альтернативном варианте осуществления компонент полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95 (1245_P01_G09).

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что конструкции scFv могут быть сконструированы и получены с включением N-концевых и C-концевых модификаций для содействия трансляции, очистке и обнаружению. Например, на N-конце последовательности scFv перед каноническими последовательностями VH может быть включен дополнительный аминокислотный остаток метионина и/или аланина (например, начальный QVQ или EVQ). На C-конце (т.е. на C-конце последовательности канонического домена зрелой VL, оканчивающейся в соответствии с определением IMGT) могут быть включены дополнительные последовательности, такие как (i) частичная последовательность константного домена и/или (ii) дополнительные синтетические последовательности, включая метки, такие как His-метки и Flag-метки, для облегчения очистки и обнаружения. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 124 добавляют к C-концу любой из SEQ ID NO: 86, 88-90, 92-97. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 125 добавляют к C-концу любой из SEQ ID NO: 86, 88-90, 92-97. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 126 добавляют к C-концу любой из SEQ ID NO: 87 или 91. В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 127 добавляют к C-концу любой из SEQ ID NO: 87 или 91. Хорошо известно, что указанные N- или C-концевые последовательности scFv являются необязательными и могут быть удалены, модифицированы или заменены, если будут приняты альтернативные стратегии дизайна, трансляции, очистки или обнаружения scFv.

Как описано в настоящем документе, антитела могут находиться в любом формате. В предпочтительном варианте осуществления полиспецифическое антитело находится в формате IgG1. Следовательно, в одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 111-122. В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 111-122. В еще одном дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111-116, такую как SEQ ID NO: 111-113 и 116. В еще одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117-122, такую как SEQ ID NO: 117-120. В еще одном варианте осуществления полспецифическое антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, 112, 116-120, например, SEQ ID NO: 111, 112 или 116, или SEQ ID NO: 117-120.

В одном варианте осуществления компонент полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности с любой из SEQ ID NO: 111-122. В дополнительном варианте осуществления компонент полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 111-122. В еще одном варианте осуществления компонент полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111-116, например, SEQ ID NO: 111-113 и 116. В еще одном варианте осуществления компонент полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117-122, например, SEQ ID NO: 117-120. В еще одном варианте осуществления компонент полиспецифического антитела, обеспечивающий связывание TRDV1, состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111, 112, 116-120, например, SEQ ID NO: 111, 112 или 116, или SEQ ID NO: 117-120.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело связывается с тем же или по существу таким же эпитопом TRDV1, что и антитело или его фрагмент, как определено в данном документе, или конкурирует с ним. Можно легко определить, связывается ли полиспецифическое антитело с тем же эпитопом, или конкурирует за связывание с тем же эпитопом TRDV1, что и эталонное антитело к Vδ1, с помощью обычных способов, известных в данной области техники. Например, чтобы определить, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом TRDV1, что и эталонное антитело к Vδ1 по изобретению, эталонному антителу позволяют связываться с белком или пептидом Vδ1 в условиях насыщения. Затем оценивают способность исследуемого полиспецифического антитела связываться с Vδ1-цепью. Если исследуемое полиспецифическое антитело способно связываться с Vδ1 после насыщения связывания с эталонным антителом к Vδ1, можно сделать вывод, что исследуемое полиспецифическое антитело связывается с эпитопом, отличным от эпитопа TRDV1, с которым связывается эталонное антитело к Vδ1. С другой стороны, если исследуемое полиспецифическое антитело не способно связываться с Vδ1-цепью после насыщения связыванием с эталонным антителом к Vδ1, тогда исследуемое полиспецифическое антитело может связываться с тем же эпитопом TRDV1, что и эпитоп, связанный эталонным антителом к Vδ1 по изобретению. Конечно, связывание с эпитопом TRDV1 относится к компоненту полиспецифического антитела, который обеспечивает связывание с первым целевым эпитопом, который является эпитопом TRDV1. Альтернативно тестирование связывания с тем же или другим эпитопом можно проводить с использованием последовательности полиспецифических антител, представленных в данном документе, но в моноспецифическом формате.

Настоящее изобретение также включает полиспецифические антитела к Vδ1, которые конкурируют за связывание с Vδ1 с антителом или его фрагментом, как определено в данном документе (либо в поли-, либо в моноспецифическом формате), или

антителом, имеющим последовательности CDR любого из иллюстративных антител, описанные в данном документе. Например, конкурентные анализы можно проводить с антителом по настоящему изобретению, чтобы определить, какие белки, антитела и другие антагонисты конкурируют за связывание с цепью Vδ1 с антителом по настоящему изобретению и/или имеют общий эпитоп. Такие анализы хорошо известны специалистам в данной области техники; они оценивают конкуренцию между антагонистами или лигандами за ограниченное количество сайтов связывания белка, *например,* Vδ1. Антитело (или его фрагмент) иммобилизуют или приводят в нерастворимую форму до или после конкуренции, и образец, связанный с цепью Vδ1, отделяют от несвязанного образца, например, путем декантации (когда антитело было предварительно приведено в нерастворимую форму) или центрифугирования (когда антитело осаждали после конкурирующей реакции). Также конкурентное связывание может быть определено на основании того, изменяется ли функция при связывании или отсутствии связывания антитела с белком, *например*, ингибирует или стимулирует молекула антитела ферментативную активность, например, метки. ИФА и другие функциональные анализы можно использовать, как известно в данной области техники и описано в настоящем документе.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждый из них конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном-мишенью. То есть 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания. В альтернативном варианте два антитела имеют один и тот же эпитоп, если по существу все аминокислотные мутации в антигене-мишени, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

Затем можно провести дополнительные стандартные эксперименты (*например*, анализ пептидных мутаций и анализ связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела обусловлено связыванием с тем же эпитопом, с которым связывается и эталонное антитело, или причиной отсутствия наблюдаемого связывания является стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода могут быть выполнены с использованием ИФА, РИА, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент обладают модифицированной эффекторной функцией за счет изменения сахаров, связанных с Asn 297 (схема нумерации EU). В еще одной указанной модификации Asn 297 не является фукозилированным или демонстрирует пониженное фукозилирование (т.е. дефукозилированное антитело или нефукозилированное антитело). Фукозилирование включает добавление к молекуле сахара фукозы, например, присоединение фукозы к N-

гликанам, О-гликанам и гликолипидам. Соответственно, в дефукозилированном антителе фукоза не присоединена к углеводным цепям константной области. Антитело можно модифицировать для предотвращения или ингибирования фукозилирования антитела. Как правило, модификации гликозилирования включают экспрессию указанного антитела или его фрагмента в клетке-хозяине, обладающей альтернативными возможностями процессинга гликозилирования, либо посредством направленной инженерии, либо путем целенаправленной или случайной селекции хозяина или клона (например, см. Пример 13). Эти и другие эффекторные модификации обсуждаются в недавних обзорах, таких как Xinhua Wang et al. (2018) Protein & Cell 9: 63-73 and by Pereira et al. (2018) mAbs 10(5): 693-711 , которые включены в данный документ.

Модификации последовательностей антител

Полиспецифические антитела и их фрагменты могут быть модифицированы с помощью известных способов. Модификации последовательности молекул антител, описанных в данном документе, в частности тех частей полиспецифических антител, которые обеспечивают связывание Vδ1, могут быть легко включены специалистами в данной области техники. Следующие примеры не являются ограничивающими.

При обнаружении антител и извлечении последовательностей из фаговых библиотек вариабельные домены желаемых антител могут быть переформатированы в полноразмерный IgG путем субклонирования. Для ускорения процесса вариабельные домены часто переносят с помощью рестрикционных ферментов. Такие уникальные сайты рестрикции могут вводить дополнительные/альтернативные аминокислоты вдали от канонической последовательности (такие канонические последовательности можно найти, например, в международной информационной системе ImMunoGeneTics [IMGT], см. http://www.imgt.org). Они могут быть введены в виде модификаций последовательностей легкой цепи каппа или лямбда.

Модификации легкой цепи каппа

Вариабельные последовательности легкой каппа-цепи могут быть клонированы с помощью сайтов рестрикции (*например*, Nhe1-Not1) в процессе переформатирования в полноразмерный IgG. Более конкретно, на N-конце легкой цепи каппа была введена дополнительная последовательность Ala-Ser для поддержания клонирования. Предпочтительно, эту дополнительную последовательность AS затем удаляют в ходе дальнейшей разработки, чтобы получить каноническую N-концевую последовательность. Следовательно, в одном варианте осуществления описанные в настоящем документе антитела, содержащие легкую цепь каппа, не содержат последовательность AS на своих N-концах, *т. е.* SEQ ID NO: 74, 76-78 и 80-85 не содержат исходную последовательность AS. В дополнительном варианте осуществления SEQ ID NO: 74 и 76-78 не содержат исходную последовательность AS. Следует понимать, что этот вариант осуществления также применим к другим последовательностям, включенным в настоящий документ, которые содержат эту последовательность (например, SEQ ID NO: 86, 88-90 и 92-97).

Могут быть внесены дополнительные аминокислотные изменения для поддержания клонирования. Например, для антител, описанных в данном документе, на границе вариабельного домена и константного домена легкой цепи каппа валин был заменен на аланин для поддержания клонирования. Это привело к модификации константного домена каппа. В частности, это приводит к тому, что константный домен начинается с RTAAAPS (от сайта рестрикции NotI). Предпочтительно, эту последовательность можно модифицировать в ходе дальнейшей разработки для получения канонических константных областей легкой цепи каппа, которые начинаются с RTVAAPS. Следовательно, в одном варианте осуществления описанные в настоящем документе антитела, содержащие легкую цепь каппа, содержат константный домен, начинающийся с последовательности RTV. Таким образом, в одном варианте осуществления последовательность RTAAAPS из SEQ ID NO: 111-114 и 117-122 заменена последовательностью RTVAAPS. Например, см. Пример 13 и SEQ ID NO: 129, 130.

Модификации легкой цепи лямбда

Аналогично примеру цепи каппа выше, вариабельные домены легкой цепи лямбда также могут быть клонированы путем введения сайтов рестрикции (*например*, Nhe1-Not1) в процессе переформатирования в полноразмерный IgG. Более конкретно, на N-конце легкой цепи лямбда может быть введена дополнительная последовательность Ala-Ser для поддержания клонирования. Предпочтительно, эту дополнительную последовательность AS затем удаляют в ходе дальнейшей разработки, чтобы получить каноническую N-концевую последовательность. Следовательно, в одном варианте осуществления описанные в настоящем документе антитела, содержащие легкую цепь лямбда, не содержат последовательность AS на своих N-концах, *т. е.* SEQ ID NO: 75 и 79 не содержат исходную последовательность AS. Следует понимать, что этот вариант осуществления также применим к другим последовательностям, включенным в настоящий документ, которые содержат эту последовательность (например, SEQ ID NO: 87, 91, 115 и 116). В одном варианте осуществления SEQ ID NO: 75 не содержит первоначальных шести остатков, *т.е.* последовательность ASSYEL удалена.

В качестве еще одного примера, для антител, описанных в данном документе, на границе вариабельного домена и константного домена легкой лямбда-цепи было введено изменение последовательности лизина на аланин для поддержания клонирования. Это привело к модификации константного домена лямбда. В частности, это приводит к тому, что константный домен начинается с GQPAAAPS (от сайта рестрикции NotI). Предпочтительно, эту последовательность можно модифицировать в ходе дальнейшей разработки для получения канонической константной области легкой цепи лямбда, которая начинается с GQPKAAPS. Следовательно, в одном варианте осуществления описанные в настоящем документе антитела, содержащие легкую цепь лямбда, содержат константный домен, начинающийся с последовательности GQPK. Таким образом, в одном варианте осуществления последовательность GQPAAAPS из SEQ ID NO: 115 или 116 заменена последовательностью GQPKAAPS.

Модификации тяжелой цепи

Как правило, последовательности вариабельной тяжелой цепи человека начинаются либо с основного глутамина (Q), либо с кислого глутамата (E). Однако известно, что обе такие последовательности затем превращаются в кислый аминокислотный остаток пироглутамат (pE). Превращение Q в pE приводит к изменению заряда антитела, тогда как превращение E в pE не изменяет заряд антитела. Следовательно, чтобы избежать вариабельного изменения заряда со временем, одна возможность заключается в модификации начальной последовательности тяжелой цепи с Q на E в первую очередь. Следовательно, в одном варианте осуществления тяжелая цепь антитела, описанного в данном документе, содержит модификацию Q на E на N-конце. В частности, начальный остаток SEQ ID NO: 62, 64 и/или 67-71 может быть изменен с Q на E. Следует понимать, что этот вариант осуществления также применим к другим последовательностям, включенным в настоящее описание, которые содержат эту последовательность (*например,* SEQ ID NO: 86, 88, 91-97 и 111, 112, 115, 117-120). Например, см. Пример 13 и SEQ ID NO: 129, 130.

Более того, C-конец константного домена IgG1 заканчивается на PGK. Однако концевой основный лизин (K) затем часто расщепляется во время экспрессии (*например*, в клетках CHO). Это в свою очередь приводит к изменению заряда антитела посредством различной утраты C-концевого остатка лизина. Таким образом, одна возможность заключается в удалении лизина в первую очередь, что приведет к однородной и стабильной C-концевой последовательности тяжелой цепи, заканчивающейся на PG. Следовательно, в одном варианте осуществления с C-конца тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, был удален концевой K. В частности, антитело по изобретению может содержать любую из SEQ ID NO: 111-122, в которой концевой остаток лизина был удален. Например, см. SEQ ID NO: 141.

Необязательные модификации аллотипа

При обнаружении антител могут использоваться специфические человеческие аллотипы. Необязательно антитела могут быть переключены на другие человеческие аллотипы в ходе разработки. В качестве неограничивающего примера, для цепи каппа существует три человеческих аллотипа, обозначаемых Km1, Km1,2 и Km3, которые определяют три аллели Km (используя нумерацию аллотипов): Km1 коррелирует с валином 153 (IMGT V45.1) и лейцином 191 (IMGT L101); Km1,2 коррелирует с аланином 153 (IMGT A45.1) и лейцином 191 (IMGT L101); а Km3 коррелирует с аланином 153 (IMGT A45.1) и валином 191 (IMGT V101). Необязательно таким образом можно модифицировать последовательность с одного аллотипа на другой с помощью стандартных подходов клонирования. Например, изменение L191V (IMGT L101V) преобразует аллотип Km1,2 в аллотип Km3. Для дальнейшей справки касательно таких аллотипов см. Jefferis and Lefranc (2009) MAbs 1(4):332-8, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Следовательно, в одном варианте осуществления полиспецифическое антитело, описанное в данном документе, содержит аминокислотные замены, полученные от другого человеческого аллотипа одного и того же гена. В дополнительном варианте осуществления антитело содержит замену L191V (IMGT L101V) в цепи каппа для преобразования с-домена из аллотипа km1,2 в аллотип km3. Например, см. Пример 13 и SEQ ID NO: 129, 130.

Антитела, нацеленные на эпитопы TRDV1

В данном документе предложены антитела (или их фрагменты), которые связываются с эпитопом Vδ1-цепи γδ TCR (в дополнение к связыванию второго эпитопа, обсуждаемому в другом месте). Такое связывание необязательно может оказывать эффект на активность γδ TCR, такой как активация. Антитела по изобретению предпочтительно являются специфичными в отношении Vδ1-цепи γδ TCR и не связывают эпитопы других антигенов, таких как Vδ2-цепь γδ TCR или Vδ3-цепь γδ TCR. Антитела по настоящему изобретению могут считаться агонистическими антителами по меньшей мере в отношении агонистического эффекта, оказываемого Vδ1 клеткам при связывании.

В одном варианте осуществления эпитоп может представлять собой активирующий эпитоп γδ Т-клетки. «Активирующий» эпитоп может включать, например, стимуляцию функции TCR, такую как дегрануляция клеток, снижение количества TCR, цитотоксичность, пролиферация, мобилизация, повышенная выживаемость или устойчивость к истощению, внутриклеточный сигналинг, секреция цитокина или фактора роста, фенотипическое изменение или изменение экспрессии генов. Например, связывание активирующего эпитопа может стимулировать экспансию (*m. e.* пролиферацию) популяции γδ Т-клеток, предпочтительно популяции Vδ1+Т-клеток. Соответственно, эти полиспецифического антитела могут использовать для модуляции активации γδ Т-клеток и тем самым модуляции иммунного ответа. Таким образом, в одном варианте осуществления связывание активирующего эпитопа снижает уровень γδ TCR. В дополнительном или альтернативном варианте осуществления связывание активирующего эпитопа активирует дегрануляцию γδ Т-клетки. В еще одном дополнительном или альтернативном варианте осуществления связывание активирующего эпитопа способствует уничтожению, опосредованному γδ Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления активирующий эпитоп TRDV1 представляет собой эпитоп, который при связывании с антителом приводит к снижению количества рецептора и необязательно активирует Vδ1 клетку. В некоторых вариантах осуществления указанное снижение количества рецептора также приводит к снижению количества ассоциированных молекул CD3. В некоторых вариантах осуществления активирующий эпитоп представляет собой эпитоп, который повышает экспрессию активирующих маркеров на Vδ1 клетке, например, CD107a, CD25, CD69 и/или Ki67. В некоторых вариантах осуществления активирующий эпитоп представляет собой эпитоп, который повышает экспрессию активирующих маркеров на Vδ1 клетке, например, CD107 и CD25 и необязательно, CD69 и/или Ki67. В некоторых вариантах осуществления

активация одного или более активирующих маркеров (таких как CD107a) может быть активацией в присутствии раковых клеток. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения полиспецифические антитела связывают активирующие эпитопы TRDV1, в частности, через связывающий TRDV1 домен.

Поскольку Т-клеточные рецепторы часто образуют комплексы с другими белками, снижение количества Т-клеточного рецептора за счет связывания антитела к Vδ1 может вызвать снижение количества других белков, связанных с Т-клеточным рецептором (т. е. связывание антитела к Vδ1 вызывает снижение количества комплекса Т-клеточного рецептора). Например, в некоторых вариантах осуществления активирующий эпитоп TRDV1 представляет собой эпитоп, который при связывании снижает количество комплекса TCR/рецептор CD3. Таким образом, антитела по изобретению могут вызывать непрямое снижение количества белков клеточной поверхности, которые не связаны с антителом, но образуют комплексы с Т-клеточным рецептором. Учитывая, что Т-клетки, экспрессирующие цепи гамма-дельта 1 (т.е. Vδ1 клетки), представляют собой лишь небольшое количество от общей популяции Т-клеток, антитела по изобретению можно использовать для селективного (и непрямого) снижения количества белков в комплексе TCR, таких как CD3, снижая их количество только в Vδ1 клетках.

В некоторых вариантах осуществления эпитоп, активирующий комплекс рецептора Т-клетки, представляет собой эпитоп, который при активации снижает содержание комплексов Т-клеточного рецептора, но не снижает количество молекул CD3, не связанные с указанным комплексом TCR TRDV1.

Эпитоп предпочтительно состоит из по меньшей мере одной внеклеточной, растворимой, гидрофильной или внешней части Vδ1-цепи γδ TCR.

В частности, эпитоп не содержит эпитоп, обнаруженный в гипервариабельной области Vδ1-цепи γδ TCR, в частности CDR3 Vδ1-цепи. В предпочтительном варианте осуществления эпитоп находится в пределах невариабельной области Vδ1-цепи γδ TCR. Следует понимать, что такое связывание обеспечивает уникальное распознавание Vδ1-цепи без ограничения последовательностей TCR, которые являются сильно вариабельными (в частности, CDR3). Различные комплексы γδ TCR, которые распознают антиген, могут быть распознаны таким образом исключительно по присутствию Vδ1-цепи. В связи с этим будет понятно, что любой γδ TCR, содержащий Vδ1-цепь, может распознаваться с помощью антител или их фрагментов, как определено в данном документе, независимо от специфичности γδ TCR. В одном варианте осуществления эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 1-24 и/или 35-90 SEQ ID NO: 1, например, части Vδ1-цепи, которые не являются частью последовательностей CDR1 и/или CDR3. В одном варианте осуществления эпитоп не содержит аминокислотных остатков в аминокислотной области 91-105 (CDR3) SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит аминокислоты в последовательности CDR2 TRDV-1.

Аналогично хорошо охарактеризованным αβ Т-клеткам, γδ Т-клетки используют определенный набор соматически реаранжированных генов вариабельности (V), разнообразия (D), присоединения (J) и константной области (C), хотя γδ Т-клетки содержат меньше сегментов V, D и J, чем αβ Т-клетки. В одном варианте осуществления эпитоп, связанный с антителами (или их фрагментами), не содержит эпитоп, обнаруженный в J-области Vδ1-цепи (например, одна из четырех J-областей, кодируемых в зародышевой линии дельта-цепи человека: SEQ ID NO:152 (J1*0) или 153 (J2*0) или 154 (J3*0), или 155 (J4*0)), или в C-области Vδ1-цепи (например, SEQ ID NO:156 (C1*0) который содержит C-концевые околомембранные/трансмембранные области). В одном варианте осуществления эпитоп, связанный с антителами (или их фрагментами), не содержит эпитоп, обнаруженный в N-концевой лидерной последовательности Vδ1-цепи (например, SEQ ID NO:150). Таким образом, антитело или его фрагмент могут связываться только в V-области Vδ1-цепи (например, SEQ ID NO: 151).Таким образом, в одном варианте осуществления эпитоп состоит из эпитопа в V-области γδ TCR (*например*, аминокислотные остатки 1-90 из SEQ ID NO: 1).

Ссылки на эпитоп сделаны в отношении последовательности Vδ1, полученной из последовательности, описанной Luoma et al. (2013) Immunity 39: 1032-1042, и записей банка данных белков RCSB: 4MNH и 3OMZ, представленных как SEQ ID NO: 1:

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQLPSKEMIFLIRQGSD EQNAKSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGESLTRADKLIFGKGTRVTV EPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDF KSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS (SEQ ID NO: 1)

SEQ ID NO: 1 представляет собой растворимый TCR, содержащий V-область (также называемую вариабельным доменом), D-область, J-область и константную область TCR. Область V включает аминокислотные остатки 1-90, область D включает аминокислотные остатки 91-104, J-область включает аминокислотные остатки 105-115, а константная область (полученная из Т-клеточного рецептора альфа) включает аминокислотные остатки 116-209. В пределах V-области, CDR1 определяется как аминокислотные остатки 25-34 SEQ ID NO: 1, CDR2 определяется как аминокислотные остатки 50-54 SEQ ID NO: 1, а CDR3 определяется как аминокислотные остатки 93-104. SEQ ID NO: 1 (Xu et al., PNAS USA 108(6):2414-2419 (2011)).

Следовательно, в соответствии с аспектом изобретения предложено выделенное антитело или его фрагмент, которое связывается с эпитопом V-области вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR), содержащего один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей:

(i) 3-20 SEQ ID NO: 1; и/или

(ii) 37-77 SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления антитела или их фрагменты дополнительно распознают полиморфную V-область, содержащую аминокислотные остатки 1-90 эпитопа SEQ ID NO:128. Следовательно, аминокислоты 1-90 SEQ ID NO:1 и последовательность

полиморфного варианта зародышевой линии (аминокислоты 1-90 SEQ ID NO:128) можно считать взаимозаменяемыми при определении описанных в данном документе эпитопов. Представленные в данном документе исследования продемонстрировали, что антитела по изобретению могут распознавать оба варианта этой последовательности зародышевой линии. В качестве примера, если указано, что антитела или их фрагменты, как определено в данном документе, распознают эпитопы, содержащие один или больее аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 1-24 и/или 35-90 SEQ ID NO:1, это также относится к тем же областям SEQ ID NO:128; в частности, аминокислотным областям 1-24 и/или 35-90 SEQ ID NO:128.

В одном варианте осуществления антитела или их фрагменты распознают один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 1-90 SEQ ID NO:1 и эквивалентно расположенных аминокислот областей 1-90 в SEQ ID NO:128. Более конкретно, в одном варианте осуществления антитела или их фрагменты, как определено в данном документе, распознают эпитоп зародышевой линии человека, при этом указанная зародышевая линия кодирует либо аланин (A), либо валин (V) в положении 71 SEQ ID NO:1.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит один или более, например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более, аминокислотных остатков в описанных областях.

В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит один или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в аминокислотной области 3-20 из SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит один или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в аминокислотной области 37-77 из SEQ ID NO: 1 (например, в аминокислотной области 50-54). В еще одном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в аминокислотной области 3-20 (например, 5-20 или 3-17) и один или большее количество (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в аминокислотной области 37-77 (например, 62-77 или 62-69) SEQ ID NO: 1.

Также следует понимать, что указанное антитело (или его фрагмент) не должно связываться со всеми аминокислотами в пределах указанного диапазона. Такие эпитопы можно назвать линейными эпитопами. Например, антитело, которое связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в аминокислотной области 5-20 из SEQ ID NO: 1 может связываться только с одним или большим количеством аминокислотных остатков в указанном диапазоне, *например*, с аминокислотными остатками на каждом конце диапазона (*т. е.* аминокислотными остатками 5 и 20), необязательно включая аминокислоты в пределах этого диапазона (*т. е.* аминокислоты 5, 9, 16 и 20).

В одном варианте осуществления эпитоп содержит по меньшей мере один из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или

77 SEQ ID NO: 1. В дополнительных вариантах осуществления эпитоп содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах следующих аминокислотных областей SEQ ID NO: 1 (или SEQ ID NO: 128, как описано выше):

(i) 3-17;

(ii) 5-20;

(iii) 37-53;

(iv) 50-64;

(v) 59-72;

(vi) 59-77;

(vii) 62-69; и/или

(viii) 62-77.

В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп состоит из одного или большего количества аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки: 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68 и 69 SEQ ID NO: 1 или, соответственно, состоит из аминокислотных остатков: 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68 и 69 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки: 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 SEQ ID NO: 1, или соответственно состоит из аминокислотных остатков: 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 SEQ ID NO: 1. В еще одном варианте осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки: 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 1 или, соответственно, состоит из аминокислотных остатков: 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки: 50, 53, 59, 62 и 64 из SEQ ID NO: 1 или соответственно состоит из аминокислотных остатков: 50, 53, 59, 62 и 64 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки: 59, 60, 68 и 72 SEQ ID NO: 1 или соответственно состоит из аминокислотных остатков: 59, 60, 68 и 72 SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 5-20 и/или 62-77 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп состоит из одного или большего количества аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 5-20 и 62-77 SEQ ID NO: 1. В другом альтернативном варианте осуществления эпитоп

содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 5-20 или 62-77 SEQ ID NO: 1. Антитела или их фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности 1245_P01_E07, или такие антитела или их фрагменты могут быть получены из 1245_P01_E07. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или более последовательностей CDR 1245_P01_E07 или одну или обе последовательности VH и VL 1245_P01_E07, могут связывать такие эпитопы.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 50-64 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп состоит из одного или большего количества аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 50-64 SEQ ID NO: 1. Антитела или их фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности 1252_P01_C08, или такие антитела или их фрагменты могут быть получены из 1252_P01_C08. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или большее количество последовательностей CDR 1252_P01_C08 или одну или обе последовательности VH и VL 1252_P01_C08, могут связывать такие эпитопы.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 37-53 и/или 59-77 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 37-53 и 59-77 SEQ ID NO: 1. В другом альтернативном варианте осуществления эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 37-53 или 59-77 SEQ ID NO: 1. Антитела или их фрагменты, содержащие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности 1245_P02_G04, или такие антитела или их фрагменты могут быть получены из 1245_P02_G04. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или большее количество последовательностей CDR 1245_P02_G04 или одну или обе последовательности VH и VL 1245_P02_G04, могут связывать такие эпитопы.

В одном варианте осуществления эпитоп содержит один или большее количество аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 59-72 SEQ ID NO: 1. В дополнительном варианте осуществления эпитоп состоит из одного или большего количества аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 59-72 SEQ ID NO: 1. Антитела или их фрагменты, содержащие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все последовательности 1251_P02_C05, или такие антитела или их фрагменты могут быть получены из 1251_P02_C05. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или большее количество последовательностей CDR 1251_P02_C05 или одну или обе последовательности VH и VL 1251_P02_C05, могут связывать такие эпитопы.

В одном варианте осуществления эпитоп не содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислотной области 11-21 SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления эпитоп не содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислотной области 21-28

SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления эпитоп не содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислотной области 59 и 60 SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления эпитоп не содержит аминокислотные остатки в пределах аминокислотной области 67-82 SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления эпитоп не является тем же эпитопом, который связывается коммерчески доступным антителом анти-Vδ1, таким как TS-1 или TS8.2. Как описано в WO2017197347, связывание TS-1 и TS8.2 с растворимыми TCR обнаруживалось, когда δ1-цепь включала последовательности Vδ1 J1 и Vδ1 J2, но не Vδ1 J3 цепь, указывая на то, что в связывании TS-1 и TS8.2 участвуют критические остатки в области дельта J1 и дельта J2.

Ссылки на термин «в пределах» в данном документе включают крайние значения определяемого диапазона. Например, фраза «в пределах аминокислотных областей 5-20» относится ко всем аминокислотным остаткам от остатка 5 включительно до остатка 20 включительно.

В данной области техники известны различные методы для определения того, какой эпитоп связывается антителом. Иллюстративные методы включают в себя, например, стандартные анализы перекрестного блокирования, анализ методом аланин-сканирующего мутагенеза, анализ пептидных блотов, анализ расщепления пептидов, кристаллографические исследования и анализ ЯМР. Кроме того, можно использовать такие способы, как удаление эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов. Другой способ, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, представляет собой водород-дейтериевый обмен, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии (как описано в примере 9). В общих чертах, способ водород-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченным дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом антитела, подвергаются водород-дейтериевому обратному обмену с более низкой скоростью, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью поверхности. В результате этого аминокислоты, которые образуют часть поверхности белка/антитела, могут сохранять дейтерий и тем самым демонстрировать относительно более высокую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в поверхность. После диссоциации антитела целевой белок подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело.

Полиспецифические антитела и их фрагменты соответствующим образом специфически связываются как с TRDV1 человека (SEQ ID NO: 1 и полиморфный вариант SEQ ID NO: 128), так и с TRDV1 яванского макака (SEQ ID NO: 172) через TRDV1-связывающий домен.

Антитела, нацеленные на эпитопы второго антигена

Поскольку антитела по настоящему изобретению представляют собой полиспецифические антитела (предпочтительно биспецифические антитела), они специфически связывают второй антиген в дополнение к специфическому связыванию TRDV1. Идентичность второго антигена определяет, относится ли антитело к одной из двух категорий, как обсуждается в данном документе: привлекающему Т-клетки антителу, (TCE), или антителу по типу двойного иммуномодулятора (DI).

В вариантах осуществления, относящихся к TCE, второй антиген представляет собой раковый антиген или ассоциированный с раком антиген. В таких вариантах осуществления антитела специфически связываются с первым целевым эпитопом, при этом первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп V-области вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и второй целевой эпитоп, где второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп ракового антигена или ассоциированного с раком антигена. Идентичность конкретных возможных вторых антигенов в этой категории обсуждается в другом месте. Однако второй антиген может быть любым антигеном, экспрессируемым раковой клеткой, который способствует опосредованному Vδ1 Т-клетками уничтожению указанной раковой клетки (например, прямое уничтожение или за счет эффекта иммунного лицензирования передачи сигналов другим иммунным клеткам при связывании опухолевых клеток). Такому опосредованному Vδ1 клетками уничтожению раковых клеток способствует совместная локализация Vδ1 Т-клеток и раковых клеток и активация Vδ1 Т-клеток посредством связывания полиспецифического антитела, в частности, с активирующим эпитопом Vδ1 Т-клетки. Настоящее изобретение иллюстрирует совершенно новую платформу для антител типа TCE.

В некоторых вариантах осуществления второй антиген не является антигеном карциномы яичника. В некоторых вариантах осуществления второй антиген не является антигеном Mov19+ карциномы яичника. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое (подходящее биспецифическое) антитело не связывается специфически с клетками Mov19+ карциномы яичника. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое (подходящее биспецифическое) антитело не связывается специфически с фолатным рецептором альфа (альфа-FR). Альфа-FR также известен как фолатный рецептор 1, FOLR1, фолатный рецептор альфа или FRα. Он кодируется геном FOLR1 (номер доступа UniProt P15328) и имеет последовательность SEQ ID NO: 176. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое (подходящее биспецифическое) антитело не связывается специфически с эпитопом, связанным с scFv MOV19.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело, при этом второй антиген не является фолатным рецептором альфа.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело представляет собой рекомбинантное антитело человека, кодируемое открытой рамкой считывания или

открытыми рамками считывания рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая экспрессируется из рекомбинантной клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело не является антителом грызуна или другим нечеловеческим антителом, полученным с помощью гибридомных технологий на основе слияния В-клеток. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело не содержит последовательность константного домена нечеловеческого IgG, обнаруженную только у видов животных, отличных от человека, такую как последовательность, обнаруженная в гибридомах, полученных из грызунов.

В вариантах осуществления, относящихся к DI, второй антиген представляет собой иммуномодулирующий антиген. В таких вариантах осуществления антитела специфически связываются с первым целевым эпитопом, при этом первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп V-области вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и второй эпитоп-мишень, где второй целевой эпитоп представляет собой иммуномодулирующий антиген. «Иммуномодулирующий» антиген представляет собой антиген, который модулирует (например, стимулирует) гуморальный и/или клеточный иммунитет. Иммуномодулирующий антиген присутствует на клеточной поверхности Т-клетки. В вариантах осуществления изобретения, в которых второй антиген представляет собой иммуномодулирующий антиген, второй антиген не является Т-клеточным рецептором или компонентом комплексов Т-клеточного рецептора. Например, в вариантах осуществления изобретения, в которых второй эпитоп представляет собой эпитоп иммуномодулирующего антигена, второй эпитоп не является эпитопом TRDV1. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, в которых второй эпитоп представляет собой эпитоп иммуномодулирующего антигена, второй эпитоп не является эпитопом комплекса Т-клеточного рецептора. Например, в некоторых вариантах осуществления второй эпитоп не представляет собой эпитоп CD3. Следовательно, антитела в соответствии с этими вариантами осуществления являются «двойными иммуномодуляторами», поскольку они специфически связываются с Т-клетками через TRDV1 и могут дополнительно связываться с Т-клетками через второй, другой эпитоп, причем эпитоп не представляет собой эпитоп комплекса Т-клеточного рецептора. Примеры вторых антигенов включают, например, ингибиторы иммунных контрольных точек PD-L1, PD-1, OX40, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT и VISTA. Например, солидные опухоли привлекают иммуносупрессивные клетки, такие как миелоидные супрессорные клетки (MDSC), опухолеассоциированные макрофаги (TAM) и регуляторные Т-клетки (Treg), которые ингибируют активность цитотоксических Т-клеток. Таким образом, наиболее эффективное использование DI в солидных опухолях, вероятно, потребует использования полиспецифических фрагментов для нацеливания на пути модуляции Т-клеток в комбинации, чтобы помочь преодолеть иммуносупрессивное TME и превратить «холодную» опухоль, лишенную иммунитета, или с фенотипом «иммунная пустыня» в воспаленную «горячую» опухоль. Однако настоящее изобретение

не ограничивается специфическими вторыми иммуномодулирующими антигенами, поскольку оно представляет собой совершенно новую платформу для антител типа DI.

В предпочтительных вариантах осуществления полиспецифические антитела (соответственно, биспецифические антитела) по изобретению специфически не связываются (или напрямую не взаимодействуют) с CD3. В предпочтительных вариантах второй антиген не представляет собой CD3.

Связывание антител

Полиспецифическое антитело или его фрагмент по изобретению может связываться с Vδ1-цепью γδ TCR с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, менее чем $1,5\times10^{-7}$ М (т.е. 150 нМ). В предпочтительном варианте осуществления KD составляет менее $1,5\times10^{-7}$ М (т.е. 150 нМ). В дополнительном варианте осуществления KD составляет $1,3\times10^{-7}$ М (*т. е.* 130 нМ) или менее, например, $1,0\times10^{-7}$ М (*т. е.* 100 нМ) или менее. В еще одном варианте осуществления KD составляет менее $5,0\times10^{-8}$ М (т.е. 50 нМ), например менее $4,0\times10^{-8}$ М (т.е. 40 нМ), менее $3,0\times10^{-8}$ М (т.е. 30 нМ) или менее $2,0\times10^{-8}$ М (т.е. 20 нМ). Например, в соответствии с некоторыми аспектами предложено человеческое полиспецифическое антитело, которое связывается с Vδ1-цепью γδ TCR с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, менее чем $1,5\times10^{-7}$ М (т.е. 150 нМ).

В одном аспекте изобретения предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, менее чем $4,0\times10^{-8}$ М (*т. е.* 40 нМ), менее чем $3,0\times10^{-8}$ М (*т. е.* 30 нМ) или менее чем $2,0\times10^{-8}$ М (*т. е.* 20 нМ).

Полиспецифическое антитело или его фрагмент по изобретению могут связываться со вторым антигеном (или эпитопом второго антигена) с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, менее чем $1,5\times10^{-7}$ М (т.е. 150 нМ). В предпочтительном варианте осуществления KD составляет менее $1,5\times10^{-7}$ М (т.е. 150 нМ). В дополнительном варианте осуществления KD составляет $1,3\times10^{-7}$ М (*т. е.* 130 нМ) или менее, например, $1,0\times10^{-7}$ М (*т. е.* 100 нМ) или менее. В еще одном варианте осуществления KD составляет менее $5,0\times10^{-8}$ М (т.е. 50 нМ), например, менее $4,0\times10^{-8}$ М (т.е. 40 нМ), менее $3,0\times10^{-8}$ М (т.е. 30 нМ) или менее $2,0\times10^{-8}$ М (т.е. 20 нМ). Например, в соответствии с некоторыми аспектами предложено человеческое полиспецифическое антитело, которое связывается со вторым антигеном (или эпитопом второго антигена) с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, менее чем $1,5\times10^{-7}$ М (т.е. 150 нМ).

В одном аспекте изобретения предложены полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые связываются со вторым антигеном (или эпитопом второго антигена) с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, менее чем $4,0\times10^{-8}$ М (т. е. 40 нМ), менее $3,0 \times 10^{-8}$ М (т. е. 30 нМ) или менее $2,0 \times 10^{-8}$ М (т. е. 20 нМ).

В одном варианте осуществления аффинность связывания полиспецифического антитела или его фрагмента устанавливают путем нанесения антитела или его фрагмента прямо или опосредовано (*например*, путем захвата Fc к IgG человека) на поверхность сенсора (*например*, аминного чипа высокой емкости или эквивалентный), причем мишень, связанная антителом или его фрагментом (т. е. Vδ1-цепь γδ TCR), пропускают через чип для обнаружения связывания. Предпочтительно, прибор MASS-2 (который также может называться Sierra SPR-32) используют при 25°C в рабочем буфере PBS+0,02% Tween 20 со скоростью 30 мкл/мин.

В данном документе описаны и другие анализы, которые можно применять для определения функций антител. Например, антитело или его фрагмент, описанные в данном документе, можно оценивать путем взаимодействия с γδ TCR, например, измерения снижения количества γδ TCR при связывании с антителом. Поверхностную экспрессию γδ TCR после применения антитела или его фрагмента (необязательно присутствующих на поверхности клетки) можно измерить, *например*, с помощью проточной цитометрии. Антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе, также можно оценить путем измерения дегрануляции γδ Т-клеток. Например, экспрессию CD107a, маркера дегрануляции клеток, можно измерить после применения антитела или его фрагмента (необязательно присутствующих на поверхности клетки) к γδ Т-клеткам, *например*, с помощью проточной цитометрии. Антитело или его фрагмент, описанные в данном документе, также могут быть оценены путем измерения активности уничтожения γδ Т-клеток (чтобы проверить, оказывает ли антитело влияние на активность уничтожения γδ Т-клеток). Например, клетки-мишени могут инкубировать с **γδ** Т-клетками в присутствии антитела или его фрагмента (необязательно присутствующих на поверхности клетки). После инкубации культуру могут окрашивать красителем для оценки жизнеспособности клеток, чтобы отличить живые клетки-мишени от мертвых. Долю мертвых клеток затем можно измерить, *например*, с помощью проточной цитометрии.

Мультиспецифические антитела

Антитела по настоящему изобретению являются биспецифическими или полиспецифическими. Полиспецифические антитела, как правило, могут быть специфическими в отношении разных эпитопов одного целевого полипептида или могут быть специфическими в отношении более чем одного целевого полипептида. Однако в настоящем изобретении антитела, как правило, специфически связываются с двумя (или более) различными антигенами.

В различных вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп ракового антигена или ассоциированного с раком антигена (например, опухолеассоциированного антигена). В различных вариантах осуществления раковый антиген или ассоциированный с раком антиген представляет собой антиген, выбранный из AFP, AKAP-4, ALK, альфа-фетопротеина, андрогенового рецептора, B7H3, BAGE, BCA225, BCAA, Bcr-abl, бета-катенина, бета-HCG, человеческого хорионического гонадотропина бета, BORIS, BTAA, CA 125, CA 15-3, CA 195, CA 19-9, CA 242, CA 27.29,

CA 72-4, CA-50, CAM 17.1, CAM43, карбоангидразы IX, карциноэмбрионального антигена, CD22, CD33/IL3Ra, CD68\P1, CDK4, CEA, хондроитинсульфатного протеогликана 4 (CSPG4), c-Met, CO-029, CSPG4, циклина B1, ассоциированного с циклофилином C белка, CYP1B1, E2A-PRL, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EpCAM, EphA2, EphrinB2, антигена вируса Эпштейна-Барра EBVA, ERG (слитого гена TMPRSS2ETS), ETV6-AML, FAP, FGF-5, Fos-родственного антигена 1, фукозил GM1, G250, Ga733\EpCAM, GAGE-1, GAGE-2, GD2, GD3, ассоциированного с глиомой антигена, GloboH, гликолипида F77, GM3, GP 100, GP 100 (Pmel 17), H4-RET, HER-2/neu, HER-2/Neu/ErbB-2, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена (HMW-MAA), HPV E6, HPV E7, hTERT, HTgp-175, обратной транскриптазы теломеразы человека, идиотипа, рецептора IGF-I, IGF-II, IGH-IGK, фактора роста инсулина (IGF)-I, кишечной карбоксиэстеразы, K-ras, LAGE-1a, LCK, лектин-реактивного AFP, легумаина, LMP2, M344, MA-50, Mac-2-связывающего белка, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, MART-1, MART-1/MelanA, M-CSF, связанного с меланомой хондроитинсульфат протеогликана (MCSP), мезотелина, MG7-Ag, ML-IAP, MN-CA IX, MOV18, MUC1, Mum-1, hsp70-2, MYCN, MYL-RAR, NA17, NB/70K, нейрон-глиального антигена 2 (NG2), нейтрофильной эластазы, nm-23H1, NuMa, NY-BR-1, NY-CO-1, NY-ESO, NY-ESO-1, NY-ESO-1, OY-TES1, p15, p16, p180erbB3, p185erbB2, p53, мутанта p53, Page4, PAX3, PAX5, PDGFR-бета, PLAC1, полисиаловой кислоты, опухолевого антигена-1 карциномы предстательной железы (PCTA-1), простатспецифического антигена, простатической кислой фосфатазы (PAP), протеиназы-3 (PR1), PSA, PSCA, PSMA, RAGE-1, Ras, Ras-мутанта, RCAS1, RGS5, RhoC, ROR1, RU1, RU2 (AS), SART3, SDCCAG16, sLe(a), белка спермы 17, SSX2, STn, сурвивина, TA-90, TAAL6, a TAG-72, теломеразы, тиреоглобулина, Tie 2, TIGIT, TLP, Tn, TPS, TRP-1, TRP-2, TRP-2, TSP-180, тирозиназы, VEGF, VEGFR2, VISTA, WT1, XAGE 1, 43-9F, 5T4, и 791Tgp72.

В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп относится к подсемейству ErbB. Erb-B1 (EGFR), Erb-B2 (HER2) являются членами подкласса I суперсемейства рецепторных тирозинкиназ (RTK). В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой RTK. RTK имеют сходную белковую структуру, состоящую из внеклеточного лиганд-связывающего домена и одиночной трансмембранной спирали. Затем они преимущественно подразделяются на отдельные подклассы по природе их внутриклеточного тирозинкиназного домена (TKD) и карбоксильного (C-) концевого хвоста. Области внеклеточных доменов RTK демонстрируют множество консервативных элементов, включая подобные иммуноглобулину (Ig) или эпидермальному фактору роста (EGF) домены. В некоторых вариантах осуществления второй эпитоп представляет собой эпитоп рецепторной тирозинкиназы. Примеры семейства RTK включают VEGFR2, EGFR, c-MET, рецептор IGF-I, PDGFR-бета, CD115, CD117, CD140A, CD140B, CD167a, CD167b, CD172g, CD220, CD246, CD303 CD331, CD332, CD333 и CD340.

Например, в некоторых вариантах осуществления вторым целевым эпитопом является HER2 (рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 типа). HER2 (также известный как ErbB-2 или CD340) представляет собой ассоциированный с раком антиген и является примером рецепторной тирозинкиназы в подсемействе ErbB. Экспрессия HER2 низка в здоровых тканях, с увеличением экспрессии в 40-100 раз при Her2+ злокачественных новообразованиях по сравнению с нормальными тканями. Сверхэкспрессия Her2 связана со многими злокачественными новообразованиями молочной железы, злокачественными новообразованиями желудка, злокачественными новообразованиями пищевода, злокачественными новообразованиями яичников, злокачественными новообразованиями эндометрия, НМРЛ и колоректального рака. При многих злокачественных новообразованиях HER2 димеризуется с другими рецепторами ErbB и приводит к активации различных нисходящих сигнальных путей, что, в свою очередь, приводит к неконтролируемой пролиферации и устойчивости к апоптозу. Сверхэкспрессия HER2 коррелирует с более низкой выживаемостью, и поэтому она является мишенью для улучшения прогноза, а также маркером опухоли. Моноклональные антитела, которые специфически связываются с эпитопами HER2, хорошо известны в данной области техники. Например, трастузумаб представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывается с эпитопом HER2.

В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой EGFR. EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) представляет собой ассоциированный с раком антиген и является примером рецепторной тирозинкиназы в подсемействе ErbB. EGFR экспрессируется во многих органах и играет важную роль в инициации сигналинга, который управляет поведением эпителиальных клеток и опухолей эпителиального происхождения. Опосредованный EGFR сигналинг также участвует в контроле клеточной пролиферации, миграции, выживаемости и метастазирования путем регуляции различных клеточных путей. Как и в случае с другими рецепторными тирозинкиназами, мутации, влияющие на активность EGFR или приводящие к повышению количества EGFR, связаны со многими злокачественными новообразованиями. Фактически, генетические изменения в EGFR наблюдаются в 30% солидных опухолей и, как правило, связаны с плохим прогнозом. Нарушение сигналинга EGFR путем ингибирования связывания EGF с внеклеточным доменом или путем ингибирования активности внутриклеточной тирозинкиназы может ограничивать рост опухоли, экспрессирующей EGFR. Таким образом, ингибиторы EGFR могут быть противораковыми агентами. Действительно, некоторые опухолевые клетки зависят от сигналинга EGFR и, таким образом, обладают «онкогенная аддикция», что делает этот рецептор привлекательной мишенью для терапии. Моноклональные антитела, которые специфически связываются с эпитопами EGFR, хорошо известны в данной области техники. Например, цетуксимаб представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывается с эпитопом EGFR.

В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп В-лимфоцитарного антигена. Примеры антигенов, значительно экспрессируемых на В-клетках, включают CD1d, CD5, CD10, CD11b, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD32A, CD32B CD37,CD39, CD40, CD45, CD52, CD72, CD79a, CD79b, CD138, CD166, CD179A, CD179B, CD180, CD185, CD150, CD213a1, CD213a2, CD217, CD244, CD255, CD229, CD232, CD267, CD268, CD269, CD274, CD277, CD279, CD290, CD300A, CD300C, CD305, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD316, CD319, CD327, CD352, и CD361. Например, в некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой CD19. CD19 (кластер дифференцировки 19) представляет собой ассоциированный с раком антиген. CD19 также является примером трансмембранного гликопротеина I типа в суперсемействе иммуноглобулинов. В некоторых вариантах осуществления вторая мишень представляет собой эпитоп, присутствующий на члене суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). Примеры этого семейства включают CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD19, CD79A, CD79B, CD28, CD48, CD58, CD80, CD86, CD90, CD96, CD147, CD150, CD155, CD229, CD244, CD273, CD274, CD276. CD19 широко экспрессируется на В-клетках на протяжении всего их развития, при этом поверхностная плотность CD19 увеличивается по мере созревания В-клеток. CD19 участвует в рекрутировании сигнальных белков из цитоплазмы. CD19 также участвует в сигнальных путях В-клеточного рецептора и необходим для функционирования В-клеточного рецептора. Его экспрессия на В-клетках делает его полезной мишенью против лейкемии и неопластических лимфоцитов, а также в качестве диагностического биомаркера злокачественных новообразований, возникающих из В-клеток. Мутации CD19 могут привести к снижению выработки антител и иммунодефициту, поэтому CD19 также можно использовать для лечения аутоиммунных заболеваний. Моноклональные антитела, которые специфически связываются с эпитопами CD19, хорошо известны в данной области техники. Например, блинатумомаб представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывается с эпитопом CD19.

В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп присутствует на стромальном антигене опухоли. Примеры опухолевых стромальных антигенов включают FAP-альфа, CD29, CD44, CD73, CD105 и CD166. Например, в некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой FAPα (белок активации фибробластов α). FAPα представляет собой ассоциированный с раком антиген, также известный как сепраза или пролилэндопептидаза FAP. Он избирательно экспрессируется в строме ряда эпителиальных карцином. FAPα является примером сериновой протеазы клеточной поверхности из семейства дипептидилпептидаз. FAPα экспрессируется ассоциированными с раком фибробластами (CAF), которые играют важную роль в микроокружении опухоли. Другие молекулы, селективно экспрессируемые на CAF, включают CD10, CD90, CD140A и CD140B. В некоторых вариантах осуществления второй эпитоп представляет собой эпитоп, присутствующий в молекуле, селективно экспрессируемой на CAF. Обнаружено, что более 90% эпителиальных злокачественных

новообразований (рака молочной железы, колоректального рака кожи и рака поджелудочной железы) экспрессируют FAPα на поверхности CAF в окружающей строме. CAF секретируют хемокин CXCL12, который связывается с CXCR4 на Т-клетках и оказывает иммуносупрессивное действие. Установлено, что FAPα экспрессируется в агрессивных линиях клеток меланомы и значительно повышается у пациентов с плохим исходом и выживаемостью при раке молочной железы. FAPα обладает как коллагеназной, так и дипептидазной активностью и способствует росту, миграции, инвазии, метастазированию и деградации ECM. В нормальных здоровых тканях взрослого человека экспрессия FAPα не обнаруживается за пределами областей ремоделирования тканей или заживления ран, поэтому FAPα является многообещающей противораковой мишенью из-за его почти исключительной экспрессии в строме опухоли и непосредственной роли FAPα в различных аспектах прогрессирования злокачественного новообразования. Моноклональные антитела, которые специфически связываются с эпитопами FAPα, хорошо известны в данной области техники. Например, сибротузумаб представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывается с эпитопом FAPα.

В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп присутствует на гликопротеине клеточной поверхности. Гликозилирование белков является важной и распространенной посттрансляционной модификацией. Считается, что более 50% белков человека гликозилированы для модуляции функциональности белков. Аберрантное гликозилирование коррелирует с несколькими заболеваниями, такими как воспалительные заболевания кожи, сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания, ревматоидный артрит, болезнь Альцгеймера и прионную болезнь, а также злокачественное новообразование. Примеры гликопротеинов клеточной поверхности включают CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD3d, CD3e, CD3g, CD8a, CD8b, CD11a, CD21, CD36, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD66a, CD66f, CD177, CD235a, CD235b, CD236, CD238, CD243, CD227 и CD301. Например, в некоторых вариантах осуществления вторым целевым эпитопом является мезотелин (MSLN). MSLN представляет собой ассоциированный с раком антиген и является примером гликопротеина клеточной поверхности. MSLN имеет ограниченную экспрессию в здоровых клетках (мезотелиальные клетки, выстилающие плевру, брюшину и перикард), но также экспрессируется при ряде злокачественных новообразований (злокачественная мезотелиома и рак поджелудочной железы, холангиокарцинома, аденокарциномы яичников и легких, злокачественная мезотелиома, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак эндометрия, рак желчных путей, рак желудка и детский острый миелоидный лейкоз). MSLN является примером антигена дифференцировки опухоли. Физиологическая функция MSLN неясна, но MSLN является полезной мишенью для локализации терапии на MSLN+ опухоли или может использоваться в качестве онкомаркера. Моноклональные антитела, которые специфически связываются с эпитопами MSLN, хорошо известны в данной области техники. Например, анетумаб

представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывается с эпитопом MSLN.

В различных вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп иммуномодулирующего антигена. Иммуномодулирующие антигены представляют собой антигены, которые модулируют (активируют или подавляют) иммунную систему. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующий антиген представляет собой белок клеточной поверхности (т.е. антиген, экспрессируемый на поверхности клетки, в частности антиген, экспрессируемый на поверхности иммунных клеток, таких как лимфоциты, нейтрофилы, моноциты или макрофаги). Иммуномодулирующий антиген может быть экспрессирован на Vδ1+ Т-клетке или может быть экспрессирован другой клеткой, например, CD4+ клеткой, CD8+ клеткой или другой иммунной клеткой. Иммуномодулирующий антиген может быть выбран из группы, состоящей из B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-DC (CD273), B7-H1 (CD274), B7-H2 (CD275), B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), B7-H5 (VISTA), BTLA (CD272), 4-1BB (CD137), CD137L, CD24, CD27, CD28, CD38, CD40, CD40L (CD154), CD54, CD59, CD70, CTLA4 (CD152), CXCL9, GITR (CD357), HVEM (CD270), ICAM-1 (CD54), ICOS (CD278), LAG-3 (CD223), OX40 (CD134), OX40L (CD252), PD-1 (CD279), PD-L1 (CD274), TIGIT, CD314, CD334, CD335, CD337, и TIM-3 (CD366).

В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп молекулы стимулирующей иммунной контрольной точки. Например, в некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой OX40 (CD134). OX40 представляет собой иммуномодулирующий антиген и пример члена суперсемейства TNFR (TNFRSF). В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп, присутствующий на молекуле TNFRSF. Эти белки представляют собой суперсемейство цитокиновых рецепторов, характеризующихся способностью связывать факторы некроза опухоли (TNF) через внеклеточный богатый цистеином домен. Примеры включают CD18, CD27, CD30, CD40, CD95, CD120a, CD120b, CD134, CD137, CD265, CD268, CD269, CD270, CD271, CD357 и CD358. Один такой пример OX40 (CD134) представляет собой поздний костимулирующий рецептор иммунной контрольной точки, экспрессируемый на CD4+ и CD8+ Т-клетках. OX40 в большей степени экспрессируется на CD4+ Т-клетках и не конститутивно экспрессируется на наивных Т-клетках, поскольку экспрессия OX40 зависит от полной активации Т-клетки. При активации (например, с помощью OX40L) OX40 способствует активации CD4+/CD8+ Т-клеток, выживанию и экспансии эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти, а также подавляет активность Treg. Это подавляет уклонение опухоли от иммунного надзора. Поскольку OX40 является стимулирующей мишенью, терапия, нацеленная на OX40, активирует экспрессирующие OX40 иммунные клетки, чтобы стимулировать иммунный ответ (например, CD48+ Т-клеточный ответ) против опухоли. Моноклональные антитела, которые специфически связываются с эпитопами OX40,

хорошо известны в данной области техники. Например, погализумаб представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывается с эпитопом OX40.

В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп, присутствующий на члене суперсемейства TNF. Например, в некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп 4-1BB (CD137). 4-1BB представляет собой иммуномодулирующий антиген, а также пример члена суперсемейства TNF. Это суперсемейство трансмембранных белков типа II, содержащих домен гомологии TNF, который включает CD70, CD137, CD153, CD154, CD252, CD253, CD254, CD256, CD257 и CD258. 4-1BB (CD137) представляет собой индуцируемый костимулирующий рецептор иммунной контрольной точки, экспрессируемый на Т-клетках, а также на NK-клетках, дендритных клетках (DC), моноцитах, нейтрофилах и В-клетках. 4-1BB является стимулирующим антигеном и особенно экспрессируется на активированных CD8+ Т-клетках. In vitro 4-1BB стимулирует экспансию CD4+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток, макрофагов и DC, а также продукцию цитокинов. In vivo 4-1BB смещен в сторону активации CD8+ Т-клеток и демонстрирует сильную противоопухолевую активность, поскольку показано, что перекрестное связывание 4-1BB усиливает пролиферацию Т-клеток, секрецию IL-2, выживаемость и цитолитическую активность. Поскольку 4-1BB является стимулирующей мишенью, терапия, нацеленная на 4-1BB, активирует экспрессирующие 4-1BB иммунные клетки, чтобы стимулировать иммунный ответ (например, цитолитический CD8+ Т-клеточный ответ) против опухоли. Моноклональные антитела, которые специфически связываются с эпитопами 4-1BB, хорошо известны в данной области техники. Например, утомилумаб представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывается с эпитопом 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой молекулу ингибитора иммунной контрольной точки. Например, в некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой TIGIT (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM). TIGIT представляет собой иммуномодулирующий антиген и является примером ингибитора иммунной контрольной точки, экспрессируемого на Т-клетках, включая γδ Т-клетки и NK-клетки. TIGIT играет роль в иммунном гомеостазе и предотвращении аутоиммунитета путем связывания со своим лигандом (PVR/CD155), что приводит к подавлению Т-клеток. TIGIT сверхэкспрессируется на инфильтрированных опухолью лимфоцитах. Желательна терапевтическая блокада TIGIT, поскольку она увеличивает пролиферацию Т-клеток, продукцию цитокинов и дегрануляцию. Моноклональные антитела, которые специфически связываются с эпитопами TIGIT, хорошо известны в данной области техники. Например, тираголумаб представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывается с эпитопом TIGIT.

В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой молекулу ингибитора иммунной контрольной точки. Например, в некоторых вариантах

осуществления вторым целевым эпитопом является PD-1 (белок програмируемой гибели клеток 1). PD-1 представляет собой иммуномодулирующий антиген и пример рецептора клеточной поверхности из суперсемейства иммуноглобулинов. PD-1 является примером ингибитора иммунной контрольной точки, экспрессируемого на активированных CD4+/CD8+ Т-клетках, а также на других типах иммунных клеток, таких как γδ Т-клетки, В-клетки и макрофаги. Связывание PD-1 с его лигандами приводит к ингибированию активации Т-клеток. В нормальных условиях это играет роль в иммунном гомеостазе, защищая от аутоиммунитета за счет уменьшения апоптоза в Treg и увеличения апоптоза антигенспецифических Т-клеток. В случае злокачественного новообразования это приводит к ускользанию от иммунного ответа опухолевых клеток путем инактивации цитолитических CD8+ Т-клеток. Таким образом, блокада PD-1 является многообещающей терапевтической мишенью. Моноклональные антитела, которые специфически связываются с эпитопами PD-1, хорошо известны в данной области техники. Например, пембролизумаб представляет собой моноклональное антитело, которое специфически связывается с эпитопом PD-1.

В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой молекулу стимулирующей иммунной контрольной точки. Молекулы стимулирующих иммунных контрольных точек включают, например, OX40, OX40L, 4-1BB (CD137), CD137L, CD27, CD70, CD28, GITR, ICOS, CD40 и CD40L. В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой один или несколько эпитопов, выбранных из OX40, OX40L, 4-1BB (CD137), CD137L, CD27, CD70, CD28, GITR, ICOS, CD40 и CD40L. В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой один или более эпитопов, выбранных из OX40 и 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой молекулу ингибитора иммунной контрольной точки. Молекулы ингибитора иммунной контрольной точки включают, например, TIGIT, CD155, PD-1, PD-L1, CTLA-4, B7-H3, B7-H4, BTLA, LAG-3, VISTA и TIM-3. В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой один или более эпитопов, выбранных из TIGIT, CD155, PD-1, PD-L1, CTLA-4, B7-H3, B7-H4, BTLA, LAG-3, VISTA и TIM-3. В некоторых вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой один или более эпитопов, выбранных из TIGIT и PD-1.

Ссылки в данном документе на антиген, находящийся «на» клетке, относятся к антигенам, которые экспрессируются на поверхностной клеточной мембране или связаны с (внеклеточной стороной) поверхностной клеточной мембране таких клеток.

В различных вариантах осуществления второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп антигена кластера дифференцировки CD. Номенклатура кластера дифференцировки (CD) представляет собой унифицирующую систему, с помощью которой идентифицируются и присваиваются названия молекулам клеточной поверхности. Как правило, белкам клеточной поверхности не присваивают номер CD до тех пор, пока не будет выработано по меньшей мере два моноклональных антитела против

указанных белков клеточной поверхности. Таким образом, эта система гарантирует, что все белки клеточной поверхности, которым присвоен номер CD, поддаются распознаванию и связыванию специфическими моноклональными антителами или их фрагментами. В различных вариантах осуществления антиген CD представляет собой антиген, выбранный из CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16a, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32A, CD32B, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64a, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79A, CD79B, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85A, CD85B, CD85C, CD85D, CD85F, CD85G, CD85H, CD85I, CD85J, CD85K, CD85M, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140A, CD140B, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158, CD158A, CD158B1, CD158B2, CD158C, CD158D, CD158E1, CD158E2, CD158F1, CD158F2, CD158G, CD158H, CD158I, CD158J, CD158K, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD167b, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD187, CD188, CD189, CD190, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CDw199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CDw210a, CDw210b, CD211, CD212, CD213a1, CD213a2, CD214, CD215, CD216, CD217, CD218a, CD218b, CD219, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD237, CD238, CD239, CD240CE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245[17], CD246, CD247, CD248, CD249, CD250, CD251, CD252, CD253, CD254, CD255, CD256, CD257, CD258, CD259, CD260, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD285, CD286, CD287, CD288, CD289, CD290, CD291, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300A, CD300C, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD308, CD309, CD310, CD311, CD312, CD313, CD314, CD315, CD316, CD317,

CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD323, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD330, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD344, CD349, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD360, CD361, CD362, CD363, CD364, CD365, CD366, CD367, CD368, CD369, CD370, и CD371.

Сохранение здоровых клеток

Хотя механизмы, с помощью которых γδ Т-клетки распознают антигены и различают здоровые и пораженные клетки, до конца не изучены (Ming Heng and Madalene Heng, *Antigen Recognition by γδ T*-Cells. Madame Curie Bioscience Database [Internet], Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013), тот факт, что γδ Т-клетки способны различать здоровые клетки и пораженные клетки и проявляют заметную полицитотоксичность в отношении пораженных клеток (см. неограничивающие примеры типов клеток в таблице 1), это означает, что их можно использовать для создания улучшенных лекарственных средств с улучшенными терапевтическими окнами. Кроме того, используя такие возможности γδ Т-клеток, появляется возможность лечить болезнь, не затрагивая здоровые клетки, путем колокализации γδ Т-клеток с пораженными клетками, даже если конкретный раковый антиген, воспалительный антиген или антиген патогена либо неизвестен, либо присутствует на здоровых клетках у конкретного пациента.

Таблица 1. Пример раковых клеток, убитых полицитотоксическими Vδ1+ клетками человека

Рак молочной железы	
M-CSF7, T47D, MDA-MB-231	Mahvi et al (1993) Cancer Imm. Immunother. (1993) 37:181-186 Dutta I et al (2017). Front. Immunol. 8:776
Рак легкого	
GLC1, N592	Ferrarini et al (1996) Jn of Nat. Cancer Inst., Volume 88 (7) pp 436-441
Pancreas Cancer	
panc89, QGP-1, PANC-1	Maeurer et al (1996) JEM 183 (4) 1681-1696 Kitayama 1993 Clin Exp Imm 93 (3) 442-7
Рак желудочно-кишечного тракта	
HT29, HCT116, Y, SKCO1, Caco2, HCT116, Lovo, DLD-1, SW480	Wu, et al. (2015), OncoImmunology, 4:3, e992749 Mikulak, et al (2019) JCI Insight. 4(24):e125884 Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Нейробластома	
LAN1, KELLY	Fisher et al (2014) Clin Cancer Res; 20(22); 5720-32

Меланома	
A375	Cordova (2012) Plos ONE 7 (11) e49878
Рак яичника	
OV-1063, SW626	Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Рак печени	
HepG2	Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Рак шейки матки	
HeLa	Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Рак предстательной железы	
DV145, PC-3	Groh et al (1999) PNAS 96 (12) 6879-6884
Множественная миелома	
ARH77, U266	Knight et al (2012) Cytotherapy, 14:9, 1110-1118,
AML	
KG-1, KASUMI-1, OCl-AML3, U937, HL60, MV4 11, AML193, HEL, THP-1	Lorenzo et al (2019) Canc Imm Res 7 (4)
ХЛЛ	
MEC-1	Almeida et al (2016) Clin Can Res 22 (23)

В качестве одного неограничивающего примера, недавние исследования полиспецифичности к CD3xHER2 подчеркивают проблемы современных или традиционных подходов. В частности, использование таких традиционных подходов может привести к менее благоприятным профилям токсичности. Это связано с тем, что, как и многие другие опухолеассоциированные антигены (TAA), антиген HER2 экспрессируется не только при злокачественных новообразованиях, таком как рак молочной железы, но также экспрессируется в здоровых тканях, таких как клетки сердца. Следовательно, применение лекарственных препаратов к CD3xHER2, которые задействуют и совместно локализуют все Т-клетки с HER2-положительными клетками, может привести к менее благоприятным терапевтическим окнам или терапевтическим показателям. Это связано с тем, что такие лекарственные препараты взаимодействуют со всеми Т-клетками, из которых подавляющее большинство в кровотоке будут αβ Т-клетками (CD4+ положительными, CD8+ положительными и т.д.). И как только αβ Т-клетки локализованы совместно с HER2-положительными клетками, такие обычные αβ Т-клетки демонстрируют ограниченные возможности по сохранению здоровых HER2+ клеток и ограниченные способности убивать только пораженные HER2+ клетки. Следовательно, и в качестве примера, в исследованиях на яванских макаках, в которых вводили такие биспецифические соединения к CD3xHER2, в некоторых ситуациях требовалась ранняя эвтаназия (даже в день введения дозы). Кроме того, в ходе этого

примера исследования (см. Staflin et al. (2020) JCI Insight 5(7): e133757) был сделан вывод, что перенацеливание Т-клеток на уничтожение HER2-экспрессирующих клеток может вызывать неблагоприятные эффекты на HER2-экспрессирующие ткани. Было отмечено, что все пораженные или поврежденные ткани, за исключением печени, экспрессировали HER2.

В еще одном неограничивающем примере вторая специфичность связывания может относиться к опухоль-ассоциированному фрагменту, который также участвует в контроле или регулировании функции иммунных клеток. Например, вторая специфичность может быть направлена на так называемый «ингибитор контрольной точки», такой как PD-L1 (CD274) или CD155. Опять же, ни PDL-1, ни CD155 не являются на 100% специфичными для заболевания. Оба белка также могут экспрессироваться на здоровых клетках. Однако полиспецифические антитела, разработанные для специфической колокализации Vδ1+ клеток либо с PD-L1-положительными клетками, либо с CD155-положительными клетками, могут приводить к селективному уничтожению PD-L1- или CD155-положительных пораженных или раковых клеток. Дальнейшее нацеливание на ингибиторы контрольных точек, ассоциированные с заболеванием, присутствующие на пораженных клетках, таких как раковые клетки, будет не только колокализовать Vδ1+ клетки в таких опухолях, но также может оказывать дополнительные благоприятные эффекты, например, путем модулирования или подавления сигналинга PD-1/PD-L1 или TIGIT/CD155, который в противном случае может отрицательно регулировать опосредованные Т-клетками иммунные ответы на заболевание.

Следовательно, вместо использования таких традиционных подходов в данном документе предусмотрены полиспецифические антитела, в которых по меньшей мере одна первая специфичность связывания способна связывать Vδ1+ клетки, а по меньшей мере одна вторая специфичность связывания способна связывать мишени, присутствующие на пораженных тканях и клетках. Таким образом, применение таких полиспецифических антител может привести к колокализации Vδ1+ клеток с пораженными клетками, экспрессирующими вторую мишень. Кроме того, учитывая, что такие ассоциированные с заболеванием мишени часто не являются на 100% специфичными для заболевания, такой подход к нацеливанию и колокализации эффекторных Vδ1+ клеток может быть более предпочтительным по сравнению с обычными подходами. Это связано с тем, что эффекторные Vδ1+ клетки могут быть способны распознавать стрессовые паттерны в пораженных или инфицированных клетках и, таким образом, способны селективно убивать пораженные клетки, сохраняя при этом здоровые клетки, также экспрессирующие ту же мишень.

Поэтому представленные в данном документе полиспецифические антитела способны воздействовать на TCR vδ1 клеток, но полная активация происходит только в присутствии опухолевых клеток. Полное взаимодействие представленных в данное время антител с TCR приводит к частичному снижению количества, и считается, что vδ1 клетки,

связанные с представленными в настоящее время антителами, полностью активируются и становятся цитотоксическими только в присутствии стрессированных клеток, таких как опухолевые клетки. Это показано, например, на Фиг. 25, I, J, K и Фиг. 38 A-F. Это представляет собой еще одно жизненно важное преимущество подхода, представленного в данном документе, с точки зрения безопасности, поскольку нецелевая цитотоксичность снижается, а полный потенциал полиспецифических антител в отношении активации vδ1 клеток раскрывается только в присутствии опухолевых клеток, то есть здоровые клетки (даже здоровые клетки, экспрессирующие второй целевой антиген полиспецифического антитела) сохраняются.

Считается, что один из механизмов, лежащих в основе способности γδ Т-клеток обнаруживать сигналы стресса на опухолевых клетках, связан с NCR (натуральными рецепторами цитотоксичности), которые они экспрессируют. NCR способны взаимодействовать с лигандами NCR на опухолевых клетках. Таким образом, можно использовать двойной механизм активации, при котором γδ Т-клетки активируются посредством стимуляции TCR, в том числе посредством NCR, которые могут распознать опухолевые клетки, чтобы обеспечить полную активацию и цитотоксичность.

Это контрастирует со стимуляцией αß Т-клеток, например, через CD3, например, когда вся стимуляция осуществляется через TCR. Таким образом, такие клетки почти не различают здоровые или трансформированные клетки, потому что они не имеют таких механизмов, как распознавание опухолевых клеток, независимое от презентнации антигена, например, посредством NCR. Следовательно, если антитела к CD3 содержат Fc, они будут привлекать другие иммунные клетки, что может вызвать каскад непредсказуемых и желательных событий, таких как цитокиновый шторм, истощение и даже сверхактивация иммунных клеток, что приводит, например, к тому, что NK-клетки убивают Т-клетки и т. д. В настоящем подходе стимуляция γδ Т-клеток представленными в настоящее время полиспецифическими антителами не вызывает таких проблем, поскольку γδ Т-клетки способны различать здоровые клетки и опухолевые клетки, в том числе с помощью своего механизма распознавания NCR, и поэтому селективно убивают стрессированные клетки, такие как раковые клетки или вирус-инфицированные клетки, благодаря этой специфичности в отношении пораженных клеток.

В еще одном неограничивающем примере у пациента может быть рак печени, при этом специфический для рака печени антиген у пациента не известен. В этом случае вторая специфичность полиспецифического антитела может быть связана с эпитопом, присутствующим на многих или всех клетках печени, таким как, например, асиалогликопротеиновый рецептор 1. Затем это приведет к колокализации γδ Т-клеток в печени, где γδ Т-клетки могут убивать раковые клетки печени, не затрагивая при этом здоровые клетки печени. Это показано, например, на Фиг. 25, I, J, K и Фиг. 38 A-f. В качестве третьего неограничивающего примера, у пациента с раком легкого, когда у пациента не известен антиген рака легкого, вторая специфичность полиспецифического антитела может относиться к эпитопу на нормальной клетке легкого, такому как,

например, SP-1. Это приведет к колокализации γδ Т-клеток в легком, где γδ Т-клетки могут убивать клетки рака легкого, не затрагивая при этом здоровые клетки легких. В качестве четвертого неограничивающего примера, у пациента с В-клеточной лимфомой, при этом у пациента не известен антиген В-клеточной лимфомы, вторая специфичность полиспецифического антитела может относиться к эпитопу на нормальных В-клетках, такому как, например, CD19. В результате этого γδ Т-клетки колокализуются с В-клетками, где γδ Т-клетки могут убивать клетки лимфомы, не затрагивая при этом здоровые В-клетки. Специфические к клетками антигены, ассоциированные с клетками антигены, специфические для тканей антигены и ассоциированные с тканями антигены хорошо известны в данной области техники, и любой такой антиген может быть мишенью для второй специфичности полиспецифических антител по изобретению.

Вторая специфичность связывания может быть нацелена на антиген на одной и той же клетке, что и Vδ1, или на другой клетке того же типа ткани или другого типа ткани. В определенных вариантах осуществления целевой эпитоп может находиться на другой клетке, включая другую Т-клетку, В-клетку, опухолевую клетку, аутоиммунную клетку ткани или вирусно-инфицированную клетку. В качестве альтернативы, целевой эпитоп может находиться на одной и той же клетке.

Полиспецифические антитела или их фрагменты могут быть получены в любом формате при условии, что антитело или его фрагмент обладают множественной специфичностью. Как правило, полиспецифические (подходящим образом биспецифические) антитела по изобретению содержат по меньшей мере два связывающих домена, первый связывающий домен и второй связывающий домен. Первый связывающий домен придает специфичность связывания с первым целевым антигеном (или эпитопом первого целевого антигена), где первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп V-области вариабельного домена цепи-дельта 1 (Vδ1 или TRDV1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR). Второй связывающий домен придает специфичность связывания с вторым целевым антигеном (или эпитопу второго целевого антигена). Второй целевой антиген может быть раковым антигеном или ассоциированным с раком антигеном или второй антиген может быть иммуномодулирующим антигеном.

Примеры форматов полиспецифических антител включают, но не ограничиваются ими, CrossMab, DAF (два в одном), DAF (четыре в одном), DutaMab, DT-IgG, «выступы-во-впадины» (KIH), «выступы-во-впадины» (общую легкую цепь), зарядовую пару, обмен Fab-плечами, SEEDbody, Triomab, LUZ-Y, Fcab, κλ-тело, ортогональный Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L, H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody, DVI-IgG (четыре в одном), наноантитело, наноантитело-HAS, BiTE, диатело, DART, TandAb, одноцепочечное диатело, одноцепочечное диатело-CH3, диатело-CH3, тройное тело, форматы Моррисона, миниантитело, минитело, минитело TriBi, scFv-CH3 KIH, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')2, F(ab)2-scFv2, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, тетравалентное HCAb, одноцепочечное диатело-Fc, диатело-Fc, тандемный scFv-Fc, интраантитело, DOCK-AND-

LOCK, ImmTAC, HSA-тело, одноцепочечное диатело-HAS, тандемный scFv-токсин, IgG-IgG, ov-X-тело, DuoBody, mab^2 и scFv1-PEG-scFv2 (см. Spiess et al. (2015) Molecular Immunology 67:95-106).

Антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, также можно оценить путем измерения его способности к усиленной функциональности в полиспецифическом формате, таком как биспецифический или триспецифический формат. Удивительно, но с помощью таких исследований стало возможным выявить дополнительные функциональные улучшения характеристик антител или их фрагментов, как описано в данном документе (см. Примеры 20 и 21).

Различные полиспецифические форматы, созданные на основе антител, были описаны ранее и обычно конструируются эмпирическим путем из составных связывающих частей. Как правило, после конструирования эффективность таких полиспецифических или связывающих множество мишеней форматов, как описано в данном документе, можно измерить в одной или более из вышеупомянутых модельных систем (гибель клеток, пролиферация клеток, модели, сохранение здоровых клеток/специфические для пораженных клеток и т. д.). Необязательно их также сравнивают с указанными составными частями и другими молекулами сравнения.

Не ограничиваясь этим подходом, в целом при конструировании антител в качестве полиспецифических антител модули связывающего домена для каждой мишени (первой, второй, третьей и т. д.) необязательно строятся из scFv, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, вариабельного домена (например, VH или VL), диатела, минитела или полноразмерных антител. Например, каждый указанный связывающий домен или модуль создается в одном или более из следующих неограничивающих форматов, в которых связывающие домены, содержащие вариабельные домены, и/или полноразмерные антитела, и/или фрагменты антител, функционально соединены последовательно для образования полиспецифических антител.

Примечательно, что полиспецифические антитела, содержащие по меньшей мере один (первый) связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, как описано в данном документе, дополнительно усиливаются, когда указанный первый связывающий домен отформатирован в формате полиспецифического антитела, содержащего по меньшей мере один второй связывающий домен либо против заболеваний, ассоциированных с тканями («твердые») и гемопоэтическими тканями («жидкие»), либо против мишеней, ассоциированных с типом клеток.

Полиспецифические антитела - неограничивающие примеры:

Чтобы показать применимость подхода, была сконструирована серия неограничивающих примеров полиспецифических антител. Эти полиспецифические антитела содержали по меньшей мере один (первый) связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, и по меньшей мере один (второй) связывающий домен, нацеленный на мишень, ассоциированную с заболеванием:

Первый пример; полиспецифическое антитело к Vδ1-EGFR:

В этом примере один связывающий домен (к первой мишени) содержал фрагменты интактного антитела; в частности, VH-CH1-CH2-CH3 и родственные партнеры VL-CL, в то время как второй связывающий домен (ко второй мишени) содержал фрагмент антитела; в частности, формат scFv. Два связывающих модуля затем сливали с помощью линкера. Полученный биспецифический формат иногда называют «форматом Моррисона». В этом случае первый связывающий домен нацелен на Vδ1-цепь γδ TCR, а второй связывающий домен нацелен на EGFR (см. Пример 20).

Второй пример; полиспецифическое антитело к Vδ1-EGFR:

В этом примере один связывающий домен (к первой мишени) содержит вариабельный домен антитела (в частности, содержащий VH и родственный домен VL), в то время как второй связывающий домен (ко второй мишени) содержит связывающий домен в пределах константного домена тяжелой цепи (CH1-CH2-CH3) (см. также EP2546268 A1, таблицу 1/EP3487885 A1). Полученный биспецифический белок содержит первый связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, и второй связывающий домен, нацеленный на рецептор EGF (см. Пример 20).

Третий пример; полиспецифическое антитело к Vδ1-CD19:

В этом примере один связывающий домен (к первой мишени) содержал фрагменты интактного антитела, в частности, VH-CH1-CH2-CH3 и родственные партнеры VL-CL, в то время как второй связывающий домен (ко второй мишени) содержал фрагмент антитела; в частности, формат scFv. Два связывающих модуля затем сливали с помощью линкера. В этом примере полученный биспецифический белок содержал первый связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, и второй связывающий домен, нацеленный на CD19 (см. Пример 21).

Четвертый пример; еще одно полиспецифическое антитело к Vδ1-CD19

Для этого примера было приготовлено дополнительное полиспецифическое антитело, которое специфически связывается как с TRDV1, так и с CD19, и протестировано на связывание антигена (включая TRDV1 человека и яванского макака), активацию Vδ1 клеток и цитотоксичность Vδ1 клеток (см. Примеры 22 и 23).

Пятый пример; полиспецифическое антитело к Vδ1-Her2

Для этого примера получали полиспецифическое антитело, которое специфически связывается как с TRDV1, так и с Her2, и тестировали на связывание антигена, активацию Vδ1 клеток и цитотоксичность Vδ1 клеток (см. Пример 24).

Шестой пример; еще одно полиспецифическое антитело к Vδ1-EGFR

Для этого примера получали дополнительное полиспецифическое антитело, которое специфически связывается как с TRDV1, так и с EGFR, и тестировали на связывание антигена, активацию Vδ1 клеток и цитотоксичность Vδ1 клеток (см. Примеры 26 и 27).

Седьмой пример; поолиспецифическое антитело к Vδ1-FAPα

В этом примере один связывающий домен (к первой мишени) содержал фрагменты интактного антитела, в частности, VH-CH1-CH2-CH3 и родственные партнеры VL-CL, в

то время как второй связывающий домен (ко второй мишени) содержал фрагмент антитела; в частности, формат scFv. Два связывающих модуля затем сливали с помощью линкера. В этом примере полученный биспецифический белок содержал первый связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, и второй связывающий домен, нацеленный на FAPα (см. Пример 29).

Восьмой пример; полиспецифическое антитело к Vδ1-мезотелину

В этом примере один связывающий домен (к первой мишени) содержал фрагменты интактного антитела, в частности, VH-CH1-CH2-CH3 и родственные партнеры VL-CL, в то время как второй связывающий домен (ко второй мишени) содержал фрагмент антитела; в частности, формат scFv. Два связывающих модуля затем сливали с помощью линкера. В этом примере полученный биспецифический белок содержал первый связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, и второй связывающий домен, нацеленный на мезотелин (см. Пример 30).

Девятый пример; полиспецифическое антитело к Vδ1-PD-1

В этом примере один связывающий домен (ко второй мишени) содержал фрагменты интактного антитела, в частности, VH-CH1-CH2-CH3 и родственные партнеры VL-CL, в то время как второй связывающий домен (к первой мишени) содержал фрагмент антитела; в частности, формат scFv. Два связывающих модуля затем сливали с помощью линкера. В этом примере полученный биспецифический белок содержал первый связывающий домен, нацеленный на PD-1, и второй связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR (см. Пример 32).

Десятый пример; полиспецифическое антитело к Vδ1-4-1BB

В этом примере один связывающий домен (к первой мишени) содержал фрагменты интактного антитела, в частности, VH-CH1-CH2-CH3 и родственные партнеры VL-CL, в то время как второй связывающий домен (ко второй мишени) содержал фрагмент антитела; в частности, формат scFv. Два связывающих модуля затем сливали с помощью линкера. В этом примере полученный биспецифический белок содержал первый связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, и второй связывающий домен, нацеленный на 4-1BB (см. Пример 33).

Одиннадцатый пример; полиспецифическое антитело к Vδ1-OX40

В этом примере один связывающий домен (к первой мишени) содержал фрагменты интактного антитела, в частности, VH-CH1-CH2-CH3 и родственные партнеры VL-CL, в то время как второй связывающий домен (ко второй мишени) содержал фрагмент антитела; в частности, формат scFv. Два связывающих модуля затем сливали с помощью линкера. В этом примере полученный биспецифический белок содержал первый связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, и второй связывающий домен, нацеленный на OX40 (см. Пример 34).

Двенадцатый пример; полиспецифическое антитело к Vδ1-TIGIT

В этом примере один связывающий домен (ко второй мишени) содержал фрагменты интактного антитела, в частности, VH-CH1-CH2-CH3 и родственные партнеры

VL-CL, в то время как второй связывающий домен (к первой мишени) содержал фрагмент антитела; в частности, формат scFv. Два связывающих модуля затем сливали с помощью линкера. В этом примере полученный биспецифический белок содержал первый связывающий домен, нацеленный на TIGIT, и второй связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR (см. Пример 35).

Примечательно, что во всех указанных примерах, содержащих по меньшей мере один (первый) связывающий домен, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, наблюдалась повышенная функциональность по меньшей мере одного второго домена, нацеленного на второй эпитоп, по сравнению с контролями и составными частями (см. Примеры 20-35 в данном документе).

В совокупности эти неограничивающие примеры подчеркивают гибкость полиспецифических антител или их фрагментов, как описано в данном документе. В этих неограничивающих примерах показано, что подход полиспецифических антител, при котором антитела или их фрагменты, нацеленные на Vδ1-цепь зародышевой линии (аминокислоты 1-90 SEQ ID NO:1), могут быть дополнительно усилены путем объединения со вторыми связывающими доменами с образованием полиспецифических антитела. В качестве неограничивающих примеров в данном документе предложены полиспецифические антитела с повышенной функциональностью, которые содержат связывающие домены, содержащие интактные антитела (VH-CH1-CH2-CH3 и VL-CL), и/или вариабельные домены (VH и родственные VL или VH-CH1 и родственный VL-CL), и/или фрагменты антител (scFv).

В одном варианте осуществления связывающие домены полиспецифических антител, нацеленные на Vδ1-цепь γδ TCR (первая мишень), могут содержать (i) один или два или более связывающих доменов антител, каждый из которых содержит тяжелую цепь (VH-CH1-CH2-CH3) и родственный партнер легкой цепи (VL-CL) и/или (ii) один, два или более связывающих доменов антитела, каждый из которых содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH или VH-CH1) и родственный партнер вариабельного домена легкой цепи (VL, или VL-VC) и/или (iii) один, два или более связывающих доменов антител, каждый из которых содержит CDR-содержащий фрагмент антитела.

В одном варианте осуществления предложено полиспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере один первый связывающий домен антитела, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, и который функционально связан по меньшей мере с одним вторым связывающим доменом антитела, нацеленным на второй эпитоп. Необязательно указанные связывающие домены содержат по меньшей мере один или более связывающих доменов VH и родственных VL, или один или более связывающих доменов VH-CH1-CH2-CH3 и родственных связывающих доменов VL-CL, или один или более связывающих доменов фрагментов антител. Необязательно указанный второй связывающий домен нацелен на второй эпитоп, связанный с клеточной поверхностью или экспрессируемый на ней. Необязательно указанный второй эпитоп расположен на полипептиде клеточной поверхности, связанном с пораженной клеткой или опухолевой клеткой, или зараженной

вирусом клеткой, или аутоиммунной клеткой ткани. Необязательно, указанный второй эпитоп или эпитопы расположены на ассоциированных с заболеванием и типом клеток антигенах CD19, EGFR, Her2, FAPα, мезотелине, PD-1, 4-1BB, OX40 или TIGIT. Необязательно, указанное полиспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере один первый связывающий домен, полученный из антитела, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, функционально связанный со вторым связывающим доменом, связывающим рецептор EGF, и содержит одну или более из следующих модификаций тяжелой цепи в соответствии с номенклатурой EU: L358T, и/или T359D, и/или K360D, и/или N361G, и/или Q362P, и/или N384T, и/или G385Y, и/или Q386G, и/или D413S, и/или K414Y, и/или S415W, и/или Q418Y, и/или Q419K.

Необязательно, полиспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере один первый связывающий домен, полученный из антитела, нацеленный на Vδ1-цепь γδ TCR, функционально связанный со вторым связывающим доменом, содержащим SEQ ID NO:147, или SEQ ID NO: 148, или SEQ ID NO: 149 или SEQ ID NO:157 или их функционально эквивалентными связывающими вариантами, нацеленными на EGFR, CD19, Her2, FAPα, мезотелин, PD-1, 4-1BB, OX40 или TIGIT. Необязательно полученные полиспецифические антитела содержат SEQ ID NO: 140, или SEQ ID NO: 141, или SEQ ID NO: 142, или SEQ ID NO: 144, или SEQ ID NO: 145, или SEQ ID NO: 146, или SEQ ID NO: 158, или SEQ ID NO: 159. Указанные соединения настоящим включены в качестве неограничивающих новых композиций для облегчения понимания.

В одном аспекте изобретения полиспецифические антитела по изобретению можно использовать в терапевтически эффективных количествах для лечения заболевания или нарушения, например, для облегчения по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения.

В одном варианте осуществления предложен способ выбора, характеристики или сравнения антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR в формате полиспецифического антитела, где указанное полиспецифическое антитело применяют к Vδ1+ клеткам для измерения эффекта, оказываемого указанным полиспецифическим соединением на Vδ1+ клетки (например, на указанный фенотип Vδ1+, и/или цитотоксичность, и/или специфичность к пораженным клеткам, и/или их усиление).

Иммуноконъюгаты

Полиспецифические антитела или их фрагменты по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксин или химиотерапевтический агент. Такие конъюгаты можно назвать иммуноконъюгатами. В контексте данного документа термин «иммуноконъюгат» относится к антителу, которое химически или биологически связано с другим фрагментом, таким как цитотоксин, радиоактивный агент, цитокин, интерферон, целевой или репортерный фрагмент, фермент, токсин, пептид или белок, или терапевтический агент. Антитело может быть связано с цитотоксином, радиоактивным агентом, цитокином, интерфероном, целевым

или репортерным фрагментом, ферментом, токсином, пептидом или терапевтическим агентом в любом месте молекулы при условии, что оно способно связываться со своей мишенью. Примеры иммуноконъюгатов включают в себя конъюгаты антитела с лекарственным средством и слитые белки антитело-токсин. В одном варианте осуществления агент может представлять собой второе другое антитело к Vδ1. В определенных вариантах осуществления антитело может быть конъюгировано с агентом, специфичным в отношении опухолевой клетки или вирусно-инфицированной клетки. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом к Vδ1, и будет учитывать заболевание, подлежащее лечению, и желаемый терапевтический эффект, которого нужно достичь. В одном варианте осуществления агент может представлять собой второе антитело или его фрагмент, которые связываются с молекулой, отличной от Vδ1.

Лекарственные препараты для модуляции γδ Т-клеток

Полиспецифические антитела или их фрагменты, как описано в данном документе, могут быть использованы для модулирования или применимы для модулирования Т-клеток с V-областью вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) у пациента in situ (т.е. in vivo) посредством TRDV1-связывающего домена. Полиспецифические антитела или их фрагменты могут быть включены в состав лекарственных препаратов для таких целей.

Модуляция Vδ1 Т-клеток может включать:

- экспансию Vδ1 Т-клеток, т.е. путем селективного увеличения количества Vδ1 Т-клеток или стимуляции выживаемости Vδ1 Т-клеток;

- стимуляцию Vδ1 Т-клеток, например, путем повышения активности Vδ1 Т-клеток, т. е. повышения уничтожения целевых клеток;

- предотвращение истощения Vδ1 Т-клеток, например, за счет увеличения персистенции Vδ1 Т-клеток;

- дегрануляцию Vδ1 Т-клеток;

- увеличение экспрессии NCR;

- иммуномодуляцию Vδ1 Т-клеток, т.е. путем снижения количества Vδ1 TCR на клеточной

поверхности, т.е. вызывая интернализацию Vδ1 TCR или снижая экспрессию белка Vδ1 TCR, или блокируя связывание Vδ1 TCR; и/или

- снижение количества комплекса TCR/CD3

В отличие от антител к Vδ1 предшествующего уровня техники, которые сосредоточены на истощении Vδ1 Т-клеток, полиспецифические антитела по настоящему изобретению применимы для активации Vδ1 Т-клеток посредством TRDV1-связывающего домена. Хотя они могут вызывать снижение количества TCR на Т-клетках, с которыми они связываются, они не вызывают истощения Т-клеток Vδ1, а скорее стимулируют Т-клетки и, следовательно, могут быть полезны в терапевтических условиях, которые могут быть полезны при активации этого компартмента Т-клеток. Активация Vδ1 Т-клеток проявляется в снижении количества TCR, снижении количества CD3, изменениях в

маркерах активации, таких как CD25 и Ki67, и маркере дегрануляции CD107a. Активация Vδ1 Т-клеток, в свою очередь, запускает высвобождение воспалительных цитокинов, таких как INFɣ и TNFα, для стимулирования иммунного лицензирования.

В одном варианте осуществления изобретения предложено полиспецифическое антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент, отличающееся тем, что оно:

a. вызывает снижение количества TCR на Vδ1 Т-клетках;

b. не проявляет CDC или ADCC; и

c. не истощает Vδ1 Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающие фрагменты также стимулируют пролиферацию Vδ1 Т-клеток.

Истощение Т-клеток представляет собой процесс устранения или уменьшения гибели Т-клеток. Ссылки на полиспецифические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, не вызывающие истощения Vδ1 Т-клеток, относятся к истощению менее около 30% или менее около 20% (предпочтительно менее около 10%) жизнеспособной популяции Vδ1 Т-клеток при инкубации с одним или более антителами по изобретению, как описано в данном документе, и при измерении любым подходящим способом в контролируемом исследовании (например, с помощью методологии контролируемой проточной цитометрии или с помощью других установленных контролируемых анализов).

ADCC и CDC представляют собой механизмы, посредством которых может происходить истощение Т-клеток. Ссылка на антитела или антигенсвязывающие фрагменты, не вызывающие ADCC или CDC, относится к истощению менее около 30% или менее около 20% (предпочтительно менее около 10%) жизнеспособной популяции Vδ1 Т-клеток посредством ADCC и/или CDC при инкубации с одним или более антителами по изобретению, как описано в данном документе, при измерении любым подходящим способом (например, с помощью методологии контролируемой проточной цитометрии или с помощью других установленных контролируемых анализов).

В одном варианте осуществления предложено полиспецифическое антитело к Vδ1 или его антигенсвязывающий фрагмент, отличающиеся тем, что они не индуцируют секрецию IL-17A. IL-17A (интерлейкин-17A) представляет собой проонкогенный цитокин, продуцируемый активированными Т-клетками. IL-17A может усиливать рост опухоли и ослаблять противораковый иммунный ответ. Как показано на **Фиг. 38, G-I**, антитела к vδ1 не индуцируют секрецию IL-17A, тогда как антитела к CD3 индуцируют. Ссылка на антитела или антигенсвязывающие фрагменты в данном документе, не индуцирующие секрецию IL-17A, относится к индукции менее около 30%, или менее около 20%, или менее около 10% секреции IL-17A, индуцированной эквивалентными полиспецифическими антителами к CD3.

Некоторые из следующих разделов относятся к антителам к Vδ1, представленным в моноспецифическом формате, применение которых в полиспецифических (подходящих биспецифических) форматах специально предусмотрено настоящим изобретением. Соответственно, функциональные свойства антител, когда они предоставлены в

моноспецифическом формате, являются общими для полиспецифических антител по изобретению, которые дополнительно специфически связываются со вторым антигеном.

Лекарственные препараты, которые модулируют маркеры иммунных клеток на Vδ1+ клетках

Полиспецифическое антитело или его фрагмент могут модулировать маркеры иммунных клеток, таких как Vδ1+ клетки, при введении пациенту.

Полиспецифическое антитело или его фрагмент, описанный в данном документе, также может быть оценен на пригодность для терапевтического использования путем измерения модуляции γδ Т, и такая оценка может быть проведена, когда антитело представлено в моноспецифическом формате. Например, путем измерения изменения уровней CD25, или CD69, или CD107a, присутствующих на Vδ1+ Т-клетке или клетках в модельной системе. Такие маркеры часто используются в качестве маркеров модуляции лимфоцитов (например, пролиферации или дегрануляции) и могут быть измерены после применения антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, например, методом проточной цитометрии. Неожиданно, во время таких оценок (например, см., например, Примеры 7, 17, 18) было обнаружено, что моноспецифические версии полиспецифических антител, как описано в данном документе, обеспечивают измеримо более высокие уровни CD25, или CD69, или CD107a на целевых Vδ1+ Т-клетках. Необязательно, изменение фенотипа Vδ1+ клеток или их популяции, тестируемых в модельной системе, затем можно сравнить с изменением фенотипа при применении альтернативного антитела сравнения (например, OKT-3, TS8.2 и т. д.) к указанным эквивалентным γδ Т-клеткам.

Таким образом, в одном из аспектов изобретения предложен способ оценки антитела или его фрагмента, связывающегося с Vδ1-цепью γδ TCR, для терапевтического применения, включающий введение антитела или его фрагмента в клеточную популяцию, содержащую Vδ1+ клетки, и определение влияние на уровень CD25, и/или CD69, и/или CD107a на поверхности Vδ1+ клеток. Влияние на уровень CD25, CD69 и/или CD107a можно определить/измерить в течение определенного периода времени. Будет понятно, что эффект можно измерить по сравнению с уровнем CD25, и/или CD69, и/или CD107a на поверхности Vδ1+ клетки, когда указанное антитело не применяется к указанной клетке в течение того же периода времени. В еще одном аспекте изобретения предложен способ отбора, характеристики или сравнения антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем добавления указанных антител к клеточной популяции, содержащей Vδ1+ клетки, и последующего измерения уровня (или экспрессии) CD25, или CD69, или CD107a на поверхности указанных Vδ1+ клеток.

Лекарственные препараты, которые модулируют свойства роста или количество Vδ1+ клеток

Полиспецифическое антитело или его фрагмент могут модулировать свойства роста Vδ1+ клеток при введении пациенту. Например, полиспецифическое антитело или его фрагмент может способствовать экспансии Vδ1+ клеток.

Альтернативный подход к измерению пролиферации γδ Т может включать измерение изменения относительного количества Vδ1+ клеток в зависимости от времени при применении антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, к модельным системам, содержащим указанные клетки. Удивительно, но в ходе оценивания было замечено, что антитела, описанные в данном документе, при обеспечении в моноспецифическом формате способны измеримо увеличивать количество указанных Vδ1+ Т-клеток (например, см. Примеры 10, 17 и 18), по желанию это изменение числа можно затем сравнить с изменением числа, наблюдаемым при применении альтернативного антитела сравнения (например, анти-ОКТ3) в указанных модельных системах.

Таким образом, в другом аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или его фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий введение антитела или его фрагмента в клеточную популяцию, содержащую Vδ1+ клетки, и определение эффекта на количество Vδ1+ клеток в популяции. Влияние на количество клеток можно определить/измерить в течение определенного периода времени. Будет понятно, что эффект можно измерить по сравнению с эффектом на количество клеток, наблюдаемым, когда указанное антитело не применяется к клеточной популяции в течение того же периода времени. В еще одном аспекте изобретения предложен способ отбора или определения характеристик, или сравнения антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем применения указанных антител к клеточной популяции, содержащей Vδ1+ клетки, и последующего измерения количества указанных клеток в зависимости от времени.

Лекарственные препараты, модулирующие пролиферативный потенциал и количество Vδ1+ клеток

Идеальное терапевтическое полиспецифическое антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, которое связывается с Vδ1-цепью γδ TCR, может быть таким, которое способно усиливать пролиферацию Vδ1+ клеток in vivo. Затем такие антитела можно использовать в качестве лекарственных препаратов, предназначенных для специфического увеличения числа Vδ1+ клеток у субъекта или пациента. Например:

Рак:

Сообщается, что относительное увеличение количества Vδ1+ клеток является положительным прогностическим показателем, связанным с улучшением результатов лечения многих злокачественных новообразований (например, см. Gentles et al (2015) Nature Immunology 21: 938-945; Wu et al. (2019) Sci. Trans. Med. 11(513): eaax9364; Catellani et al. (2007) Blood 109(5): 2078-2085). В одном варианте осуществления в данном документе представлен лекарственный препарат, способный увеличивать относительное

или абсолютное количество Vδ1+ клеток in situ у пациента со злокачественным новообразованием.

Патогенные/паразитарные/вирусные инфекции:

Обогащение Vδ1+ клеток наблюдается во время защиты хозяина от многочисленных приобретенных патогенных/паразитарных/вирусных инфекций. Последний общий обзор см. Zhao et al. (2018) Immunol. Res. 2018:5081634. Кроме того, повышенное количество Vδ1+ также считается показателем защиты против различных ДНК- и РНК-вирусных инфекций. Например, повышенное количество также считается показателем защиты при ЦМВ-инфекциях, связанных с аллогенными трансплантатами (см. van Dorp et al. (2011) Biology of Blood and Marrow Transplantation 17(2): S217). Кроме того, у пациентов с коронавирусной инфекцией увеличивается количество Vδ+ клеток (Poccia et al. (2006) J. Infect. Dis. 193(9): 1244-1249).

В еще одном варианте осуществления в данном документе представлен лекарственный препарат, способный увеличивать относительное или абсолютное количество Vδ1+ клеток у субъекта или пациента с патогенной инфекцией.

Трансплантация стволовых клеток:

Увеличение количества Vδ1+ клеток также было связано с меньшим количеством рецидивов заболевания, меньшим количеством вирусных инфекций, более высокой общей и безрецидивной выживаемостью и благоприятными клиническими исходами в целом во время трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (например, см. Aruda et al. (2019) Blood 3(21): 3436-3448 and see Godder et al. (2007) Bone Marrow Transplantation 39: 751-757). Следовательно, другой вариант осуществления, представленный в данном документе, представляет собой лекарственный препарат, способный увеличивать относительное или абсолютное количество Vδ1+ клеток у субъекта как часть схемы лечения, поддерживающей трансплантацию стволовых клеток.

Следовательно, лекарственный препарат, способный предпочтительно или специфически увеличивать количество Vδ1+ клеток in situ, является весьма желательным.

Лекарственные препараты, которые поддерживают, индуцируют или увеличивают секрецию цитокинов Vδ1+ клетками

Цитокины представляют собой большую группу белков, пептидов или гликопротеинов, которые секретируются специфическими клетками иммунной системы. Они представляют собой категорию сигнальных молекул, которые опосредуют и регулируют иммунитет, воспаление и кроветворение. Ряд цитокинов участвует в уменьшении признаков и симптомов заболевания посредством прямой или косвенной модуляции опухолевого и клеточного микроокружения, аутоиммунной ткани и связанного с ней микроокружения или инфицированной вирусом ткани или клеточного окружения. Примеры провоспалительных цитокинов включают фактор некроза опухоли-альфа (TNFα) и интерферон-гамма (IFNγ).

Однако многие такие цитокины проявляют неблагоприятную токсичность при системном введении. Например, в то время как TNFα может вызывать геморрагический

некроз трансплантированных опухолей и, как сообщается, оказывает синергическое противоопухолевое действие в сочетании с другими химиотерапевтическими препаратами, различные клинические испытания рекомбинантного человеческого TNFα (rhTNFα) для системного введения выявили значительные дозолимитирующие побочные эффекты, включая гипотонию, ригидность, флебит, тромбоцитопению, лейкопению и гепатотоксичность, лихорадку, утомляемость, тошноту/рвоту, недомогание и слабость, головную боль, чувство сдавленности в груди, боль в пояснице, диарею и одышку.

Применение рекомбинантного IFNγ также сопряжено с аналогичными проблемами системной токсичности. Например, при злокачественном новообразовании IFNγ может оказывать благоприятные плейотропные эффекты, включая повышенную регуляцию MHC класса I и II для стимуляции противоопухолевого иммунитета, увеличения инфильтрации Т-клеток, усиление антиангиогенного эффекта, индуцирование секреции хемокинов/цитокинов и оказание прямого антипролиферативного эффекта на раковые клетки, также наблюдаются неблагоприятные побочные эффекты. К ним относятся лихорадка, головная боль, озноб, утомляемость, диарея, тошнота, рвота, анорексия, транзиторное повышение активности печеночных трансаминаз и транзиторное снижение количества гранулоцитов и лейкоцитов.

В недавнем обзоре о потенциале и ограничениях системных рекомбинантных TNFα и IFNγ см. в Shen et al. (2018) Cell Prolif. 51(4): e12441.

Следовательно, существует потребность в более контролируемой in situ, более локализованной, более специфичной для тканей или клеток продукции таких цитокинов. Например, в качестве одного из подходов предлагается более контролируемая экспрессия или индукция провоспалительных цитокинов, с помощью которой «холодные» опухоли можно превратить в «горячие». Горячие опухоли также иногда называют «воспаленные Т-клетками» из-за наблюдаемого увеличения количества или плотности CD45+ Т-клеток. См. Bonaventura et al. (2019) Front. Immunol. 10: 168 для ознакомления с последним обзором.

По этим причинам идеальным терапевтическим полиспецифическим антителом или его фрагментом, как описано в данном документе, которое связывается с Vδ1-цепью γδ TCR, может быть такое антитело, которое может поддерживать, усиливать или индуцировать секрецию цитокинов в Vδ1+ клетках in vivo. Затем такие антитела можно использовать в качестве лекарственных препаратов, предназначенных для специфического увеличения или индукции цитокинов у субъекта или пациента и более локализованным, менее системным образом, который лучше коррелирует с распределением Vδ1+ клеток у указанного субъекта или пациента.

Примечательно, что когда моноспецифические версии описанных в данном документе полиспецифических антител, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, применяются к Vδ1+ клеткам, наблюдается значительно более высокий уровень секретируемых цитокинов. Более конкретно, и в качестве неограничивающего примера, наблюдается значительно более высокий уровень TNFα и IFNγ. См., например, Пример 15.

Таким образом, в другом аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или полиспецифического антитела или его фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий введение антитела или его фрагмента в клеточную популяцию, содержащую Vδ1+ клетки, и определение количества по крайней мере одного цитокина, продуцируемого клеточной популяцией. Количество продуцируемого цитокина можно определить/измерить за определенный период времени и, необязательно, сравнить с количеством, наблюдаемым, когда указанное антитело не применяют к клеточной популяции в течение того же периода времени. В одном варианте осуществления наблюдаемый уровень цитокина, продуцируемого при введении антитела в клеточную популяцию, составляет более чем около 10%, более чем около 20%, более чем около 30%, более чем около 50%, более чем около 100%, более чем около 150%, более чем около 200%, более чем около 250%, более чем около 300%, более чем около 350%, более чем около 400%, более чем около 450%, более чем около 500%, более чем около 1000% по отношению к уровню продукции цитокинов, когда антитело не применяется. В дополнительном аспекте изобретения цитокин представляет собой провоспалительный цитокин. В дополнительном аспекте изобретения цитокин представляет собой цитокин TNF-α. В дополнительном аспекте изобретения речь идет о цитокине IFN-γ.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ отбора, или определения характеристик или сравнения антител или полиспецифических антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем применения указанных антител к клеточной популяции, содержащей Vδ1+ клетки, и последующего измерения уровня по меньшей мере одного образовавшегося цитокина. В дополнительном аспекте изобретения измеряемый цитокин представляет собой цитокин TNF-α и/или цитокин IFN-γ.

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или полиспецифического антитела или его фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем применения указанного антитела или его фрагмента к клеточной популяции, содержащей Vδ1+ клетки, и измерения эффект антитела на модулирование более холодной или холодной опухоли, чтобы она стала более горячей или горячей опухолью, путем определения количества продуцируемых провоспалительных цитокинов и/или количества или плотности CD45+ Т-клеток, присутствующих в опухоли или микроокружении опухоли.

Лекарственные препараты, которые поддерживают, индуцируют или повышают активность гранзима В Vδ1+ клеток.

Гранзим В представляет собой сериновую протеазу, обычно встречающуюся в гранулах натуральных клеток-киллеров (NK-клеток) и цитотоксических Т-клеток. Он секретируется этими клетками вместе с порообразующим белком перфорином, чтобы опосредовать апоптоз в целевых клетках, таких как пораженные клетки.

Когда Vδ1+ клетки инкубируют в совместных культурах с пораженными целевыми клетками (такими как раковые клетки) в модельных системах, уровни и активность

гранзима B можно измерить в пораженных целевых клетках до лизиса. Примечательно, что когда антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, которое связывается с Vδ1-цепью γδ TCR, то применяется к таким совместным культурам Vδ1+ клеток и раковых клеток в таких модельных системах, в пораженных раковых клетках наблюдается более высокий уровень и активность гранзима B, что предшествует гибели клеток (см., например, Пример 16).

Следовательно, в другом аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или его фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью TCR γδ, включающий введение антитела или его фрагмента в совместную культуру, содержащую Vδ1+ клетки и пораженные клетки (такие как как раковые клетки), и измерение влияния на количество гранзима B, продуцируемого пораженными клетками в совместной культуре. Количество продуцируемого цитокина можно определить/измерить в течение определенного периода времени и, необязательно, сравнить с количеством, наблюдаемым, когда указанное антитело не применялось к указанным совместным культурам в течение того же периода времени. В одном варианте осуществления уровень гранзима B, измеренный при применении указанного антитела к указанной совместной культуре, составляет более около 10%, более около 20%, более около 30%, более около 40%, более около 50%, более около 70%, более около 80%, более около 90%, более около 100%, более около 200% относительно уровня гранзима B, наблюдаемого, когда указанное антитело не применяется.

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ отбора или определения характеристик или сравнения антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем применения указанных антител к совместной культуре, содержащей Vδ1+ клетки и пораженные клетки, и затем измерения количества или активности гранзима B в пораженной клетке.

Лекарственные препараты, которые способствуют экспансии популяций поликлональных Vδ1+ клеток

Идеальный лекарственный препарат на основе полиспецифического антитела также может быть разработан для обеспечения того, чтобы размножающиеся Vδ1+ клетки не становились слишком клональными на уровне гипервариабельной последовательности CDR3. Следовательно, идеальный лекарственный препарат на основе антител может быть разработан таким образом, чтобы избежать индукции пролиферации Vδ1+ клеток путем связывания со специфическими или «частными» паратопами последовательности CDR3 δ1+. Скорее, антитело может связываться через консервативные последовательности зародышевой линии, присутствующие на всех рецепторах Vδ1+ Т-клеток, и независимым от гамма-цепи образом, а не связываться с последовательностями, презентированными только субпопуляцией Vδ1+ клеток.

Следовательно, идеальный лекарственный препарат на основе антител может стимулировать экспансию Vδ1+ клеток с образованием множества Vδ1+ клеток, содержащих смесь последовательностей CDR3. Это, в свою очередь, привело бы к

количественно увеличенной in vivo гетерогенной поликлональной популяции Vδ1+ клеток, демонстрирующих различные последовательности CDR3 на V-областях вариабельных доменов дельта-цепи 1. Примечательно, что во время анализа количественно увеличенных популяций Vδ1+ клеток, полученных методом добавления антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, к исходной популяции иммунных клеток, содержащей Vδ1+ клетки, наблюдается экстенсивная поликлональность с помощью методологий, основанных на РНК-секвенировании, разработанных для секвенирования по гипервариабельным областям CDR3 выделенной РНК (см., например, Пример 10).

Соответственно, в одном аспекте предложен способ оценки антитела или его фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий введение антитела или его фрагмента в популяцию клеток, содержащую Vδ1+ клетки, и определение поликлональности увеличенных количественно Vδ1+ клеток. Предпочтительно, чтобы лекарственный препарат на основе антител способствовал получению увеличенной количественно поликлональной популяции, содержащей множество последовательностей CDR3 Vδ1+. Поликлональность можно определить с использованием способов, известных в данной области техники, таких как подходы к секвенированию нуклеиновых кислот, позволяющие анализировать содержание гипервариабельных CDR3 Vδ1-цепи в указанных Vδ1+ клетках.

Лекарственные препараты, которые способствуют экспансии поликлональных Vδ1+ клеток в течение длительных периодов времени.

Идеальный лекарственный препарат на основе полиспецифического антитела может усиливать или способствовать или стимулировать пролиферацию первичных Vδ1+ клеток без истощения таких клеток in vivo. Например, для сравнения, лекарственные препараты на основе антител к CD3, такие как OKT3 (например, муромонаб), хотя и способны увеличивать количество CD3-положительных Т-клеток, могут также истощать или вызывать анергию. Для оценки способности моноспецифических версий полиспецифических антител, описанных в данном документе и которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, стимулировать непрерывное клеточное деление жизнеспособных Vδ1+ клеток, были проведены более длительные исследования пролиферации с использованием моноспецифических антител. Примечательно, что эти исследования показали, что моноспецифические варианты полиспецифических антител, как описано в данном документе, и которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, способны управлять клеточным делением/пролиферацией жизнеспособных и все еще функционально цитотоксических Vδ1+ клеток в течение более 40 дней (см., например, Пример 10).

В одном варианте осуществления предложен способ оценки антитела или его фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий применение антитела или его фрагмента к популяции клеток и отслеживание продолжительности времени, в течение которого происходит деление Vδ1+ клеток . В идеале антитело способно

стимулировать деление Vδ1+ клеток в течение периода от 5 до 60 дней, например, по меньшей мере, от 7 до 45 дней, от 7 до 21 дня или от 7 до 18 дней.

В другом варианте осуществления предложено полиспецифическое антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, которое связывается с Vδ1-цепью γδ TCR и которое при введении пациенту способно стимулировать деление Vδ1+ клеток, увеличивая количество в по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 25 раз, по меньшей мере 50 раз, по меньшей мере 60 раз, по меньшей мере 70 раз, по меньшей мере 80 раз, по меньшей мере 90 раз, по меньшей мере 100 раз, по меньшей мере 200 раз, по меньшей мере 300 раз, по меньшей мере 400 раз, по меньшей мере 500 раз, по меньшей мере 600 раз, по меньшей мере 1000 раз .

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ отбора или определения характеристик, или сравнения антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем применения указанных антител к Vδ1+ клеткам или смешанной популяцию клеток, содержащей Vδ1+ клетки, и затем измерения количества Vδ1+ клеток в зависимости от времени.

Лекарственные препараты, которые модулируют иммунные клетки, отличные от Vδ1+ клеток, путем нацеливания на Vδ1+ иммунные клетки.

Полиспецифическое антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, также можно оценить путем измерения модуляции, опосредованной Vδ1+ клетками, других иммунных клеток. Например, изменение, наблюдаемое во «фракции» Т-клеток, отличных от γδ Т-клеток, можно измерить после применения антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, в модельной системе, содержащей смешанную популяцию иммунных клеток, такой как система, содержащая αβ клетки ткани человека и γδ Т-клетки. Кроме того, эффект на типы Т-клеток, отличных от γδ клеток, в указанных моделях можно измерить с помощью проточной цитометрии. Например, путем измерения относительного изменения количества CD8+ αβ Т-клеток при добавлении антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, к смешанным культурам, содержащим γδ Т-клетки и Т-клетки, отличные от γδ Т-клеток. Необязательно наблюдаемое изменение количества или фенотипа популяции CD8+ лимфоцитов, отличных от γδ Т-клеток, затем можно сравнить с изменением количества, когда к указанной смешанной популяции применяется альтернативное антитело сравнения (например, OKT-3).

Следовательно, в другом аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или его фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий введение антитела или его фрагмента в смешанную популяцию иммунных клеток или тканей, содержащих Vδ1+ клетки и Vδ1-отрицательные иммунные клетки и измерение влияния на Vδ1-отрицательные иммунные клетки. Эффект можно определить/измерить в течение определенного периода времени и, необязательно, сравнить с эффектом, наблюдаемым для Vδ1-отрицательных клеток, когда указанное антитело не применяется в течение того же периода времени. Эффект можно измерить как изменение количества Vδ1-отрицательных иммунных клеток. Например, антитело может увеличить количество Vδ1-

отрицательных иммунных клеток более чем около 10%, более чем около 20%, более чем около 30%, более чем около 40%, более чем около 50%, более чем около 70%, более чем около 80%, более чем около 90%, более чем около 100%, более чем около 500% относительно уровней, наблюдаемых, если указанное антитело не применяется.

В дополнительном аспекте изобретения модулируемая Vδ1-отрицательная клетка представляет собой CD45+ клетку. В дополнительном аспекте изобретения модулируемая клетка представляет собой αβ Т-клетку. В дополнительном аспекте изобретения модулируемая αβ+ клетка представляет собой CD8+ лимфоцит. В дополнительном аспекте изобретения модулируемые αβ Т-клетки или их популяция проявляют признаки усиленного клеточного деления. В дополнительном аспекте изобретения предложен способ отбора или определения характеристик или сравнения антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем введения указанных антител в популяцию смешанных иммунных клеток, содержащих Vδ1+ клетки и Vδ1-отрицательные иммунные клетки, а затем измерение эффекта, оказываемого на Vδ1-отрицательную клеточную популяцию Vδ1+ клетками, модулированными указанными антителами или их фрагментами.

Необязательно и во время «опосредованной Vδ1+ клетками модуляции иммунной системы», которая обеспечивается антителом или его фрагментом, как описано в данном документе, также наблюдается сопутствующее увеличение количества Vδ1+ клеток. И хотя это не связано с этой теорией, возможно, что указанное увеличение числа Vδ1+ клеток может быть причиной сопутствующей экспансии одновременно присутствующих Vδ1-отрицательных иммунных клеток, таких как αβ Т-клетки. Альтернативная гипотеза может заключаться в том, что индуцированная антителами секреция цитокинов Vδ1+ Т-клетками стимулирует экспансию Vδ1-отрицательных иммунных клеток.

В дополнительном аспекте изобретения наблюдаемое увеличение популяции αβ+ CD8+ лимфоцитов сравнивают с антителом сравнения, таким как антитело OKT3 или альтернативное антитело к Vδ1. В еще одном аспекте изобретения предложен способ отбора, характеристики или сравнения антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем применения указанных антител к популяции смешанных иммунных клеток, содержащих Vδ1+ Т- клеток и αβ Т-клеток, а затем измеряли количество CD8+ αβ+ лимфоцитов в зависимости от времени.

Лекарственные препараты, которые модулируют инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL)

Полиспецифическое антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, также можно оценить путем измерения эффекта, оказываемого на инфильтрирующие опухоль популяции (TIL) в модельных системах. Неожиданно (см., например, Пример 18) во время таких оценок моноспецифические варианты полиспецифических антител, как описано в данном документе, заметно модулировали популяции TIL в опухолях человека. Например, изменение количества или фенотипа популяции TIL γδ+ лимфоцитов или популяции TIL, отличных от γδ лимфоцитов, измеряют после применения антитела или

его фрагмента, как описано в данном документе, к опухоли человека, такой как почечно-клеточная карцинома человека. Необязательно наблюдаемое изменение числа или фенотипа либо популяции TIL γδ+-лимфоцитов, либо популяции TIL, отличных от γδ лимфоцитов, можно затем сравнить с изменением, наблюдаемым при применении альтернативного антитела сравнения (например, OKT-3) к указанной модельной системе.

Следовательно, в еще одном аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или его фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий введение антитела или его фрагмента в TIL, расположенные в опухоли человека или полученные из нее, и определение эффекта на количество TIL. Эффект можно определить/измерить в течение определенного периода времени и, необязательно, можно сравнить с числом TIL, наблюдаемым, если указанное антитело не применялось в течение того же периода времени. Эффектом может быть увеличение количества TIL. Например, антитело может увеличить количество TIL на более чем около 10%, более чем около 20%, более чем около 30%, более чем около 40%, более чем около 50%, более чем около 70%, более чем около 80%, более чем около 90%, более чем около 100% относительно количества TIL, наблюдаемых, если указанное антитело не применялось. В другом аспекте, TIL, для которых отмечено указанное количество, представляют собой γδ+ лимфоциты TIL и/или TIL, отличные от γδ клеток.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ выбора или определения характеристик, или сравнения антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью клеток с γδ TCR, путем применения указанных антител к TIL или TIL, расположенным в или происходящим из опухоли человека, и последующего измерения изменения количества клеток TIL или TIL в течение определенного периода времени.

Лекарственные препараты, которые модулируют цитотоксичность человеческих Vδ1+

Полиспецифическое антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, также можно оценить путем измерения эффекта на опосредованную Vδ1+ клеточную цитотоксичность. Неожиданно, во время таких оценок моноспецифических вариантов полиспецифических антител, как описано в данном документе, и некоторых самих полиспецифических антител (например, см., например, примеры 19, 23, 24 и 27) наблюдалась заметно повышенная опосредованная Vδ1+ клеточная цитотоксичность. Например, после применения антитела или его фрагмента в модельной системе, содержащей смешанную культуру, содержащую Vδ1+ клетки и указанные раковые клетки, наблюдается снижение количества раковых клеток или увеличение количества убитых раковых клеток. Необязательно, снижение количества раковых клеток или увеличение количества убитых раковых клеток можно затем сравнить с результатом, когда к указанным модельным системам применяется альтернативное антитело сравнения (например, OKT-3).

Следовательно, в еще одном аспекте изобретения предложен способ оценки антитела или его фрагмента, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий применение антитела или его фрагмента к смешанной популяции клеток, состоящей из Vδ1+ клеток и раковых клеток, и измерение цитотоксичности Vδ1+ клеток по отношению к раковым клеткам. Цитотоксичность может быть измерена по увеличению количества мертвых раковых клеток в течение определенного периода времени, необязательно по сравнению с количеством мертвых раковых клеток, наблюдаемым, если указанное антитело не применялось к смешанной популяции клеток в течение того же периода времени. Например, наблюдаемое увеличение количества мертвых клеток при применении указанного антитела может составлять более чем около 10%, более чем около 20%, более чем около 30%, более чем около 40%, более чем около 50%, более чем около 70%, более чем около 80%, более чем около 90%, более чем около 100%, более чем около 200%, более чем около 500% относительно количества мертвых клеток, наблюдаемых, если указанное антитело не применяется.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ отбора или определения характеристик, или сравнения антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью клеток с γδ TCR, путем добавления указанных антител к указанной популяции смешанных иммунных клеток, содержащих Vδ1+ клеток человека и раковых клеток, и последующего измерения увеличения количества мертвых раковых клеток в зависимости от времени.

Лекарственные препараты, которые модулируют соотношение целевых клеток и Vδ1+ эффекторных клеток (соотношения T:E)

Полиспецифическое антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, также можно оценить путем измерения того, как указанные антитела усиливают опосредованную Vδ1+ цитотоксичность в отношении раковых клеток, путем определения соотношения целевых клеток и эффекторных клеток, при котором 50% целевых клеток (EC50) погибают в модельной системе для оценки указанных антител в качестве потенциальных лекарственных препаратов. Например, смешанные культуры, содержащие целевые раковые клетки с Vδ1+ эффекторными клетками человека. Неожиданно, во время таких оценок (например, см., например, Примеры 19s и 23) полиспецифические антитела, как описано в данном документе, (а также моноспецифические версии описанных в данном документе полиспецифических антител), благоприятно изменяют EC50 для соотношения T:E в модельных системах. Такие модификации могут быть измерены как количество Vδ1+ клеток, необходимое для наблюдения 50% уничтожения раковых клеток в течение определенного времени. Об этом также можно сообщать как об изменении, или как многократное улучшение, или как процентное улучшение цитотоксичности по отношению к указанным раковым клеткам. Необязательно соотношение T:E, придаваемое антителами по настоящему изобретению, можно затем сравнить с соотношениями T:E, когда к указанным модельным системам применяется альтернативное антитело сравнения (например, OKT-3). В некоторых сценариях полиспецифические антитела по изобретению

предоставляют возможности для повышения цитотоксичности в отношении раковых клеток даже при более низких соотношениях E:T по сравнению с моноспецифическими антителами.

Таким образом, в другом аспекте изобретения предложен способ оценки полиспецифического антитела или его фрагмента, который связывается с Vδ1цепью γδ TCR, включающий применение антитела или его фрагмента к популяцию смешанных клеток, содержащую Vδ1+ клетки человека и раковые клетки, и измерение количества Vδ1+ клеток, необходимого для уничтожения 50% раковых клеток. Это может быть измерено относительно количества Vδ1+ клеток, необходимого для уничтожения 50% раковых клеток без применения указанного антитела, необязательно за тот же период времени. Например, снижение количества Vδ1+ клеток, необходимого для уничтожения 50% раковых клеток, при применении указанного антитела может составлять более чем около 10%, более чем около 20%, более чем около 30%, более чем около 40%, более чем около 50%, более чем около 70%, более чем около 80%, более чем около 90%, более чем около 100%, более чем около 200%, более чем около 500% относительно требуемого количества Vδ1+ клеток для уничтожения 50% раковых клеток, если указанное антитело не применяется.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ отбора или определения характеристик, или сравнения антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью, путем добавления указанных антител к указанной популяции клеток, состоящей из Vδ1+ клеток и раковых клеток, и последующего измерения количества Vδ1+ клеток, необходимое для уничтожения 50% раковых клеток.

Лекарственные препараты, которые усиливают цитотоксичность Vδ1+ клеток в EC50

Альтернативный способ измерения наблюдаемой повышенной цитотоксичности Vδ1+ клеток человека или их популяции состоит в измерении количества клеток, необходимого для уничтожения 50% раковых клеток в течение заданного периода времени в условиях A (например, в начальном контроле), и сравнении этого к количеству клеток, необходимому для уничтожения 50% раковых клеток в течение установленного периода времени в условии B (например, при применении антитела по изобретению, как описано в данном документе).

Хотя известно, что существует множество способов измерения таких параметров, для облегчения понимания будет приведен следующий неограничивающий гипотетический пример:

Гипотетически, усиление цитотоксичности эффекторных клеток может быть измерено следующим образом:- в условии A (контрольная обработка) наблюдается, что 1000 Vδ1+ клеток требуется для уничтожения 50% раковых клеток в течение заданного периода времени (например, 5 часов). В условии B (например, применение полиспецифического антитела по изобретению, описанного в данном документе)

наблюдается, что требуется 500 Vδ1+ клеток для уничтожения 50% раковых клеток за тот же период времени. Следовательно, в этом примере применение антител увеличило цитотоксичность Vδ1+ клеточной популяции на 200%:

(1000/500) x 100= 200%

Например (см., например, Пример 19), к удивлению, такое процентное увеличение наблюдалось для антител по изобретению, как описано в данном документе.

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ отбора или определения характеристик, или сравнения антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, путем добавления указанных антител к указанной смешанной популяции иммунных клеток, содержащей Vδ1+ клетки и раковые клетки, и определения относительного или процентного изменения цитотоксичности по сравнению с эквивалентным или контрольным экспериментом, в котором указанное антитело не применялось к указанной смеси клеток.

Лекарственные препараты, которые повышают специфичность Vδ1+ клеток в отношении пораженных клеток, сохраняя при этом здоровые клетки

Другой подход к оценке их полиспецифических антител, как описано в данном документе, заключается в измерении того, как указанные антитела модулируют цитотоксичность, специфичную для пораженных клеток. Неожиданно в ходе таких исследований было обнаружено, что моноспецифические и полиспецифические антитела могут специфически усиливать специфическое уничтожение Vδ1+ клетками пораженных леток, таких как раковые клетки (например, см., например, Примеры 19 и 23), при этом сохраняя здоровые или непораженные клетки. Идеальные лекарственные препараты на основе антител, вводимые пациенту для облегчения симптома злокачественного новообразования, будут придавать повышенную цитотоксичность конкретно по отношению к пораженным клеткам, сохраняя при этом здоровые клетки. И можно сказать, что лекарственные препараты, которые усиливают цитотоксичность эффекторных клеток конкретно по отношению к пораженным клеткам, таким как раковые клетки, демонстрируют повышенный терапевтический индекс (TI) по сравнению с лекарственными препаратами, которые не повышают селективно цитотоксичность эффекторных клеток конкретно по отношению к указанным пораженным клеткам. Терапевтический индекс также называют терапевтическим соотношением и представляет собой количественную меру относительной безопасности лекарственного средства. Это сравнение количества терапевтического агента, который вызывает терапевтический эффект, с количеством, вызывающим токсичность, т.е. вызывая нежелательную гибель родственных или соответствующих здоровых клеточных популяций. Полиспецифическое антитело или его фрагмент, как описано в данном документе, можно оценить путем измерения его способности изменять или усиливать или многократно улучшать способность Vδ1+ клеток селективно убивать пораженные клетки по сравнению со здоровыми клетками в модельных системах. Например, указанные модельные системы могут содержать Vδ1+ эффекторные клетки, раковые клетки и контрольные клетки (такие

как здоровые клетки). Необязательно, кратное улучшение селективного уничтожения пораженных клеток, обеспечиваемое полиспецифическими антителами по изобретению, затем можно сравнить с кратным улучшением, наблюдаемым при применении альтернативного антитела сравнения (например, OKT-3) к указанным модельным системам.

Специфичность к пораженным клеткам и усиление специфичности к пораженным клеткам Vδ1+ клеток можно измерить с использованием культур, содержащих Vδ1+ клетки, пораженные клетки и здоровые клетки. Например, специфичность Vδ1+ к пораженным клеткам можно измерить, путем определения количество раковых клеток, убитых Vδ1+ клетками, и последующего сравнения количества здоровых клеток, убитых Vδ1+ клетками. Такие сравнения можно контролировать, включив эквивалентное количество пораженных клеток и здоровых клеток в модельную систему, также содержащую Vδ1+ клетки, например, «тройные культуры». Также можно рассмотреть альтернативную методологию сравнения, например, когда аналитические или аппаратные ограничения снижают способность различать и отслеживать все три или более типов клеток параллельно в одном анализе (включая Vδ1+ клетки, пораженные клетки и непораженные клетки). В указанных случаях сравнение цитотоксичности Vδ1+ клеток по отношению к пораженным клеткам в одном эксперименте, а затем сравнение цитотоксичности Vδ1+ клеток по отношению к здоровым клеткам в отдельном эквивалентном эксперименте предлагает альтернативный подход к таким исследованиям.

В еще одном аспекте изобретения предложен способ оценки полиспецифического антитела или его фрагмента, который связывается с Vδ1-цепью γδ TCR, включающий введение полиспецифического антитела или его фрагмента в клеточную популяцию, содержащую Vδ1+ клетки и целевые клетки, и измерение цитотоксической специфичности клеток по отношению к целевым клеткам. В одном варианте осуществления специфичность клеточной цитотоксичности в отношении первого типа целевых клеток можно сравнить с цитотоксичностью, наблюдаемой в отношении второго типа целевых клеток, поэтому способ можно повторить с использованием разных типов целевых клеток. В дополнительном аспекте изобретения первый тип целевых клеток представляет собой пораженные клетки, а второй тип целевых клеток представляет собой контрольные клетки, такие как здоровые клетки или клетки с заболеванием, отличным от заболевания для первого типа целевых клеток.

В дополнительном аспекте изобретения предложен способ отбора или определения характеристик, или сравнения полиспецифических антител или их фрагментов, как описано в данном документе, которые связываются с Vδ1-цепью γδ TCR, при этом эффект, оказываемый указанным антителом на цитотоксичность Vδ1+ клеток в отношении (i) измеряют и сравнивают первый тип клеток и (ii) второй тип клеток. В дополнительном аспекте изобретения таким образом выбирают антитело, которое усиливает специфическую цитотоксичность по отношению к первому типу клеток в большей степени, чем по отношению ко второму типу клеток. В дополнительном аспекте

изобретения первый тип клеток представляет собой пораженную клетку, а второй тип клеток представляет собой здоровую клетку.

Как описано в данном документе, полиспецифические антитела или их фрагменты, используемые в анализах, могут присутствовать на поверхности, например, поверхности клетки, такой как клетка, содержащая Fc-рецептор. Например, антитела или их фрагменты могут присутствовать на поверхности клеток THP-1, таких как клетки TIB-202™ (доступны от Американской коллекции типовых культур (ATCC)). В качестве альтернативы, полиспецифические антитела или их фрагменты можно непосредственно использовать в анализах.

В таких функциональных анализах выход можно измерить путем расчета полумаксимальной концентрации, также называемой «EC50» или «эффективная концентрация при 50 процентах». Термин «IC50» относится к ингибирующей концентрации. EC50 и IC50 можно измерить с помощью способов, известных в данной области техники, таких как способы проточной цитометрии. В некоторых случаях EC50 и IC50 являются одним и тем же значением или могут считаться эквивалентными. Например, эффективная концентрация (EC) эффекторных клеток, необходимая для ингибирования (например, уничтожения) 50% определенного типа клеток, также может считаться 50%-ной ингибирующей концентрацией (IC). Во избежание сомнений, значения EC50 в настоящей заявке приведены с помощью антитела в формате IgG1, когда речь идет об антителе. Такие значения можно легко преобразовать на основании молекулярной массы формата антитела в эквивалентные значения следующим образом:

(мкг/мл) / (мол. масса в кДа)=мкМ

EC50 для снижения количества γδ TCR при связывании с антителом (или фрагментом) может составлять менее чем 0,50 мкг/мл, например, менее чем 0,40 мкг/мл, 0,30 мкг/мл, 0,20 мкг/мл, 0,15 мкг/мл, 0,10 мкг/мл, 0,06 мкг/мл или 0,05 мкг/мл. В предпочтительном варианте осуществления EC50 для снижения количества γδ TCR при связывании с антителом (или его фрагментом) составляет менее чем 0,10 мкг/мл. В частности, EC50 для снижения количества γδ TCR при связывании антитела (или его фрагмента) может составлять менее чем 0,06 мкг/мл, например, менее чем 0,05 мкг/мл, 0,04 мкг/мл или 0,03 мкг/мл. В частности, указанные значения EC50 имеют место тогда, когда антитело измеряют в формате IgG1. Например, значение EC50 снижения количества γδ TCR можно измерить с помощью проточной цитометрии (*например*, как описано в анализе из примеров 6 и 23).

Значение EC50 при дегрануляции γδ Т-клеток при связывании с антителом (или фрагментом) может составлять менее чем 0,050 мкг/мл, например, менее чем 0,040 мкг/мл, 0,030 мкг/мл, 0,020 мкг/мл, 0,015 мкг/мл, 0,010 мкг/мл или 0,008 мкг/мл. В частности, значение EC50 при дегрануляции γδ Т-клеток при связывании с антителом (или его фрагментом) может составлять менее чем 0,005 мкг/мл, например, менее чем 0,002 мкг/мл.В предпочтительном варианте осуществления значение EC50 при дегрануляции γδ Т-клеток при связывании с антителом (или его фрагментом) составляет менее чем 0,007

мкг/мл. В частности, указанные значения EC50 имеют место тогда, когда антитело измеряют в формате IgG1. Например, значение EC50 при дегрануляции γδ Т-клеток можно измерить путем обнаружения экспрессии CD107a (*т. е.* маркера дегрануляции клеток) с помощью проточной цитометрии (*например*, как описано в анализе Примера 7). В одном варианте осуществления экспрессию CD107a измеряют с помощью антитела к CD107a, такого как BV421 к человеческому CD107a (клон H4A3) (BD Biosciences).

Значение EC50 при уничтожения γδ Т-клеток при связывании с антителом (или его фрагментом) может составлять менее чем 0,50 мкг/мл, например, менее чем 0,40 мкг/мл, 0,30 мкг/мл, 0,20 мкг/мл, 0,15 мкг/мл, 0,10 мкг/мл или 0,07 мкг/мл. В предпочтительном варианте осуществления значение EC50 при уничтожении γδ Т-клеток при связывании с антителом (или его фрагментом) составляет менее чем 0,10 мкг/мл.В частности, значение EC50 при уничтожения γδ Т-клеток при связывании с антителом (или его фрагментом) может составлять менее чем 0,060 мкг/мл, например, менее чем 0,055 мкг/мл, в частности менее чем 0,020 мкг/мл.В частности, указанные значения EC50 имеют место тогда, когда антитело измеряют в формате IgG1. Например, значение EC50 при уничтожении γδ Т-клеток можно измерить путем определения доли мертвых клеток (т. е. с использованием красителя для определения жизнеспособности клеток) с помощью проточной цитометрии после инкубации антитела, γδ Т-клеток и целевых клеток (например, как описано в анализе из Примера 8). В одном варианте осуществления гибель клеток-мишеней измеряют с помощью красителя для оценки жизнеспособности клеток Viability Dye eFluor™ 520 (ThermoFisher).

В анализах, описанных в этих аспектах, антитело или его фрагмент могут присутствовать на поверхности клетки, такой как клетка THP-1, например, TIB-202™ (ATCC). Клетки THP-1 необязательно помечены красителем, таким как CellTracker™ Orange CMTMR (ThermoFisher).

Лекарственные препараты, которые снижают количество молекул CD3, ассоциированных с Vδ1 TCR.

Современные лекарственные препараты в формате полиспецифических TCE обычно взаимодействуют с Т-клеткой и активируют ее посредством событий связывания CD3. Это может привести к снижению количества комплексов молекул CD3 на поверхности Т-клетки. Однако также хорошо известно, что TCE также могут чрезмерно стимулировать Т-клетки посредством такого взаимодействия и подавления. Комплексы молекул CD3 не специфичны в отношении одного типа Т-клеток и, следовательно, не являются точной мишенью, на которую можно нацеливаться. Стимуляция всех Т-клеток (в основном подтипа αß) через CD3 может, в свою очередь, привести к сверхвыработке цитокинов, что приведет к острым цитокиновым штормам (так называемым гиперцитокинемией). Кроме того, в нецелевых подходах, которые взаимодействуют со всеми Т-клетками и активируют их через CD3, как это ни парадоксально, Т-клетки могут стать чрезмерно активными, что приводит к хроническому истощению Т-клеток и/или гибели Т-клеток. Действительно, эта неспецифическая активация пан-Т-клеток приводит к

активации как эффекторных, так и регуляторных Т-клеток, тогда как представленный в настоящее время подход специфически взаимодействует с эффекторной популяцией. Поэтому такой подход по типу «кувалды» далеко не идеален, когда необходимо повысить количество только селективных Т-клеток.

Напротив, в данном документе представлены полиспецифические антитела, в частности привлекающие Т-клетки активаторы, которые по-разному взаимодействуют с комплексом Т-клетка/CD3. В частности, эти TCE могут взаимодействовать через домен TRDV1 Vδ1 TCR, экспрессируемых только на Vδ1+ клетках. При этом такие лекарственные препараты на основе TCE действуют по-разному. Во-первых, эти TCE способны снижать количество TCR посредством взаимодействия с эпитопом TRDV-1. В свою очередь, это событие взаимодействия может снижать количество ассоциированных с TCR комплексов молекул CD3. Такое снижение количества CD3 может быть синонимом активации Т-клеток. Однако при таком взаимодействия с комплексом Т-клетка/CD3 через домен TRDV1 снижается количество только ассоциированных с Vδ1 TCR молекул CDR3. Этот подход специфического нацеливания и активации Vδ1 клеток позволяет избежать многих из вышеперечисленных проблем (например, цитокиновый шторм, истощение/деплеция Т-клеток и ADCC). Этот механизм наглядно показан на Фиг. 30.

Стимуляция Т-клеток с помощью «кувалды» для CD3 также может способствовать истощению Т-клеток с помощью механизмов, управляемых Fc-гамма-рецептором, таких как ADCC. Поэтому большинство нацеленных на CD3 биспецифических антител, которые в настоящее время используются в клинической практике, имеют домены Fc со сниженной активностью связывания с FcγR или преднамеренно представляют собой биспецифические фрагменты без области Fc. Терапия, нацеленная на CD3, также может иметь сниженную аффинность связывания плеча, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора.

Это снижение сходства может привести к снижению эффективности и меньшей опциональности с точки зрения дизайна и функциональности TCE. Например, известно, что аффинность связывающих доменов в таких TCE определяет профиль распределения in vivo. В частности, как правило, наблюдается, что распределение TCE смещено в сторону мишени с наивысшей аффинностью. Следовательно, за счет снижения аффинности связывающего домена TCE к Т-клеточному комплексу обычно происходит смещение распределения от Т-клеток - тех самых клеток, которые необходимы для обеспечения эффективности таких TCE. Частично по этим причинам терапевтические окна для TCE были названы «запредельно узкими».

Представленный в данном документе подход специально нацеливается и активирует vδ1 клетки, необязательно избегая необходимости устранения функции Fc или снижения аффинности.

Кроме того, в представленном в данном документе подходе антитела взаимодействуют с TCR vδ1 клеток, но полная активация происходит только в присутствии опухолевых клеток. Полное взаимодействие представленных в настоящее

время антител с TCR приводит к частичному снижению количества, и vδ1 клетки, связанные с представленными в настоящее время антителами, становятся полностью активированными и становятся цитотоксическими только в микроокружении опухоли. Это представляет собой еще одно жизненно важное преимущество с точки зрения безопасности для настоящего подхода, поскольку нецелевая цитотоксичность снижается, а полная эффективность настоящих антител для активации vδ1 клеток проявляется только в присутствии опухолевых клеток.

Считается, что один из механизмов, лежащих в основе способности γδ Т-клеток обнаруживать сигналы стресса на опухолевых клетках, связан с NCR (натуральными рецепторами цитотоксичности), которые они экспрессируют. NCR способны взаимодействовать с лигандами NCR на опухолевых клетках. Таким образом, используется двойной механизм активации, при котором γδ Т-клетки активируются посредством стимуляции TCR, а NCR распознают опухолевые клетки, чтобы обеспечить полную активацию и цитотоксичность.

Это отличается от стимуляции αß Т-клеток через CD3, где вся стимуляция осуществляется через TCR. Таким образом, такие клетки почти не различают здоровые или трансформированные клетки, потому что у них нет этого независимого от антигенной презентации распознавания опухолевых клеток через NCR. Следовательно, если антитела к CD3 представляют собой Fc, они будут привлекать другие иммунные клетки, что может вызвать каскад непредсказуемых и желательных событий, таких как цитокиновый шторм, истощение и даже чрезмерная активация иммунных клеток, что приводит, например, к тому, что NK-клетки убивают Т-клетки и т. д. В настоящем подходе стимуляция γδ Т-клеток представленными в настоящее время антителами не вызывает таких проблем, поскольку как γδ Т-клетки (и другие иммунные клетки, такие как NK-клетки) способны различать здоровые клетки и опухолевые клетки. Например, с помощью своего механизма распознавания NCR и, следовательно, не убивают друг друга.

Например, в первоначальных исследованиях на яванских макаках с полиспецифическим антителом к vδ1 с функциональным Fc, представленным в данном документе, со специфичностью к антигену vδ1 как человека, так и яванского макака (SEQ ID NO: 1 и SEQ D NO: 172), было обнаружено, что оно безопасно и хорошо переносится, в исследованиях с многократным введением препарата и эскалацией дозыin-vivo по всем измеренным параметрам. Не наблюдалось ни одного из побочных эффектов, обычно связанных с активацией Т-клеток, таких как высвобождение цитокинов или потеря веса.

Эти результаты также подчеркивают еще одно преимущество описанного в данном документе подхода. В частности, в отличие от TCE, типичных для привлекающих клетки активаторов к CD3 и т.п., биспецифические TCE по изобретению могут быть разработаны в виде полноразмерного антитела, например, включающего тяжелые цепи в формате VH-CH1-CH2-CH3 с когнатными легкими цепями в формате VL-CL. В отличие от меньших биспецифических форматов (например, менее 70 кДа), такой полноразмерный биспецифический формат может демонстрировать более длительное время полужизни in

vivo и, таким образом, требует режимов с менее частым дозированием. Более длительные периоды полужизни, наблюдаемые у таких форматов, обусловлены рядом причин, включая увеличенный размер (>70 кДа), что означает, что такие форматы не фильтруются почками (пороговое значение размера пор клубочков 60-70 кДа). В одном варианте осуществления полиспецифические антитела могут быть больше около 70 кДа и могут содержать последовательность IGHC человека (например, последовательность IGHA, IGHD, IGHD, IGHM, IGHG), как указано IMGT. Такие форматы IgG1 также могут быть рециклированы с помощью механизма FcRn. Явным недостатком таких полноразмерных форматов антител для биспецифических TCE, в частности, является то, что такой формат демонстрирует неблагоприятные профили безопасности из-за снижения скорости клиренса, увеличения и более длительного воздействия.

Таким образом, настоящий подход допускает возможность функционирования Fc без опасения нецелевых эффектов, например, NK-клетки, убивающие γδ Т-клетки, или наоборот. Таким образом, настоящий подход превосходит подходы, направленные на CD3, которые ограничены необходимостью применения обходных путей, таких как снижение аффинности к CD3, устранение функции Fc и т. д., чтобы ограничить побочное повреждение вне опухолевого окружения. Представленные в данном документе полиспецифические антитела, в частности привлекающие Т-клетки активаторы, способны связываться с vδ1 клетками без какого-либо потенциального повреждения, а полная активация и усиление цитотоксичности происходит только тогда, когда vδ1 клетки находятся в непосредственном контакте с опухолевыми клетками.

Таким образом, в одном варианте осуществления предложен способ снижения количества TRDV1-содержащего Vδ1 TCR и связанного с ним комплекса молекул CD3 на поверхности клетки с полиспецифическим антителом TCE, а также применение таких полиспецифических антител для этой цели.

Полинуклеотиды и векторы экспрессии

В одном аспекте изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий полиспецифическое антитело или его фрагмент по изобретению. В одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 99-110. В одном варианте осуществления вектор экспрессии содержит область VH любой из SEQ ID NO: 99-110. В еще одном варианте осуществления вектор экспрессии содержит область VL любой из SEQ ID NO: 99-110. В дополнительном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из SEQ ID NO: 99-110. В дополнительном аспекте предложена кДНК, содержащая указанный полинуклеотид. Полинуклеотиды могут дополнительно содержать последовательность, кодирующую второй связывающий домен, при этом второй связывающий домен может придавать специфичность второму антигену.

Полинуклеотиды и векторы экспрессии по изобретению также могут быть описаны в отношении кодируемой аминокислотной последовательности. Таким образом, в одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 62-85. Таким образом, в одном варианте осуществления полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 62-73. В еще одном варианте осуществления вектор экспрессии содержит последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 74-85. Полинуклеотиды и векторы экспрессии могут дополнительно содержать последовательности, кодирующие дополнительный связывающий домен, при этом дополнительный связывающий домен может придавать специфичность второму антигену.

Для экспрессии антител или их фрагментов полинуклеотиды, кодирующие частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, как описано в данном документе, вставляют в векторы экспрессии таким образом, чтобы гены были оперативно связаны с последовательностями контроля транскрипции и трансляции. Таким образом, в одном аспекте изобретения предложен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность, как определено в данном документе.

Следует понимать, что нуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, могут содержат дополнительные последовательности, кодирующие аминокислотные остатки, чтобы облегчить трансляцию, очистку и обнаружение, однако могут использоваться альтернативные последовательности в зависимости от используемой системы экспрессии. Например, начальные (5'-конец) девять нуклеотидов SEQ ID NO: 99-110 и последние (3'-конец) 36 нуклеотидов SEQ ID NO: 99-100, 102-103, 105-110 или последние (3'-конец) 39 нуклеотидов SEQ ID NO: 101 и 104 являются необязательными последовательностями. Эти необязательные последовательности могут быть удалены, модифицированы или заменены, если будут приняты альтернативные стратегии дизайна, трансляции, очистки или обнаружения.

Мутации могут быть внесены в ДНК или кДНК, которые кодируют полипептиды, которые являются молчащими в отношении аминокислотной последовательности полипептида, однако которые обеспечивают предпочтительные кодоны для трансляции в конкретном хозяине. Известны предпочтительные кодоны для трансляции нуклеиновой кислоты в, например, E. coli и S. cerevisiae, а также млекопитающих, в частности человека.

Мутации полипептидов могут достигаться, например, путем замен, добавлений или делеций в нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид. Замены, добавления или делеции в нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид, могут быть введены многими способами, включая, например, ПЦР сниженной точности, перетасовку, олигонуклеотид-направленный мутагенез, сборочную ПЦР, ПЦР-мутагенез, мутагенез in vivo, кассетный мутагенез, рекурсивный множественный мутагенез, экспоненциальный множественный мутагенез, сайт-специфический мутагенез, повторную сборку генов, синтез искусственных генов, насыщающий мутагенез участка гена (Gene Site Saturation

Mutagenesis - GSSM), искусственную перестройку с лигированием (synthetic ligation reassembly - SLR) или комбинацию этих способов. Модификации, добавления или делеции в нуклеиновой кислоте также могут быть введены способом, включающим рекомбинацию, рекомбинацию возвратной последовательности, мутагенез модифицированной фосфоротиоатом ДНК, мутагенез на урацил-содержащей матрице, мутагенез с применением дуплексной ДНК с гэпом, точечный мутагенез с исправлением ошибок спаривания, мутагенез штамма-хозяина с дефицитом репарации, химический мутагенез, радиогенный мутагенез, делеционный мутагенез, мутагенез на основе рестрикционной селекции, мутагенез на основе рестрикционной очистки, множественный мутагенез, создание мультимеров химерных нуклеиновых кислот и их комбинации.

В частности, можно использовать синтез искусственных генов. Ген, кодирующий полипептид по изобретению, может быть получен синтетическим путем, например, при помощи твердофазного синтеза ДНК. Целые гены могут быть синтезированы de novo без необходимости в предшественнике ДНК-матрицы. Для получения желаемого олигонуклеотида структурные звенья последовательно связывают с растущей олигонуклеотидной цепью в порядке, требуемом последовательностью продукта. По завершении сборки цепи продукт высвобождают из твердой фазы в раствор, снимают защиту и собирают. Продукты могут быть выделены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для получения желаемых олигонуклеотидов высокой чистоты.

Векторы экспрессии включают в себя, например, плазмиды, ретровирусы, космиды, дрожжевые искусственные хромосомы (YAC) и эписомы, полученные из вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ). Полинуклеотид лигируется в вектор таким образом, что транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности в векторе выполняют свою предусмотренную функцию регуляции транскрипции и трансляции полинуклеотида. Последовательности экспрессии и/или регуляции могут включать промоторы, энхансеры, терминаторы транскрипции, стартовый кодон (т.е. ATG) 5' к кодирующей последовательности, сигналы сплайсинга для интронов и стоп-кодоны. Вектор экспрессии и последовательности регуляции экспрессии выбираются так, чтобы быть совместимыми с используемой клеткой-хозяином экспрессии. SEQ ID NO: 99-110 содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие одноцепочечные вариабельные фрагменты, которые могут входить в состав полиспецифических антител по изобретению, содержащие область VH и область VL, соединенные синтетическим линкером (кодирует SEQ ID NO: 98). Следует понимать, что полинуклеотиды или векторы экспрессии по изобретению могут содержать область VH, область VL или и ту, и другую (необязательно включая линкер). Таким образом, полинуклеотиды, кодирующие области VH и VL, могут быть вставлены в отдельные векторы, в качестве альтернативны, последовательности, кодирующие обе области, вставляют в один и тот же вектор экспрессии. Полинуклеотид(-ы) вставляют в вектор экспрессии стандартными способами (*например*, лигированием

комплементарных сайтов рестрикции на полинуклеотиде и векторе или лигированием тупого конца в случае отсутствия сайтов рестрикции).

Удобным является вектор, который кодирует функционально полную последовательность CH или CL иммуноглобулина человека, с соответствующими сайтами рестрикции, сконструированными таким образом, чтобы можно было легко вставить и экспрессировать любую последовательность VH или VL, как описано в настоящем документе. Вектор экспрессии может также кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию антитела (или его фрагмента) из клетки-хозяина. Полинуклеотид может быть клонирован в вектор так, чтобы сигнальный пептид в рамке был связан с аминоконцом антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (*m. e.* сигнальный пептид из белка, не являющегося иммуноглобулином).

В одном аспекте изобретения предложена клетка (например, клетка-хозяин, такая как рекомбинантная клетка-хозяин), содержащая полинуклеотид или вектор экспрессии, как определено в данном документе. Следует понимать, что клетка может содержать первый вектор, кодирующий легкую цепь антитела или его фрагмента, и второй вектор, кодирующий тяжелую цепь антитела или его фрагмента. В альтернативном варианте как тяжелая, так и легкая цепи кодируются в одном и том же векторе экспрессии, введенном в клетку.

В одном варианте осуществления полинуклеотид или вектор экспрессии кодирует мембранный якорь или трансмембранный домен, слитый с антителом или его фрагментом, причем антитело или его фрагмент присутствуют на внеклеточной поверхности клетки.

Для введения полинуклеотидов в клетку-хозяина трансформацию можно проводить любым известным методом. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области техники и включают в себя опосредованную декстраном трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, опосредованную полибреном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсулирование полинуклеотида(-ов) в липосомы, биолистическую инъекцию и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть введены в клетки млекопитающих посредством вирусных векторов.

Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области техники и включают в себя многие иммортализованные клеточные линии, доступные из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Эти клетки включают, среди прочего, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки NSO, SP2, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (*например*, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3 и ряд других линий клеток. Клетки-хозяева млекопитающих включают в себя клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, крупного рогатого скота, лошади и хомяка. Особенно предпочтительные клеточные линии выбирают путем определения того, какие клеточные линии обладают

высокими уровнями экспрессии. Другими клеточными линиями, которые можно использовать, являются клеточные линии насекомых, такие как клетки Sf9, клетки земноводного, бактериальные клетки, клетки растения и клетки гриба. Антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как фрагменты scFv и Fv, могут быть выделены и экспрессированы в E. Coli с помощью способов, известных в данной области техники.

Антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения возможности экспрессии антитела в клетках-хозяевах или более предпочтительно секреции антитела в культуральную среду, в которой выращивают клетки-хозяева. Антитела могут быть выделены из культуральной среды с использованием стандартных методов очистки белка.

Антитела (или фрагменты) по изобретению можно получать и подвергать манипуляции с помощью методов, описанных например, в Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2012) 4th Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридомной технологии путем слияния В-клетки, продуцирующей специфические антитела, с клеткой миеломы (В-клеточный рак), выбранной по способности расти в культуре тканей и отсутствию синтеза цепей антител.

Моноклональное антитело, направленное против определенного антигена, можно, например, получить путем:

a) иммортализации лимфоцитов, полученных из периферической крови животного, ранее иммунизированного определенным антигеном, с помощью иммортализованной клетки и предпочтительно клеток миеломы с целью образования гибридомы,

b) культивирования полученных иммортализованных клеток (гибридомы) и выделения клеток, продуцирующих антитела, имеющие желаемую специфичность.

В качестве альтернативы, использование клетки гибридомы не требуется. Антитела, способные связываться с антигенами-мишенями, как описано в настоящем документе, могут быть выделены из подходящей библиотеки антител путем стандартной практики, например, используя технологии фагового дисплея, дрожжевого дисплея, рибосомного дисплея или дисплея на клетках млекопитающих, известные в данной области техники. Соответственно, моноклональные антитела могут быть получены, например, в результате процесса, включающего следующие этапы:

a) клонирование в векторы, особенно в фаги и, в частности, в нитчатые бактериофаги, последовательности ДНК или кДНК, полученные из лимфоцитов, особенно лимфоцитов периферической крови животного (предпочтительно предварительно иммунизированных определенными антигенами),

b) трансформация прокариотических клеток указанными выше векторами в условиях, позволяющих продуцировать антитела,

c) селекция антител путем их отбора по аффинности к антигену,

d) выделение антител, имеющих желаемую специфичность.

Необязательно, выделенный полинуклеотид, кодирующий полиспецифические антитела или их фрагменты, как описано в данном документе, также может быть легко получен в количествах, достаточных для применения в качестве лекарственных препаратов для облегчения признаков или симптомов заболевания. При применении в качестве лекарственного препарата таким образом, как правило, представляющие интерес полинуклеотиды сначала функционально связывают с вектором экспрессии или кассетой экспрессии, разработанными с возможностью экспрессировать указанные антитела или его фрагменты у субъекта или пациента. Такие кассеты экспрессии и способы доставки полинуклеотидов или того, что иногда называют лекарственными препаратами «на основе нуклеиновой кислоты», хорошо известны в данной области техники. Недавний обзор см. в Hollevoet and Declerck (2017) J. Transl. Med. 15(1): 131.

Также предложен способ получения полиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или варианта, включающий культивирование рекомбинантной клетки-хозяина по изобретению в среде для культивирования клеток в условиях, обеспечивающих экспрессию кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты плазмиды или вектора внутри клетки. Если оба связывающих домена продуцируются в одной и той же рекомбинантной клетке, способ может дополнительно включать получение полиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его варианта из супернатанта клеточной культуры. Полученное полиспецифическое антитело или его фрагмент можно затем подвергнуть дальнейшей обработке и/или включить в фармацевтическую композицию. В качестве альтернативы, если связывающие домены полиспецифического антитела генерируются в отдельных рекомбинантных клетках-хозяевах, то полиспецифическое антитело может быть получено сначала путем сбора отдельных клеточных супернатантов из соответствующих рекомбинантных клеток-хозяев перед объединением указанных связывающих доменов в полиспецифическое антитело, которое затем может быть дополнительно обработано и/или включено в фармацевтическую композицию. Кроме того, предложен способ получения рекомбинантной клетки-хозяина, которая экспрессирует полиспецифическое антитело или его фрагмент или вариант, включающий трансфекцию указанной клетки плазмидой или вектором по изобретению. Затем указанные клетки можно культивировать для получения полиспецифического антитела или его фрагмента или варианта.

Фармацевтические композиции

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложена композиция, содержащая полиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в данном документе. В таких вариантах осуществления композиция может содержать полиспецифическое антитело необязательно в комбинации с другими эксципиентами. Также включены композиции, содержащие один или более дополнительных активных агентов (например, активных агентов, пригодных для лечения заболеваний, упомянутых в настоящем документе).

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая полиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в данном документе, вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем. Полиспецифические антитела по изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, пригодные для введения субъекту. Как правило, фармацевтическая композиция содержит антитело по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают в себя одно или более из воды, физиологического раствора, солей, фосфатно-солевого буфера, декстрозы, глицерина, этанола и т. п., а также их комбинации. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые вещества, такие как смачивающие или незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность антител или их фрагментов.

Композиции по данному изобретению быть в различных формах. Эти формы включают в себя, например, жидкие, полутвердые и твердые дозированные формы, такие как жидкие растворы (*например*, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции находятся в форме растворов для инъекций или инфузий.

Предпочтительным способом введения является парентеральный (*например* , внутривенный, подкожный, внутрибрюшинный, внутримышечный, интратекальный). В предпочтительном варианте осуществления антитело вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело вводят путем внутримышечной или подкожной инъекции.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства.

В пределах объема изобретения находится применение фармацевтической композиции по изобретению в терапевтических способах для лечения заболеваний, как описано в настоящем документе, в качестве дополнения или в сочетании с другими установленными терапиями, обычно применяемыми для лечения таких заболеваний.

В дополнительном аспекте изобретения антитело, композицию или фармацевтическую композицию вводят последовательно, одновременно или отдельно с по меньшей мере одним активным агентом.

Способы лечения

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложено выделенное полиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата. Ссылки в данном документе на полиспецифическое антитело или его фрагмент «для применения» в качестве лекарственного препарата или в терапии ограничиваются введением антитела или его фрагмента субъекту. Такое применение не включает введение полиспецифического антитела или его фрагмента в культуру клеток (т.е. in vitro или ex vivo), где указанная культура клеток или производный клеточный терапевтический продукт используется в качестве терапевтического средства.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент предназначены для лечения злокачественного новообразования, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания. В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента. В различных вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой злокачественное новообразование, инфекционное заболевание или воспалительное заболевание. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент предназначено для применения для лечения злокачественного новообразования, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания, приводит к гибели пораженных клеток, не затрагивая при этом здоровые клетки. В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент предназначены для лечения злокачественного новообразования.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент предназначены для лечения злокачественного новообразования, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания. В другом варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент предназначены для лечения злокачественного новообразования.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложена фармацевтическая композиция, как определено в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного препарата. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция предназначена для лечения злокачественного новообразования, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания. В дополнительном варианте осуществления фармацевтическая композиция применяется при лечении рака.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложен способ модуляции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение

терапевтически эффективного количества выделенного полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе. В различных вариантах осуществления модулирование иммунного ответа у субъекта включает связывание или нацеливание γδ Т-клеток, активацию γδ Т-клеток, инициирование или усиление пролиферации γδ Т-клеток, инициирование или усиление экспансии γδ Т-клеток, инициирование или усиление дегрануляции γδ Т-клеток, инициирование или увеличение опосредованной γδ Т-клетками активности уничтожения, инициирование или увеличение опосредованной γδ Т-клетками активности уничтожения, не затрагивая при этом здоровые клетки, инициирование или увеличение цитотоксичности γδ Т, инициирование или увеличение цитотоксичности γδ Т, не затрагивая при этом здоровые клетки, инициирование или увеличение мобилизации γδ Т-клеток, повышение выживаемости γδ Т-клеток или повышение устойчивости к истощению γδ Т-клеток. Модуляция иммунного ответа у субъекта может дополнительно включать связывание или нацеливание на второй антиген. Например, в некоторых вариантах осуществления связывание второго антигена, в частности, когда он представляет собой иммуномодулирующий антиген, может стимулировать иммуномодуляцию посредством второго антигена в дополнение к иммуномодуляции посредством связывания полиспецифического антитела к TRDV1. Следовательно, модуляция иммунного ответа может включать модуляцию посредством двух различных сигнальных путей: первого сигнального пути, модулируемого посредством взаимодействия с антигеном TRDV1, и второго сигнального пути, модулируемого посредством взаимодействия со вторым иммуномодулирующим антигеном.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложен способ лечения злокачественного новообразования, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе. В качестве альтернативы, вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции.

В соответствии с дополнительными аспектами изобретения предложено применение полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе, для производства лекарственного препарата, например, при лечении злокачественного новообразования, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело или его фрагмент вводят субъекту, у которого имеется злокачественное новообразование, инфекционное заболевание или воспалительное заболевание.

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложена фармацевтическая композиция, как определено в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного препарата. В одном варианте осуществления фармацевтическую

композицию вводят субъекту, у которого имеется злокачественное новообразование, инфекционное заболевание или воспалительное заболевание.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложен способ введения терапевтически эффективного количества выделенного полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе, субъекту, у которого имеется злокачественное новообразование, инфекционное заболевание или воспалительное заболевание. В качестве альтернативы, вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции.

В соответствии с дополнительными аспектами изобретения обеспечивается применение полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе, для производства лекарственного препарата, например, для введения субъекту, у которого имеется злокачественное новообразование, инфекционное заболевание или воспалительное заболевание.

В различных вариантах осуществления злокачественное новообразование, которое можно лечить описанными способами и композициями, включает, но не ограничивается ими, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, адренокортикальную карциному, рак аппендикса, базально-клеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистиоцитому, глиому ствола головного мозга, опухоль головного мозга, опухоль головного мозга, глиому ствола головного мозга, атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль центральной нервной системы, эмбриомы центральной нервной системы, астроцитому мозжечка, астроцитому головного мозга/злокачественную глиому, краниофарингиому, эпендимобластому, эпендимому, медуллобластому, медуллоэпителиому, паренхиматозные опухоли пинеальной области промежуточной дифференцировки, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли и пинеобластому, глиома зрительного пути и гипоталамуса, опухоли головного и спинного мозга, рак молочной железы, опухоли бронхов, лимфому Беркитта, карциноидную опухоль, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль центральной нервной системы, эмбриональные опухоли центральной нервной системы, лимфому центральной нервной системы, астроцитому мозжечка, астроцитому головного мозга/злокачественную глиому, рак шейки матки, хордому, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронические миелопролиферативные заболевания, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиому, кожную Т-клеточную лимфому, рак пищевода, опухоли семейства Юинга, внегонадную герминогенную опухоль, рак внепеченочных желчных протоков, интраокулярную меланому, ретинобластому, рак желчного пузыря, рак желудка (желудочный), карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, гастроинтестинальную стромальную опухоль (ГИСО), герминому, гестационную трофобластическую опухоль, глиому, глиому ствола головного мозга, глиому церебральную астроцитому, глиому зрительного пути и гипоталамуса, волосатоклеточный

лейкоз, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный (печени) рак, лангергансоклеточный гистиоцитоз, лимфому Ходжкина, гипофарингеальный рак, глиому гипоталамуса и зрительного пути, интраокулярную меланому, опухоли островковых клеток, рак почки (почечно-клеточный), лангергансоклеточный гистиоцитоз, рак гортани, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфолейкоз, хронический миелогенный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, рак губы и полости рта, рак печени, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, лимфому, связанную со СПИДом, лимфому Беркитта, кожную Т-клеточную лимфому, неходжкинскую лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, макроглобулинемию Вальденстрема, злокачественную фиброзную гистиоктому кости и остеосаркому, медуллобластому, меланому, карциному из клеток Меркеля, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытым первичным поражением, рак ротовой полости, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому/плазмоклеточное новообразование, микозы, фунгоидный микоз, миелодиспластические синдромы миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания, миелогенный лейкоз, миелоидный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, миелопролиферативные заболевания, рак полости носа и околоносовых пазух, рак носоглотки, нейробластому, немелкоклеточный рак легкого, рак полости рта, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, рак яичников, эпителиальный рак яичников, герминогенные опухоли яичников, низкозлокачественные опухоли яичников, рак поджелудочной железы, рак поджелудочной железы, папилломатоз, рак паращитовидной железы, рак полового члена, рак глотки, феохромоцитому, паренхиматозные опухоли пинеальной области промежуточной дифференцировки, пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль гипофиза, плазмоклеточное новообразование/множественную миелому, плевропульмональную бластому, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечно-клеточный рак, рак почечной лоханки и мочеточника, рак дыхательных путей с вовлечением гена nut на хромосоме 15, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, саркому, опухоли семейства Юинга, саркому Капоши, саркому мягких тканей, саркому матки, синдром Сезари, рак кожи (немеланомный), рак кожи (меланому), карциному кожи из клеток Меркеля, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, плоскоклеточный рак шеи, рак желудка (желудочный), супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, Т-клеточную лимфому, рак яичка, рак горла, тимому и карциному тимуса, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника, гестационную трофобластическую опухоль, рак уретры, рак матки, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса. В различных вариантах

осуществления злокачественное новообразование, которое можно лечить описанными способами и композициями, лечат, сохраняя при этом здоровые клетки.

В различных вариантах осуществления воспалительные заболевания, которые можно лечить описанными способами и композициями, включают, но не ограничиваются ими, ахалазию, острый диссеминированный энцефаломиелит (ОРЭМ), острую моторную аксональную невропатию, острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), болезнь Аддисона, адипозалгию, болезнь Стилла взрослых, болезнь Стилла, развившаяся у взрослых, агаммаглобулинемию, очаговую алопецию, амилоидоз, боковой амиотрофический склероз, анкилозирующий спондилит, анти-ГБМ/анти-БМК нефрит, анти-NMDA-рецепторный энцефалит (анти-N-метил-D-аспартатный), антифосфолипидный синдром, антифосфолипидный синдром (АПС, АФЛС), антисинтетазный синдром, нефрит, обусловленный антителами к ТБМ, апластическую анемию, атопическую аллергию, атопический дерматит, аутоиммунный ангионевротический отек, аутоиммунные сопутствующие заболевания, аутоиммунную вегетососудистую дистонию, аутоиммунный энцефаломиелит, аутоиммунную энтеропатию, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунный миокардит, аутоиммунную нейтропению, аутоиммунный оофорит, аутоиммунный орхит, аутоиммунный панкреатит (АИП), аутоиммунную периферическую невропатию, аутоиммунный полиэндокринный синдром (АПС) 1 типа, аутоиммунный полиэндокринный синдром (АПС) типа 2, аутоиммунный полиэндокринный синдром (АПС) 3 типа, аутоиммунную ретинопатию, аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру, аутоиммунный тиреоидит, аутоиммунную крапивницу, аутоиммунный увеит, аутоиммунный васкулит, аксональную и нейрональную невропатию (AMAN), концентрический склероз Бало, болезнь Бало, болезнь Бехчета, доброкачественный пемфигоид слизистых оболочек, энцефалит Бикерстаффа, синдром Блау, буллезный пемфигоид, болезнь Кастлемана (БК), глютеновую болезнь, болезнь Шагаса, синдром хронической усталости, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (ХВДП), хроническую обструктивная болезнь легких, хронический рецидивирующий многоочаговый остеомиелит (ХРМО), синдром Черджа-Стросса (CSS) или эозинофильный гранулематоз (EGPA), рубцовый пемфигоид, синдром Когана, болезнь холодовых агглютининов, дефицит компонента 2 системы комплемента, комплексный регионарный болевой синдром, врожденную блокаду сердца, коллагеноз, системный и полиорганный, контактный дерматит, миокардит Коксаки, CREST-синдром, болезнь Крона, синдром Кушинга, кожный лейкоцитокластический васкулит, болезнь Дего, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, болезнь Девика (оптикомиелит), сахарный диабет 1 типа, пищеварительную систему, дискоидную волчанку, синдром Дресслера, лекарственную волчанку, экзему, эндометриоз, артрит, связанный с энтезитом, эозинофильный эзофагит (ЭоЭ), эозинофильный фасциит, эозинофильный гастроэнтерит, эозинофильный

гранулематоз с полиангиитом (EGPA), эозинофильную пневмонию, приобретенный буллезный эпидермолиз, узловатая эритема, эритробластоз плода, ахалазию пищевода, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, синдром Эванса, экзокринный синдром, синдром Фелти, прогрессирующую оссифицирующую фибродисплазию, фибромиалгию, фиброзирующий альвеолит, гастрит, желудочно-кишечный пемфигоид, гигантоклеточный артериит (височный артериит), гигантоклеточный миокардит, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, гранулематоз с полиангиитом, офтальмопатию Грейвса, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, энцефалопатию Хашимото, гемолитическую анемию, пурпуру Шенлейна-Геноха (HSP), герпес беременных или пемфигоид беременных (PG), гнойный гидраденит (HS) (инверсное акне), гипогаммаглобулинемию, идиопатический гигантоклеточный миокардит, идиопатические воспалительные демиелинизирующие заболевания, идиопатический легочный фиброз, IgA-нефропатию, IgA-васкулит (IgAV), IgG4-ассоциированное заболевание, склерозирующее заболевание, связанное с IgG4, иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), миозит с тельцами включения (IBM), воспалительное заболевание кишечника, промежуточный увеит, интерстициальный цистит (IC), интерстициальное заболевание легких, синдром IPEX, ювенильный артрит, ювенильный диабет (диабет 1 типа) ювенильный миозит (JM), болезнь Кавасаки, синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, красный плоский лишай, склерозирующий лишай, деревянистый конъюнктивит, IgA зависимый линейный дерматоз (LAD), волчанку, волчаночный нефрит, волчаночный васкулит, хроническую болезнь Лайма, синдром Маджида, болезнь Меньера, микроскопический полиангиит (MPA), смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), язву Мурена, очаговую склеродермию, болезнь Мухи-Габерманна, мультифокальную моторную невропатию (MMN) или MMNCB, рассеянный склероз, миастению гравис, миокардит, миозит, нарколепсию, неонатальную волчанку, нервную систему, оптиконейромиелит, нейромиотонию, нейтропению, глазной рубцовый пемфигоид, опсо-миоклональный синдром, неврит зрительного нерва, атрофическую форму аутоиммунного тиреоидита, синдром Ошторана, палиндромный ревматизм (ПР), паранеопластическую мозжечковую дегенерацию (PCD), пароксизмальную ночную гемоглобинурию (ПНГ), синдром Парри-Ромберга, синдром Персонейджа-Тернера, воспаление pars plana (периферический увеит), педиатрическое аутоиммунное нервно-психическое расстройство, связанное со стрептококковой инфекцией (PANDAS), воспалительное заболевание органов малого таза (PID), пузырчатку, обыкновенную пузырчатку, периферическую невропатию, перивенозный энцефаломиелит, пернициозную анемию (PA), острый лихеноидный и вариолиформный парапсориаз, синдром POEMS, узелковый полиартериит, полигландулярные синдромы типа I, II, III, ревматическую полимиалгию, полимиозит, постинфарктный синдром, постперикардиотомный синдром, первичный билиарный холангит (ПБХ), первичный билиарный цирроз, первичный иммунодефицит, первичный склерозирующий холангит, прогестероновый дерматит, прогрессирующую воспалительную невропатию, псориаз,

псориатический артрит, парциальную красноклеточную аплазию костного мозга (PRCA), гангренозную пиодермию, энцефалит Расмуссена, феномен Рейно, реактивный артрит, симпатическую рефлекторную дистрофию, рецидивирующий полихондрит, синдром беспокойных ног (RLS), ретроперитонеальный фиброз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, ревматоидный васкулит, саркоидоз, шизофрению, синдром Шмидта, синдром Шницлера, склерит, склеродермию, сывороточную болезнь, синдром Шегрена, аутоиммунитет к сперматозоидам и яичкам, спондилоартропатию, синдром скованного человека (SPS), подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром Сусака, синдром Свита, хорею Сиденгама, симпатическую офтальмию (СО), системную красную волчанку (СКВ), артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, тромбоцитопению, тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП), щитовидную железу, синдром Толоса-Ханта (THS), поперечный миелит, диабет 1 типа, язвенный колит (ЯК), недифференцированное заболевание соединительной ткани (НССТ), недифференцированную спондилоартропатию, уртикарный васкулит, крапивницу, увеит, васкулит, витилиго и болезнь Фогта-Коянаги-Харада. В различных вариантах осуществления воспалительное заболевание, которое можно лечить описанными способами и композициями, лечат, сохраняя при этом здоровые клетки.

В различных вариантах осуществления инфекционное заболевание, которое можно лечить описанными способами и композициями, включает, но не ограничивается ими, вызванную ацинетобактериями инфекцию, актиномикоз, острый вялый миелит (ОВМ), африканскую сонную болезнь (африканский трипаносомоз), СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита), вызванную амебами инфекцию, амебиаз, инфекцию, вызванную Anaplasma phagocytophilum, анаплазмоз, ангиостронгилез, анизакиоз, сибирскую язву, арбовирусные заболевания, нейроинвазивные и ненейроинвазивные, инфекцию, вызванную Arcanobacterium haemolyticum, аргентинскую геморрагическую лихорадку, аскаридоз, аспергиллез, астровирусную инфекцию, птичий грипп, бабезиоз, инфекцию, вызванную Bacillus cereus, бактериальную инфекцию, бактериальный менингит, бактериальную пневмонию, бактериальный вагиноз, инфекцию, вызванную Bacteroides, балантидиаз, бартонеллез, инфекцию, вызванную Baylisascaris, вирусную инфекцию ВК, черную пьедру, бластоцистоз, боливийскую геморрагическую лихорадку, ботулизм, ботулизм (пищевой), ботулизм (детский), ботулизм (другой), ботулизм (раневой), бразильскую геморрагическую лихорадку, бруцеллез, бубонную чуму, инфекцию, вызванную Burkholderia, язву Бурули, калицивирусную инфекцию (норовирус и саповирус), вирусные заболевания калифорнийской серогруппы, кампилобактер, кампилобактериоз, Candida auris, клинический, кандидоз (монилиоз; молочницу), капилляриоз, карбапенемазопродуцирующие карбапенем-резистентные энтеробактерии (CP-CRE), карбапенем-резистентную инфекцию (CRE/CRPA), болезнь Карриона, болезнь кошачьей царапины, целлюлит, болезнь Шагаса (трипаносомоз), мягкий шанкр, ветряную оспу, инфекцию, вызванную вирусом чикунгунья, (чикунгунья), хламидиоз, Chlamydia trachomatis, инфекцию, вызванную Chlamydophila pneumoniae, холеру, хромобластомикоз,

хитридиомикоз, сигуатеру, клонорхоз, колит, вызванный Clostridium difficile, инфекцию, вызванную Clostridium difficile, Clostridium perfringens, грибковую инфекцию кокцидиоидомикоз (лихорадку долины), колорадскую клещевую лихорадку (CTF), простуда (острый вирусный ринофарингит; острый ринит), врожденный сифилис, конъюнктивит, COVID-19 (коронавирусную инфекцию 2019), CP-CRE, Enterobacter spp., CP-CRE, Escherichia coli (E. coli), CP-CRE, виды Klebsiella, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, трансмиссивную губчатую энцефалопатию (CJD), болезнь Крейтцфельдта-Якоба (CJD), Конго-крымскую геморрагическую лихорадку (CCHF), корковую чесотку, криптококкоз, криптоспоридиоз (крипто), кожную мигрирующую личинку (CLM), циклоспору, циклоспориоз, цистицеркоз, цитомегаловирусную инфекцию, инфекции, вызванные вирусом денге, лихорадку Денге, 1,2,3,4 (лихорадку денге), денгеподобный синдром, инфекцию, вызванную Desmodesmus, диарею, диентамебиаз, дифтерию, дифиллоботриоз, дракункулез, E. coli, инфекцию, вызванную E. coli, продуцирующую шига-токсин (STEC), вирусная болезнь восточного энцефалита лошадей, геморрагическую лихорадка Эбола (Эбола), эхинококкоз, инфекцию, вызванную Ehrlichia chaffeensis, инфекцию, вызванную Ehrlichia ewingii, эрлихиоз, анаплазмоз, энцефалит, арбовирусный или параинфекционный, энтеробиоз (оксиуроз), энтерококковую инфекцию, энтеровирусную инфекцию, D68 (EV-D68), энтеровирусную инфекцию, неполиомиелитную инфекцию (неполиомиелитный энтеровирус), эпидемический сыпной тиф, инфекционный мононуклеоз, вызванный вирусом Эпштейна-Барра (моно), инфекционную эритему (пятую болезнь), внезапную экзантему (шестую болезнь), фасциолез, фасциолопсидоз, семейную бессонницу со смертельным исходом (FFI), пятую болезнь, филяриатоз, грипп (сезонный), пищевое отравление, пищевое отравление, связанное с Clostridium perfringens, инфекцию, вызванную свободноживущей амебой, грибковую инфекцию, инфекцию, вызванную Fusobacterium, газовую гангрену (клостридиальный мионекроз), генитальный герпес, генитальные бородавки, геотрихоз, краснуху, синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера (GSS), лямблиоз, сап, гнатостомоз, гонорею, паховую гранулему, паховую гранулему (донованоз), инфекцию, вызванную стрептококками группы A, инфекцию, вызванную стрептококками группы A, инфекцию, вызванную стрептококками группы B, вирус гуанарито, гемофильную инфекцию, тип B (Hib или H-грипп), инфекцию, вызванную гемофильной палочкой, болезнь рук, ног и рта (HFMD), болезнь Хансена, хантавирусную инфекцию, хантавирусный легочный синдром (HPS), вирусную болезнь Хартленда, инфекцию, вызванную Helicobacter pylori, гемолитико-уремический синдром (HUS), геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (HFRS), инфекцию, вызванную вирусом Хендра, гепатит A (геп. A), гепатит B (геп. B), гепатит C (геп. C), гепатит D (геп. D), гепатит E (геп. E), герпес, вирус герпеса B, простой герпес, опоясывающий герпес, опоясывающий лишай ВЗВ (опоясывающий лишай), гемофилический грипп типа b, гистоплазмозную инфекцию (гистоплазмоз), анкилостомоз, ВПЧ (папилломавирус человека), бокавирусную инфекцию человека, человеческий эвингиоз, гранулоцитарный анаплазмоз человека (HGA), вирус иммунодефицита

человека/СПИД (ВИЧ/СПИД), метапневмовирусную инфекцию человека, моноцитарный эрлихиоз человека, папилломавирусную инфекцию человека (ВПЧ), инфекцию, вызванную вирусом парагриппа человека, гименолепидоз, импетиго, грипп (острое респираторное заболевание), грипп (сезонный), инвазивную пневмококковую инфекцию, изоспороз, вирус Хунина, синдром Кавасаки, кератит, инфекцию, вызванную Kingella kingae, куру, лихорадку Ласса, вирус Ласса, легионеллез (болезнь легионеров), лейшманиоз, проказу (болезнь Хансена), лептоспироз, листериоз (листерия), вирус Лухо, болезнь Лайма, лимфатический филяриатоз (слоновость), лимфоцитарный хориоменингит (LCMV), венерическую лимфогранулему (LGV), вирус Мачупо, малярию, инфекцию, вызванную вирусом Марбург, корь, мелиоидоз (болезнь Уитмора), менингит, менингит - бактериальный, менингит - вирусный, менингококковую инфекцию, метагонимоз, микроспоридиоз, ближневосточный респираторный синдром (MERS), контагиозный моллюск (MC), оспу обезьян, мононуклеоз, болезни, переносимые комарами, MRSA, эпидемический паротит, мышиный тиф (эндемический сыпной тиф), мицетому, инфекцию, вызванную Mycoplasma genitalium, микоплазменную пневмонию, миаз, Neisseria meningitidis, неонатальный конъюнктивит (Ophthalmia neonatorum), инфекцию, вызванную вирусом Нипах, нокардиоз, норовирус, онхоцеркоз (речную слепоту), описторхоз, контагиозный пустулезный дерматит (стоматит), паракокцидиоидомикоз (южноамериканский бластомикоз), парагонимоз, паралитическое отравление моллюсками (паралитическое отравление моллюсками, сигуатера), пастереллез, PEP, паразитарную инфекцию, коклюш (судорожный кашель), конъюнктивит, пневмококковую инфекцию, инфекцию, вызванную пневмококками, пневмоцистную пневмонию (PCP), пневмонию, легочную чуму, полиомиелит (полиом.), полиомиелит, паралитическую, полиовирусную инфекцию, лихорадку Понтиак, болезнь, вызванную вирусом Повассан, инфекцию, вызванную Prevotella, первичный амебный менингоэнцефалит (PAM), прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию, протозойную инфекцию, орнитоз (попугайную лихорадку), пустулезную сыпь (оспу, оспу обезьян, коровью оспу), бешенство, байлисаскаридоз, болезнь от укуса крыс, возвратный тиф, инфекцию, вызванную респираторно-синцитиальным вирусом, синдром Рея, риноспоридиоз, риновирусную инфекцию, риккетсиозную инфекцию, риккетсиоз (пятнистую лихорадку Скалистых гор), лихорадка Рифт-Валли (ЛРВ), стригущий лишай, ротавирусную инфекцию, краснуху, вирус Сабиа, сальмонеллу, инфекцию, вызванную Salmonella Paratyphi, инфекцию, вызванную Salmonella Typhi, сальмонеллез, атипичную пневмонию (тяжелый острый респираторный синдром), чесотку, скарлатину, шистосомоз, скомбротоксикоз, сепсис, септический шок, септицемическую чуму, тяжелый острый респираторный синдром (TOPC), шига-токсин-продуцирующую кишечную палочку, шигеллу, шигеллез, опоясывающий герпес, опоясывающий лишай (опоясывающий герпес), оспу, стоматит (контагиозный пустулезный дерматит), споротрихоз, пятнистый риккетсиоз, заболевание, вызванное вирусом энцефалита Сент-Луиса, инфекцию, вызванную стафилококком, инфекцию, вызванную стафилококком (метициллин-резистентную (MRSA)),

стафилококковое пищевое отравление, стафилококковую инфекцию (промежуточную чувствительность к ванкомицину (VISA)), стрептококковую инфекцию горла, стрептококковую инфекцию, группа A (инвазивную) (стреп. A (инвазивную)), стрептококковую инфекцию, группу B (стреп. B), стрептококковый токсический шок, стронгилоидоз, подострый склерозирующий панэнцефалит, сифилис, тениоз, столбняк, клещевые заболевания, грибковое поражение кожи лица, стригущий лишай, дерматомикоз гладкой кожи, трихофитию промежности, микоз кистей, черный лишай, дермофитию стопы, дерматофитный онихомикоз, разноцветный лишай, синдром токсического шока, токсокароз (офтальмологическую мигрирующую личинку (OLM)), токсокароз (висцеральную мигрирующую личинку (VLM)), токсоплазмоз, трахому, трихинеллез, трихомониаз, трихиноз (трихинеллез), трихуроз (инфекцию, вызванную власоглавом), туберкулез (TB), туляремию (кроличью лихорадку), брюшной тиф, брюшной тиф, группы D, сыпной тиф, сыпной тиф, инфекцию, вызванную Ureaplasma urealyticum, вагиноз, лихорадку долины, вариантную болезнь Крейтцфельдта-Якоба (vCJD, nvCJD), ветряную оспу (ветрянку), венесуэльский конский энцефалит, венесуэльсккую геморрагическую лихорадку, холерный вибрион (холера), вибрион, вызванный парагемолитическим вибрионом, инфекцию, вызванную Vibrio vulnificus, вибриоз, вирусную инфекцию, вирусную геморрагическую лихорадку, вирусную геморрагическую лихорадку (Эбола, Ласса, Марбург), вирусную геморрагическую лихорадку (VHF), вирусную пневмонию, вирусную болезнь Западного Нила, вирусную болезнь западного лошадиного энцефалита, белую пьедру (узловатую трихоспорию), коклюш, желтую лихорадку, иерсинию (Yersinia), инфекцию, вызванную Yersinia pseudotuberculosis, йерсиниоз, Zeaspora, лихорадку Зика, вирус Зика, болезнь, вызванную вирусом Зика, врожденную болезнь, вызванную вирусом Зика, неврожденную инфекцию, вызванную вирусом Зика (вирус Зика), врожденную инфекцию, вызванную вирусом Зика, неврожденную вирусную инфекцию Зика, и зигомикоз. В различных вариантах осуществления инфекционное заболевание, которое можно лечить с помощью описанных способов и композиций, лечат, сохраняя при этом здоровые клетки.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ активации по меньшей мере одной γδ Т-клетки у субъекта, включающий стадию введения полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ инициирования или увеличения пролиферации γδ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ инициировать или усилить дегрануляцию γδ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ инициирования или повышения активности γδ Т-лимфоцитов (например, активности, опосредованной Т-клетками) у субъекта, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе. В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ инициирования или повышения активности уничтожения γδ Т-клеток (например, активности, опосредованной Т-клетками) у субъекта при сохранении здоровых клеток, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ инициировать или усилить цитотоксичность γδ Т у субъекта, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе. В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ инициирования или повышения цитотоксичности γδ Т у субъекта при сохранении здоровых клеток, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ инициировании или увеличения мобилизации γδ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ повышения выживаемости γδ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретение представляет собой способ повышения устойчивости к истощению γδ Т-клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента, как определено в данном документе.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложен способ стимуляции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента в количестве, эффективном для стимуляции иммунного ответа.

Применение антител или их фрагментов

В соответствии с дополнительным аспектом изобретения предложено применение полиспецифического антитела или его фрагмента, как описано в данном документе, для изучения распознавания антигена, активации, сигнальной трансдукции или функции γδ Т-клеток (в частности Vδ1 Т-клеток). Как описано в настоящем документе, антитела продемонстрировали активность в анализах, которые можно использовать для исследования функции γδ Т-клеток. Такие полиспецифические антитела также могут быть

пригодны для индуцирования пролиферации γδ Т-клеток, таким образом, они могут использоваться в способах экспансии γδ Т-клеток (например, Vδ1 Т-клеток).

Полиспецифические антитела, которые связываются с Vδ1-цепью, можно использовать для обнаружения γδ Т-клеток. Например, антитела могут быть мечены обнаруживаемой меткой или репортерной молекулой или использоваться в качестве захватывающего лиганда для селективного обнаружения и/или выделения Vδ1 Т-клеток в образце. Меченные антитела находят применение во многих способах, известных в данной области техники, например, иммуногистохимии и ИФА.

Обнаруживаемая метка или репортерная молекула могут представлять собой радиоизотоп, такой как ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S или ^{125}I; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Флуоресцентные метки, применяемые к антителам по изобретению, можно затем использовать в методах сортировки клеток с активацией флуоресценцией (FACS).

Таким образом, в различных вариантах осуществления изобретение включает in vivo способы модуляции γδ Т-клеток, способы связывания γδ Т-клеток, способы нацеливания на γδ Т-клетки, способы активации γδ Т-клеток, способы пролиферации γδ Т-клеток, способы экспансии γδ Т-клеток, способы обнаружения γδ Т-клеток, способы инициирования дегрануляции γδ Т-клеток, способы инициирования активности уничтожения γδ Т-клеток, способы отбора антител или их фрагментов, способы, включающие стадию введения полиспецифического антитела или его фрагмента субъекту, как описано в данном документе.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидны из описания, предложенного в настоящем документе. Однако следует понимать, что описание и конкретные примеры, указывающие на предпочтительные варианты осуществления изобретения, представлены только с целью иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации станут очевидными для специалистов в данной области техники. Далее изобретение будет описано с помощью следующих неограничивающих примеров.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Материалы и методы

Открытие антитела человека

Фаговый дисплей человека применяли для получения человеческих антител к человеческому вариабельному домену Vδ1+, как описано в данном документе. Библиотека была сконструирована, как описано у Schofield et al (Genome biology 2007, **8**(11): R254), и включала библиотеку вариабельных одноцепочечных фрагментов (scFv), отображающую ~40 миллиардов человеческих клонов. Эту библиотеку подвергали скринингу с использованием антигенов, способов, селекции, деселекции, скрининга и стратегий определения характеристик, как описано в данном документе.

Получение антигена

Дизайн растворимых гетеродимеров γδ TCR, содержащих константные области TCRα и TCR β, используемые в примерах ниже, был получен согласно Xu et al. (2011) PNAS 108: 2414-2419. Домены Vγ или Vδ были слиты в рамке с константной областью TCRα или TCRβ, лишенной трансмембранного домена, а затем с последовательностью лейциновой застежки или Fc-последовательностью и гистидиновой меткой/линкером.

Конструкцию экспрессии временно трансфицировали в суспензии клеток EXPI HEK293 млекопитающего (в виде трансфекции отдельно или совместной трансфекции для гетеродимера). Секретируемые рекомбинантные белки выделяли и очищали от супернатанта клеточной культуры с помощью аффинной хроматографии. Чтобы обеспечить хорошее восстановление мономерного антигена, образцы дополнительно очищали с помощью препаративной эксклюзионной хроматографии (ЭХ). Очищенные антигены анализировали в отношении чистоты с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и в отношении состояния агрегации с помощью аналитической ЭХ.

Функциональная валидация антигена

Специфичность антигенов, содержащих V-область вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1), была подтверждена в иммуноанализе DELFIA (Perkin Elmer) и в проточном анализе в конкуренции с γδ Т-клетками с использованием антитела к Vδ1 REA173-Miltenyi Biotec.

Усиленный диссоциацией лантанидный флюоресцентный иммуноанализ (DELFIA)

Для подтверждения специфичности антигена проводили иммуноанализ DELFIA с антигеном, нанесенным непосредственно на планшет (3 мкг/мл антигена в 50 мкл PBS при 4°C в течение ночи (Nunc №437111) и серийных разведениях первичных антител, начиная с 300 нМ. Для обнаружения меченное Eu-N1 антитело к человеческому IgG DELFIA (Perkin Elmer № 1244-330) использовали в качестве вторичного антитела в разведении 1/500 в 50 мкл 3% MPBS (PBS+3% (масса/объем) обезжиренного сухого молока). Проявление проводили с использованием 50 мкл усиливающего раствора DELFIA (Perkin Elmer № 4001-0010).

Ранжирование аффинности представляющего интерес антитела проводили с использованием иммуноанализа DELFIA, в котором антитела захватывались белком G, нанесенным на планшет, и добавляли растворимый биотинилированный антиген L1 (DV1-GV4) в количестве 5 нМ в 50 мкл (3MPBS). Для детекции использовали 50 мкл стрептавидина-Eu (1:500 в буфере для анализа, Perkin Elmer) и сигнал проявляли с помощью усиливающего раствора DELFIA. D1.3 hIgG1 (описанный в England et al. (1999) J. Immunol. 162: 2129-2136) использовали в качестве отрицательного контроля.

Выход при отборе фагового дисплея субклонировали в scFv-вектор экспрессии pSANG10 (Martin et al. (2006) BMC Biotechnol. 6: 46). Растворимые scFv экспрессировали и подвергали скринингу на связывание в DELFIA на непосредственно иммобилизованных мишенях. Совпадения определяли как сигнал DELFIA выше 3000 флуоресцентных единиц.

Получение антител

Выбранные scFvs были субклонированы в каркасы IgG1, используя коммерчески доступные плазмиды. Суспензию клеток expi293F трансфицировали указанными плазмидами для экспрессии антител. Для удобства, если не указано иное, антитела, охарактеризованные в этих примерах, относятся к антителам в формате IgG1, отобранным из фагового дисплея как scFv. При этом антитела по изобретению могут находиться в любом формате антител, как обсуждалось ранее.

Очистка антител

Антитела IgG очищали партиями из супернатантов, используя хроматографию с протеином А. Концентрированные элюаты белка А затем очищали с использованием эксклюзионной хроматографии (ЭХ). Качество очищенных IgG анализировали с помощью ИФА, ДСН-ПААГ-электрофореза и ЭХ-ВЭЖХ.

Получение γδ Т-клеток

Популяции обогащенных γδ Т-клеток получали в соответствии со способами, описанными в WO 2016/198480 (т. е. полученные из крови γδ Т-клетки) или WO 2020/095059 (т. е. полученные из кожи γδ Т-клетки). Вкратце, для полученных из крови γδ Т-клеток PBMC получали из крови и подвергали магнитному истощению αβ Т-клеток. αβ-истощенные PBMC представляли собой культуры в среде CTS OpTmizer (Thermo Fisher) в присутствии OKT-3 (или соответствующего антитела к Vδ1), IL-4, IFN-γ, IL-21 и IL-1β в течение 7 дней. На 7 день культивирования в среду добавляли OKT-3 (или соответствующее антитело к Vδ1), IL-21 и IL-15 в течение еще 4 дней. На 11 день культивирования в среду добавляли OKT-3 (или соответствующее антитело к Vδ1) и IL-15 в течение еще 3 дней. На 14-й день культивирования половину среды заменяли свежей полной OpTmiser и добавляли OKT-3 (или соответствующее антитело к Vδ1), IL-15 и IFN-γ. Начиная с 17-го дня культивирования в культуру добавляли OKT-3 (или соответствующее антитело к Vδ1) и IL-15 каждые 3-4 дня; половину среды заменяли свежей средой каждые 7 дней.

Для полученных из кожи γδ Т-клеток образцы кожи готовят путем удаления подкожного жира и используют 3-мм иглу для биопсии кожи, используемой для взятия нескольких образцов. Образцы кожи помещали на сетки углеродной матрицы и помещали в лунку G-REX6 (Wilson Wolf). Каждую лунку заполняли полной средой, содержащей среду AIM-V (Gibco, Life Technologies), заменитель сыворотки для иммунных клеток CTS (Life Technologies), IL-2 и IL-15. В течение первых 7 дней культивирования использовали полную изоляционную среду, содержащую амфотерицин B (Life Technologies) («+AMP»). Среду меняли каждые 7 дней, аккуратно отсасывая верхнюю среду и заменяя ее второй полной изоляционной средой (без AMP), стараясь не потревожить клетки на дне планшета или биореактора. После трех недель культивирования полученные выделенные клетки затем пассируют в сосуды для свежих культур тканей и свежие среды (например, среду AIM-V или среду TexMAX (Miltenyi)) с рекомбинантным IL-2, IL-4, IL-15 и IL-21 до сбора. Необязательно, αβ Т-клетки, также присутствующие в культуре, затем удаляют с

помощью наборов для истощения αβ Т-клеток и соответствующих протоколов, таких как представленные Miltenyi. Для дальнейшей справки см. WO2020/095059.

Анализ связывания γδ Т-клеток

Связывание антител с **γδ** Т-клетками тестировали путем инкубации фиксированной концентрации очищенных антител с 250000 **γδ** Т-клеток. Эту инкубацию проводили в условиях блокировки, чтобы предотвратить неспецифическое связывание антител через Fc-рецептор. Обнаружение выполняли путем добавления вторичного флуоресцентного, конъюгированного с красителем антитела к IgG1 человека. Для отрицательных контролей клетки получали a) только с изотипическим антителом (рекомбинантный IgG человека), b) только с флуоресцентным, конъюгированным с красителем антителом к IgG человека и c) с комбинацией a) и b). Также готовили и анализировали контрольную лунку с полностью неокрашенными клетками. В качестве положительных контролей использовали очищенное мышиное моноклональное антитело IgG2 к CD3 человека и очищенное мышиное моноклональное антитело IgG1 к Vδ1 TCR человека в двух различных концентрациях и окрашивали козьим антимышиным вторичным антителом, конъюгированным с флуоресцентным красителем. Анализ принимали, если среднее значение интенсивности флуоресценции для положительных контролей более низкой концентрации в канале FITC по меньшей мере в 10 раз превышало самое высокое значение отрицательного контроля.

Анализ ППР

Прибор MASS-2 с аминным чипом высокой емкости (оба от Sierra Sensors, Германия) можно использовать для проведения анализа ППР. 15 нМ IgG захватывали посредством белка G на аминный чип высокой емкости (100 нМ для TS8.2). Антиген L1 (DV1-GV4) пропускали через ячейку при серийном разведении 1:2 от 2000 нМ до 15,625 нМ со следующими параметрами: ассоциация 180 с, диссоциация 600 с, скорость потока 30 мкл/мин, подвижный буфер PBS+0,02% Твин 20. Все эксперименты выполняли при комнатной температуре на приборе MASS-2. Подбор в равновесном состоянии определяли в соответствии со связыванием Ленгмюра 1:1 с помощью программного обеспечения Sierra Analyzer 3.2.

Антитела сравнения

Антитела по настоящему изобретению сравнивали с имеющимися в продаже антителами в тестах, как описано.

Антитело	**Источник**	**№ по каталогу**
Очищенное антитело к CD3 человека (OKT3) Ultra-LEAF™, функциональное	Biolegend	317326
Очищенное антитело к IgG2a человека Ultra-LEAF™ (изотипический контроль для	Biolegend	400264

OKT3)		
Очищенное мкАт к Vδ1 TCR человека (функциональное TS8.2)	ThermoFisher	TCR1730
Очищенный мышиный IgG1 Ultra-LEAF™, антитело контроля изотипа к в отношении TS8.2	Biolegend	400166
BV421 к CD107a человека (клон H4A3)	BD Biosciences	562623
Мышиный IgG1 BV421, контроль изотипа k, клон X40 (RUO)	BD Biosciences	562438
Анти-TCR Vδ1-PE-Vio770, человек (проточная цитометрия, производство прекращено)	Miltenyi	130-100-540
Цетуксимаб	Собственное производство	-
D1.3 HEL (против куриного лизоцима; VH-VL мыши+Fc IgG1 человека).	Собственное производство	-
Анти-RSV (также называемый Мотавизумаб)	Собственное производство	-

Анализы снижения уровня и дегрануляции γδ TCR

Целевые клетки THP-1 (TIB-202™, ATCC), загруженные исследуемыми антителами или не загруженные ими, метили с помощью CellTracker™ Orange CMTMR (ThermoFisher, C2927) и инкубировали с **γδ** Т-клетками в соотношении 2:1 в присутствии антитела CD107a (BV421 против человеческого CD107a (клон H4A3) BD Biosciences 562623). Через 2 часа инкубации поверхностную экспрессию **γδ** TCR (для измерения снижения количества TCR) и экспрессию CD107a (для измерения дегрануляции) на **γδ** Т-клетках оценивали с помощью проточной цитометрии.

Анализ уничтожения (например, для Фиг. 6)

Опосредованную гамма-дельта Т-клетками активность уничтожения и эффект исследуемых антител на активность уничтожения **γδ** Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. Через 4 часа совместного культивирования in vitro в соотношении 20:1 **γδ** Т-клетки и клетки THP-1, меченные CellTracker™ Orange CMTMR (ThermoFisher, C2927) (загруженные антителами или нет), окрашивали с помощью красителя для оценки жизнеспособности клеток Viability Dye eFluor™ 520 (ThermoFisher, 520 65-0867-14), чтобы отличить живые клетки-мишени THP-1 от мертвых. В процессе получения образцов целевые клетки можно гейтировать по положительной пробе на CellTracker™ Orange

CMTMR и изучать в отношении клеточной гибели на основании поглощения красителя для оценки жизнеспособности клеток. Двойные положительные по CMTMR и eFluor™ 520 клетки можно распознавать как мертвые целевые клетки. Активность уничтожения **γδ** Т-клеток выражали как % мертвых целевых клеток.

Картирование эпитопов

Все образцы белков (антиген L1 (DV1-GV4) и антитела 1245_P01_E07, 1245_P02_G04, 1252_P01_C08, 1251_P02_C05 и 1141_P01_E01), использованные для картирования эпитопов, анализировали на целостность белка и уровень агрегации с использованием MALDI с высокой массой.

Для определения эпитопа комплексов L1(DV1-GV4)/1245_P01_E07, L1(DV1-GV4)/1245_P02_G04, L1(DV1-GV4)/1252_P01_C08, L1(DV1-GV4)/1251_P02_C05, и L1(DV1-GV4)/1141_P01_E01 с высоким разрешением, белковые комплексы инкубировали с дейтерированными сшивающими агентами и подвергали полиферментативному протеолизу с использованием трипсина, химотрипсина, Asp-N, эластазы и термолизина. После обогащения сшитыми пептидами образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (MC nLC-LTQ-Orbitrap), а полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения XQuest и Stavrox.

Анализ уничтожения на основе проточной цитометрии SYTOX

Анализ SYTOX позволяет количественно определить опосредованный Т-клетками цитолиз целевых клеток с использованием проточной цитометрии. Мертвые/умирающие клетки обнаруживаются с помощью красителя для определения жизнеспособности клеток (SYTOX® AADvanced™, Life Technologies, S10274), который проникает только в клетки с поврежденными плазматическими мембранами, но не может проникать через неповрежденные клеточные мембраны здоровых клеток. Целевые клетки NALM-6 были помечены красителем CTV (Cell Trace Violet™, Life Technologies, C34557) и, таким образом, их можно было отличить от немеченых эффекторных Т-клеток. Мертвые/умирающие целевые клетки идентифицируют путем двойного окрашивания красителем для определения живых/мертвых клето и красителем для оценки пролиферации клеток.

Через 16 часов in vitro совместного культивирования эффекторных и CTV-меченых целевых клеток при указанных соотношениях эффектор-мишень (E:T, 1:1 или 10:1) клетки окрашивали SYTOX® AADvanced™ и анализировали на FACSLyric™ (BD). Результаты по уничтожению представлены в виде % сокращения количества целевых клеток, которое рассчитывается с учетом количества живых целевых клеток (количество клеток в образце) в тестируемых образцах по сравнению с живыми целевыми клетками в контрольных лунках без добавления эффекторных клеток (максимальное количество):

% целевого снижения=100 - ((количество клеток в образце/максимальное количество) x100)

ПРИМЕР 2. Разработка антигенов

Гамма-дельта (γδ) Т-клетки являются поликлональными с CDR3-поликлональностью. Чтобы избежать ситуаций, когда созданные антитела будут отобраны по отношению к последовательности CDR3 (так как последовательность CDR3 будет отличаться в зависимости от клона TCR), разработка антигенов включала в себя сохранение соответствующей CDR3 в различных форматах. Целью такой разработки было создание антител, распознающих последовательность в пределах вариабельного домена, который кодируется зародышевой линией и, таким образом, является одинаковым для всех клонов, тем самым обеспечивая антитела, которые распознают более широкую субпопуляцию γδ Т-клеток.

Другой важный аспект в процессе получения антигена заключался в разработке антигенов, которые будут пригодны для экспрессии в качестве белка. γδ TCR представляет собой сложный белок, включающий в себя гетеродимер с межцепочечной и внутрицепочечной дисульфидными связями. Формат лейциновой застежки (LZ) и формат Fc использовали для создания растворимых TCR-антигенов для применения при отборе фагового дисплея. Оба формата LZ и Fc хорошо экспрессировались и успешно демонстрировали TCR (в частности, гетеродимерные TCR, *например*, Vδ1Vγ4).

Было обнаружено, что последовательность CDR3 из записи в общедоступной базе данных для γδ TCR хорошо экспрессировалась в качестве белков (запись банка данных белковых структур RCSB: 3OMZ). Таким образом, ее выбрали для получения антигена.

Антигены, содержащие V-область вариабельного домена дельта-цепи 1, экспрессировались в форматах LZ в виде гетеродимера (т.е. в сочетании с различными вариабельными доменами дельта-цепи - «L1», «L2», «L3») и в формате Fc либо в виде гетеродимера («F1», «F2», «F3») или в виде гомодимера (т.е. в сочетании с другой V-областью вариабельного домена дельта-цепи 1 - «Fc1/1»). Все V-области вариабельного домена дельта-цепи 1 из антигенов содержали CDR3 3OMZ. Была разработана другая серия антигенов γδ TCR с использованием аналогичных форматов, содержащих разные V-области вариабельных доменов дельта-цепи (такие как V-область вариабельного домена дельта-цепи 2 и V-область вариабельного домена дельта-цепи 3), и их использовали для деселекции антител с неспецифическим или нецелевым связыванием («L4», «F9», «Fc4/4», «Fc8/8»). Такие антигены были также разработаны так, чтобы содержать CDR3 3OMZ, для обеспечения деселекции антител, которые связываются в области CDR3.

Функциональная валидация антигена была выполнена для подтверждения того, что разработанные антигены подходят для получения антител к TRDV1 (V-область вариабельного домена дельта-цепи 1 TCR) и полиспецифических антител. Обнаружение наблюдали только с антигенами, содержащими домен δ1 (**Фиг. 1**).

ПРИМЕР 3. Фаговый дисплей

Отбор фагового дисплея осуществляли относительно библиотек scFv человека, используя любой гетеродимерный формат LZ TCR в раундах 1 и 2 с деселекцией гетеродимерного LZ TCR в обоих раундах. Раунд 1 проводили с использованием

гомодимерного Fc-слитого TCR с деселекцией IgG1 Fc человека, а затем раунд 2 для гетеродимерного LZ TCR с деселекцией гетеродимерного LZ TCR (см. **таблицу 2**).

Таблица 2. Обзор отбора фагового дисплея

Мишень	Отбор раунда 1	Деселекция раунда 1	Отбор раунда 2	Деселекция раунда 2
DV1	bt-L1 (DV1-GV4)	L4 (DV2-GV4)	bt-L3 (DV1-GV8)	L4 (DV2-GV4)
DV1	bt-Fc1/1 (DV1-DV1)	Fc	bt-L1 (DV1-GV4)	L4 (DV2-GV4)

bt=биотин.

Отбор проводили в жидкой фазе, используя 100 нМ биотинилированных белков. Деселекцию проводили с использованием 1 мкМ небиотинилированных белков.

Успех селекции фагового дисплея анализировали с помощью DELFIA для поликлональных фагов (DELFIA). Все результаты селекции DV1 показали желаемое связывание с мишенями Fc 1/1, L1, L2, L3, F1 и F3. Были обнаружены различные степени связывания с нецелевыми L4, F9, Fc 4/4, Fc 8/8 и Fc (см. **Фиг. 2А** и **В**).

ПРИМЕР 4. Отбор антител и полиспецифических антител

Совпадения, полученные в примере 3, секвенировали (с помощью стандартных способов, известных в данной области техники). Идентифицировали 130 уникальных клонов, которые продемонстрировали уникальную комбинацию CDR3 VH и VL. Из этих 130 уникальных клонов 125 продемонстрировали уникальную CDR3 VH, а 109 продемонстрировали уникальную CDR3 VL.

Уникальные клоны повторно организовали в виде массива и проанализировали специфичность с помощью ИФА (DELFIA). Из выборок была идентифицирована панель из 94 уникальных связывающих веществ scFv человека, которые связывают TRDV1 (L1, L2, L3, F1, F2, F3), но не TRDV2 (L4).

Было включено ранжирование аффинности выбранных связующих веществ, чтобы способствовать выбору клонов в будущем. Большое количество связывающих веществ продемонстрировали значения аффинности в наномолярном диапазоне, реагируя с 25-100 нМ биотинилированного антигена. Небольшое количество связующих веществ продемонстрировали сильную реакцию с 5 нМ антигеном, что указывает на возможные одноразрядные наномолярные значения аффинности. Некоторые связующие вещества продемонстрировали отсутствие реакции с 100 нМ антигеном, что указывает на значения аффинности в микромолярном диапазоне.

Для отбора клонов с целью продолжения превращения IgG цель заключалась в том, чтобы включить как можно больше зародышевых линий и как можно больше различных CDR3. Более того, избегали предрасположенностей последовательностей, таких как гликозилирование, сайты связывания интегрина, сайты связывания CD11c/CD18, непарные цистеины. Кроме того, были включены различные аффинности.

Выбранные клоны подвергали скринингу на связывание с естественным экспрессированным на клеточной поверхности γδTCR с использованием полученных из

кожи γδ Т-клеток, полученных от разных доноров. Клоны, выбранные для превращения в IgG, показаны в **таблице 3**. Кроме того, указанные связывающие вещества к TRDV1 затем также форматировали в полиспецифические антитела с помощью стандартной методики рекомбинации, экспрессии, процессинга и выделения. После этого связывание как с первым целевым антигеном (TRDV1), так и со вторым антигеном подтверждали в указанном полиспецифическом формате.

Таблица 3. Связывающие вещества DV1 для превращения IgG

ID клона	CDR1 тяжелой цепи	SEQ ID NO.	CDR2 тяжелой цепи	SEQ ID NO:	CDR3 тяжелой цепи	SEQ ID NO.	CDR1 легкой цепи	SEQ ID NO:	CDR2 легкой цепи	SEQ	CDR3 легкой цепи	SEQ ID NO:	100 нМ L1
1245_P01_E07	GFTFSDYY	38	ISSSGSTI	26	VDYADAFDI	2	QSIGTY	50	VAS	160	QQSYSTLLT	14	162591
1252_P01_C08	GFTVSSNY	39	IYSGGST	27	PIELGAFDI	3	NIGSQS	51	YDS	161	QVWDSSSDHVV	15	1977
1245_P02_G04	GDSVSSKSAA	40	TYYRSKWST	28	TWSGYVDV	4	QDINDW	52	DAS	162	QQSYSTPQVT	16	5896
1245_P01_B07	GFTFSDYY	41	ISSSGSTI	29	ENYLNAFDI	5	QSLSNY	53	AAS	163	QQSYSTPLT	17	642711
1251_P02_C05	GFTFSSYA	42	ISGGGGTT	30	DSGVAFDI	6	QNIRTW	54	DAS	164	QQFKRYPPT	18	652699
1141_P01_E01	GYSFTSYW	43	IYPGDSDT	31	HQVDTRTADY	7	RSDVGGYNY	55	EVS	165	SSYTSTSTLV	19	136780
1139_P01_E04	GDSVSSNSAA	44	TYYRSKWYN	32	SWNDAFDI	8	QSISTW	56	DAS	166	QQSYSTPLT	20	23786
1245_P02_F07	GDSVSSNSAA	45	TYYRSKWYN	33	DYYYSMDV	9	QSISSW	57	DAS	167	QQSHSHPPT	21	10450

1245_P01_G06	GFTFSDYY	46	ISSSGSTI	34	HSWNDAFDV	10	QSISSY	58	AAS	168	QQSYSTPDT	22	22474
1245_P01_G09	GDSVSSNSAA	47	TYYGSKWYN	35	DYYYSMDV	11	QSISTW	59	DAS	169	QQSYSTPVT	23	18430
1138_P01_B09	GFTFSDYY	48	ISSSGSTI	36	HSWSDAFDI	12	QDISNY	60	DAS	170	QQSYSTPLT	24	29193
1251_P02_G10	GFTFSDYY	49	ISSSGSTI	37	HSWNDAFDI	13	QSISSH	61	AAS	171	QQSYSTLLT	25	17053

ПРИМЕР 5: Анализ антител методом ППР

Полученные антитела IgG подвергали анализу связывания γδ-клеток, и 5 из них отбирали для дальнейшего определения функциональных и биофизических характеристик. Анализ методом ППР проводили для определения равновесных констант диссоциации (K_D). Сенсограммы взаимодействия тестируемого антитела с аналитом вместе со стационарной аппроксимацией (при наличии) представлены на **Фиг. 3**. Не было обнаружено связывания TS8.2 с 80 RU IgG, захваченного на чипе. Результаты обобщены в **таблице 4**.

Таблица 4. Результаты захвата IgG

Анализируемое вещество	**ID клона**	**K_D (нМ)**	**K_D (М)**
L1 (DV1-GV4)	1245_P01_E07	12,4	1,24e-08
L1 (DV1-GV4)	1252_P01_C08	100	1,00e-07
L1 (DV1-GV4)	1245_P02_G04	126	1,26e-07
L1 (DV1-GV4)	1245_P01_B07	341	3,41e-07
L1 (DV1-GV4)	1251_P02_C05	1967*	1,97e-06
L1 (DV1-GV4)	1139_P01_E04	251	2,51e-07
L1 (DV1-GV4)	1245_P02_F07	193	1,93e-07
L1 (DV1-GV4)	1245_P01_G06	264	2,64e-07
L1 (DV1-GV4)	1245_P01_G09	208	2,08e-07
L1 (DV1-GV4)	1138_P01_B09	290	2,90e-07
L1 (DV1-GV4)	1251_P02_G10	829	8,29e-07
L1 (DV1-GV4)	**TS8.2** (коммерческое	44	4,40e-08

	антитело к Vδ1)		

*Связывание 1252_P02_C05 не достигло насыщения, поэтому данные были экстраполированы.

ПРИМЕР 6: Анализ взаимодействия с TCR

Авторы изобретения разработали несколько анализов для функциональной характеристики выбранных антител. В первом анализе оценивали взаимодействия с γδ TCR путем измерения снижения количества γδ TCR при связывании антител. Выбранные антитела тестировали против коммерческих антител к CD3 и к Vδ1, которые использовали в качестве положительного контроля, или против 1252_P01_C08 в качестве положительного контроля (для 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06 и 1245_P01_G09). Коммерческое анти-пан-γδ использовали в качестве отрицательного контроля, поскольку это антитело к пан-γδ, распознающее все γδ Т-клетки, независимо от вариабельной цепи, и поэтому, вероятно, имеют другой механизм действия.

Анализ проводили с использованием полученных из кожи γδ Т-клеток, полученных от трех разных донорских образцов (образцы с чистотой 94%, 80% и 57%). Результаты показаны на **Фиг. 4**. Значения EC50 приведены в **таблице 4** ниже.

ПРИМЕР 7: Анализ дегрануляции Т-клеток

Во втором анализе оценивали дегрануляцию γδ Т-клеток. Считается, что γδ Т-клетки могут опосредовать гибель целевых клеток за счет активации апоптоза, опосредованной перфорином/гранзимом. Литические гранулы в цитоплазме γδ Т-клетки могут высвобождаться в сторону целевой клетки при активации Т-клетки. Следовательно, мечение целевых клеток антителами к CD107a и измерение экспрессии с помощью проточной цитометрии можно использовать для идентификации дегранулирующих γδ Т-клеток.

Как и в **Примере 6**, выбранные антитела тестировали против коммерческих антител к CD3 и к Vδ1 в качестве положительных контролей или против 1252_P01_C08 в качестве положительного контроля (для 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06 и 1245_P01_G09). В качестве отрицательного контроля использовали антитела IgG2a, IgG1 и D1.3. Анализ проводили с использованием полученных из кожи γδ Т-клеток, полученных от трех разных донорских образцов (образцы с чистотой 94%, 80% и 57%). Результаты показаны на **фиг. 5**. Значения EC50 приведены в **таблице 5** ниже.

ПРИМЕР 8. Анализ уничтожения

В третьем анализе оценивали способность γδ Т-клеток, активированных выбранными антителами, убивать целевые клетки.

Как и в **Примере 6**, выбранные антитела тестировали против коммерческих антител к CD3 и против Vδ1 в качестве положительного контроля или против 1252_P01_C08 в качестве положительного контроля (для 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06 и 1245_P01_G09) и против пан-γδ в качестве отрицательного контроля. В качестве изотипического контроля также использовали антитела IgG2a, IgG1 и D1.3.

Анализ проводили с использованием полученных из кожи γδ Т-клеток, полученных от двух доноров (чистота 94% и 80%), а результаты показаны на **Фиг. 6**.

Результаты трех функциональных анализов, протестированных в **Примерах 6-8**, приведены в **таблице 5**.

Таблица 5. Краткое изложение результатов, полученных в результате функциональных анализов

ID клона	**Снижение количества TCR (EC50 мкг/мл - 3 донора)**	**Дегрануляция Т-клеток (EC50 мкг/мл - 3 донора)**	**Анализ уничтожения (EC50 мкг/мл - 2 или 3 донора)**
1245_P01_E07	0,04-0,11	0,007-0,004	0,06
1252_P01_C08	0,02-0,03	0,001-0,0006	0,02
1245_P02_G04	0,01-0,05	0,002	0,10
1245_P01_B07	Положительный; 0,35 (только 1 донор)	Положительный; 0,1 (только 1 донор)	0,13
1251_P02_C05	Положительный; Н/Д	Положительный; Н/Д	Н/Д*
1139_P01_E04	0,027-0,057	0,005	0,005-0,019
1245_P02_F07	0,032-0,043	0,001-0,002	0,006-0,018
1245_P01_G06	0,042-0,055	0,001	0,007-0,051
1245_P01_G09	0,029-0,040	0,001	0,003-0,008
1138_P01_B09	0,078-0,130	N/D	0,055-0,199
1251_P02_G10	0,849; Н/Д	N/D	Н/Д**
OKT3 (антитело к CD3)	0,03-0,04	0,001-0,008	0,05
TS8.2 (антитело к Vδ1)	0,48-0,8	0,07-0,16	Н/Д*

Н/Д: определить не удалось; Н/Д*: определить не удалось, кривая титрования не вышла на плато; Н/Д**: Пониженный профиль уничтожения, значение EC50 не установлено

ПРИМЕР 9: Картирование эпитопов

Чтобы определить эпитоп комплексов антиген/антитело с высоким разрешением, белковые комплексы инкубировали с дейтерированными сшивающими агентами и подвергали мультиферментативному расщеплению. После обогащения сшитыми пептидами образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения

(MC nLC-LTQ-Orbitrap), а полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения XQuest (версия 2.0) и Stavrox (версия 3.6).

После протеолиза с трипсином, химотрипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1(DV1-GV4)/1245_P01_E07 с дейтерированным d0d12 анализ MC/MC nLC-orbitrap обнаружил 13 сшитых пептидов между L1(DV1-GV4) и антителом 1245_P01_E07. Результаты представлены на **Фиг. 7**.

После протеолиза с трипсином, химотрипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1(DV1-GV4)/1252_P01_C08 с дейтерированным d0d12 анализ MC/MC nLC-orbitrap обнаружил 5 сшитых пептидов между L1(DV1-GV4) и антителом 1252_P01_C08. Результаты представлены на **Фиг. 8**.

После протеолиза с трипсином, химотрипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1(DV1-GV4)/1245_P02_G04 с дейтерированным d0d12 анализ MC/MC nLC-orbitrap обнаружил 20 сшитых пептидов между L1(DV1-GV4) и антителом 1245_P02_G04. Результаты представлены на **Фиг. 9**.

После протеолиза с трипсином, химотрипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1(DV1-GV4)/1251_P02_C05 с дейтерированным d0d12 анализ MC/MC nLC-orbitrap обнаружил 5 сшитых пептидов между L1(DV1-GV4) и антителом 1251_P02_C05. Результаты представлены на **Фиг. 10**.

Также тестировали связывание эпитопа с другим антителом, клон ID 1141_P01_E01. После протеолиза с трипсином, химотрипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1(DV1-GV4)/1141_P01_E01 с дейтерированным d0d12 анализ MC/MC nLC-orbitrap обнаружил 20 сшитых пептидов между L1(DV1-GV4) и антителом 1141_P01_E01. Результаты представлены на **Фиг. 11**.

Краткое изложение результатов картирования эпитопов представлена в **таблице 6**.

Таблица 6. Результаты картирования эпитопов для комплексов антиген/антитело

ID клона	**Картирование эпитопов, нумерация аминокислот в SEQ ID NO: 1**
1245_P01_E07	5, 9, 16, 20, 62, 64, 72, 77
1252_P01_C08	50, 53, 59, 62, 64
1245_P02_G04	37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73, 77
1251_P02_C05	59, 60, 68, 72
1141_P01_E01	3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68, 69

Пример 10: Экспансия Vδ1 Т-клеток

Экспансию выделенных γδ Т-клеток исследовали в присутствии выбранных антител и антител сравнения. Антитела сравнения были выбраны из: антитела к CD3 OKT3 в качестве положительного контроля, отсутствие антител в качестве отрицательного контроля или антитела IgG1 в качестве изотипического контроля. Для сравнения также тестировали коммерчески доступные антитела к Vδ1, TS-1 и TS8.2.

Эксперимент 1:

Первоначальное исследование было проведено путем посева 70000 клеток/лунка с Complete Optimizer и цитокинами, как описано в разделе «Получение γδ Т-клеток» для полученных из крови γδ Т-клеток из Примера 1. Выбранные антитела и антитела сравнения тестировали в различных концентрациях в диапазоне от 4,2 нг/мл до 420 нг/мл. Этот эксперимент был проведен с использованием планшетов для культур тканей, которые позволяют связывать/иммобилизовать антитела на пластике.

Клетки собирали на 7, 14 и 18 дни и определяли общее количество клеток с использованием счетчика клеток (NC250, ChemoMetec). Результаты показаны на **Фиг. 7**. Жизнеспособность Vδ1 Т-клеток также измеряли при каждом сборе, и было показано, что все антитела сохраняли жизнеспособность клеток на протяжении всех экспериментов (данные не представлены). На 18 день также анализировали процентное содержание, количество клеток и кратность изменения Vδ1 Т-клеток. Результаты проиллюстрированы на **фиг.** 8.

Как видно на **Фиг. 7**, общее количество клеток, продуцированных в культурах с антителами, неуклонно увеличивалось по всей культуре и было сравнимо или лучше, чем коммерческие антитела к Vδ1. На 18 день доля Vδ1-положительных клеток в присутствии антител 1245_P02_G04 («G04»), 1245_P01_E07 («E07»), 1245_P01_B07 («B07») и 1252_P01_C08 («C08») в большинстве протестированных концентраций была выше, чем в культуры, в которых присутствовали контрольные антитела OKT3, TS-1 или TS8.2 (см. **Фиг. 8А**).

Эксперимент 2:

Последующий эксперимент проводили на выделенных клетках в сосуде для культивирования с цитокинами, как описано в «Получение γδ Т-клеток» из Примера 1. По сравнению с экспериментом 1 использовали другой сосуд для культивирования, поверхность которого не способствует связыванию/иммобилизации антител. Отобранные антитела и антитела сравнения тестировали в различных концентрациях от 42 пг/мл до 42 нг/мл. Во время эксперимента 2 результаты были получены из экспериментов, проведенных в трех повторностях.

Клетки собирали на 7, 11, 14 и 17 день и определяли общее количество клеток с использованием счетчика клеток, как и ранее. Результаты проиллюстрированы на **фиг. 9**. На 17 день также анализировали процентное содержание, количество клеток и кратность изменения Vδ1 Т-клеток. Результаты проиллюстрированы на **Фиг. 10**.

Композицию клеток, включая клетки, отличные от Vδ1 клеток, также определяли во время эксперимента 2. Клетки на 17-й день собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии на поверхностную экспрессию Vδ1, Vδ2 и αβTCR. Пропорции каждого типа клеток в каждой культуре показаны графически на **Фиг. 11**, а процентные значения приведены в **таблице 6**.

Таблица 7. Композиция клеток на 17-й день - процент живых клеток каждой субпопуляции

	αβ- γδ-	Vδ1	Vδ2	не-Vδ1/Vδ2	αβ
Отсутствие Ат	63,00	18,17	0,86	7,10	0,37
OKT-3	25,63	50,43	0,25	20,13	1,13
IgG1	65,77	15,59	1,11	6,91	0,42
TS8.2, 42 нг/мл	30,60	53,57	3,59	7,46	0,14
TS-1, 42 нг/мл	18,77	65,90	0,91	9,51	0,12
C08, 42 нг/мл	0,79	96,43	0,08	2,51	0,05
C08, 4,2 нг/мл	1,91	94,67	0,18	2,63	0,05
C08, 420 пг/мл	8,47	80,57	0,28	8,42	0,04
C08, 42 пг/мл	35,97	25,93	3,04	19,50	0,31
B07, 42 нг/мл	0,94	95,57	0,46	2,73	0,05
B07, 4,2 нг/мл	1,79	94,10	0,40	3,28	0,01
B07, 420 пг/мл	3,08	91,80	0,29	3,94	0,02
B07, 42 пг/мл	17,93	62,90	0,85	9,16	0,07
E07, 42 нг/мл	2,29	85,13	0,19	11,65	0,04
E07, 4,2 нг/мл	2,15	91,23	0,13	5,77	0,04
E07, 420 пг/мл	9,25	73,90	0,42	13,05	0,02
E07, 42 пг/мл	49,23	18,67	2,17	7,70	0,43
G04, 42 нг/мл	1,90	88,53	0,47	8,09	0,05
G04, 4,2 нг/мл	4,25	89,67	0,93	3,98	0,02
G04, 420 пг/мл	25,97	50,60	1,45	12,72	0,11
G04, 42 пг/мл	44,00	13,77	2,33	26,30	0,32
C05, 42 нг/мл	25,00	42,03	3,75	13,67	1,32
C05, 4,2 нг/мл	46,87	22,03	2,58	16,46	0,38
C05, 420 пг/мл	33,53	44,60	2,23	11,13	0,22
C05, 42 пг/мл	36,83	25,23	6,16	18,00	0,30

Как видно из этих результатов, доля Vδ1-положительных клеток выше в культурах с присутствием B07, C08, E07 и G04 по сравнению с контролями OKT3, TS-1 или TS8.2. Следовательно, протестированные антитела продуцируют и размножают Vδ1-положительные клетки более эффективно, чем имеющиеся в продаже антитела, даже если они присутствуют в культуре в низких концентрациях.

Клетки с 17-го дня эксперимента 2 также анализировали на наличие дополнительных клеточных маркеров, включая CD3-CD56+, для выявления присутствия

натуральных клеток-киллеров (NK) и Vδ1 Т-клеток, которые экспрессируют CD27 (т.е. CD27+). Результаты приведены в таблице 7.

Таблица 8. Композиция клеток на 17-й день - процент NK и CD27+ клеток

	% CD56+CD3-		**%CD27+ из Vδ1**	
	Среднее	**СОС**	**Среднее**	**СОС**
Отсутствие Ат	66,33	8,49	92,43	1,58
OKT-3	7,90	1,04	99,03	0,14
IgG1	70,67	6,41	87,87	0,81
TS8.2, 42 нг/мл	31,63	1,99	66,73	5,55
TS-1, 42 нг/мл	22,97	1,75	94,40	1,14
C08, 42 нг/мл	1,00	0,15	98,17	0,31
C08, 4,2 нг/мл	2,06	0,07	95,07	1,23
C08, 420 пг/мл	8,63	1,64	88,43	3,65
C08, 42 пг/мл	45,10	3,44	91,50	2,50
B07, 42 нг/мл	1,40	0,39	95,47	1,37
B07, 4,2 нг/мл	1,70	0,16	96,70	0,43
B07, 420 пг/мл	3,47	0,38	95,17	0,86
B07, 42 пг/мл	22,03	4,66	88,03	3,00
E07, 42 нг/мл	2,59	0,93	92,27	2,10
E07, 4,2 нг/мл	1,98	0,09	95,77	0,52
E07, 420 пг/мл	8,72	1,33	92,43	0,14
E07, 42 пг/мл	67,73	1,23	93,60	1,16
G04, 42 нг/мл	2,20	0,32	93,80	0,36
G04, 4,2 нг/мл	3,53	0,51	91,63	1,80
G04, 420 пг/мл	30,53	5,00	81,37	3,11
G04, 42 пг/мл	51,13	8,90	94,20	0,93
C05, 42 нг/мл	37,17	6,53	93,80	0,87
C05, 4,2 нг/мл	52,27	8,16	85,40	4,46
C05, 420 пг/мл	37,93	1,57	90,83	2,01
C05, 42 пг/мл	43,40	8,64	92,17	2,02

СОС, стандартная ошибка среднего

Пример 11: Функциональность Vδ1-Т-клеток

Vδ1 Т-клетки, размножающиеся в присутствии выбранных антител, сохраняли поликлональный репертуар областей CDR3, и их также тестировали на функциональность

с использованием анализа уничтожения на основе проточной цитометрии SYTOX. Результаты представлены для клеток, полученных в ходе эксперимента 1 на 14-й день с использованием клеток в соотношении эффектор-мишень (E:T) 10:1 (**Фиг. 12A**), и для клеток, полученных в ходе эксперимента 2 на 17-й день (после замораживания-оттаивания) с использованием клеток с соотношением E:T 1:1 и 10:1 (**Фиг. 12B**).

Как видно на **Фиг. 12**, Vδ1-положительные клетки, размножающиеся в присутствии всех антител, эффективно лизируют клетки-мишени, указывая на то, что они функциональны даже после замораживания и оттаивания клеток.

ПРИМЕР 12: Функциональность клеток после хранения

Также исследовали функциональность клеток после стадии хранения путем замораживания и последующего оттаивания. Часть клеток удаляли из культуры на 17-й день эксперимента 2 и замораживали. Затем клетки размораживали и дополнительно размножали в культуре с помощью IL-15. На **Фиг. 13** показано общее количество клеток после 7 дней культивирования клеток после замораживания-оттаивания для культур, которые приводили в контакт с антителами B07, C08, E07, G04 или OKT-3 до замораживания. Все культуры показали способность к пролиферации после хранения. Культивирование продолжали до 42-го дня, и в течение этого периода контролировали общее количество клеток (результаты показаны на **Фиг. 14**). Общее количество клеток сохраняли или увеличивали в культурах, ранее подвергавшихся воздействию выбранных антител.

ПРИМЕР 13: Исследования эквивалентности связывания модифицированных антител к Vδ1

Для сравнения антитела 1245_P02_G04, полученного в HEK, с вариантами его последовательности и гликозилирования, полученными в CHO, было проведено исследование связывания антигена методом титрования в ИФА. В частности, были предприняты модификации каркаса, аллотипа, опосредованной шарниром эффекторной функциональности, гликозилирования Asn 297 и/или способа производства, которые затем были включены в это исследование. Схема анализа ИФА была следующей: антиген включал антиген L1 (TRDV1/TRGV4); блокирующий буфер - 2% Marvel/PBS; мкАт, разведенные в серии разведений 1/2, начиная с 5 мкг/мл; инкубация антиген-антитело в планшетах для ИФА - 1 час; промыть для удаления неспецифического связывания - 3 x PBS-Tween, затем 3 x PBS; используемые вторичные антитела - меченное Eu антитело к человеческому IgG DELFIA (PerkinElmer; кат. №: 1244-330; 50 мкг/мл) в разведении 1/500; после этого инкубация в течение 1 часа перед добавлением улучшающего раствора DELFIA (PerkinElmer, используется в соответствии с инструкцией); измерение с помощью флуорометрии с временным разрешением (TRF). Для антител, полученных в CHO, стандартные векторы экспрессии, содержащие кассеты тяжелой и легкой цепи, готовили в условиях низкого содержания эндотоксина с применением анионообменной хроматографии. Концентрацию ДНК определяли путем измерения поглощения при длине волны 260 нм. Последовательности были проверены с помощью секвенирования по

Сэнгеру (до двух реакций секвенирования на плазмиду в зависимости от размера кДНК). Для производства использовали адаптированные к суспензии клетки CHO K1 (первоначально из ATCC и адаптированные к бессывороточному росту в суспензионной культуре). Посевные клетки выращивали в среде определенного химического состава, не содержащей компонентов животного происхождения и не содержащей сыворотки. Затем клетки трансфицировали векторами и реагентом для трансфекции, и клетки выращивали дальше. Супернатант собирали путем центрифугирования и последующей фильтрации (фильтр 0,2 мкм), а антитело очищали с использованием MabSelect™ SuRe™ перед приготовлением состава. Для получения примера дефукозилированного антитела протоколы, впервые описанные von Horsten HH et al. (2010) Glycobiology 20(12):1607-18, были применены к платформе экспрессии CHO, описанную выше, и перед экспрессией и очисткой. После изготовления и очистки дефукозилирование мкАт было подтверждено анализом на основе МС.

Результаты этого исследования представлены на **Фиг. 15**. Здесь по оси ординат указан сигнал ИФА, а по оси абсцисс указаны используемые концентрации антигена Vδ1 (мкг/мл). Антитела, включенные в это исследование титрования, приведены в общих чертах, и для более подробной информации RSV=контрольное мкАт к RSV (сделано в CHO). G04=1245_P02_G04 (полученный в HEK, SEQ ID NO:112). AD3=вариант G04 (полученный в CHO; SEQ ID NO:129 и содержащий последовательность вариабельного домена SEQ ID NO:131 и SEQ ID NO:132 и содержащий константный домен SEQ ID NO:133 и SEQ ID NO:134). AD4=шарнир-модифицированный AD3 (полученный в CHO; SEQ ID NO:130 и содержащий константный домен SEQ ID NO:133 и SEQ ID NO:135). AD3gly=дефукозилированный AD3, полученный в сконструированном CHO. При всех титрованиях для всех вариантов наблюдалось эквивалентное связывание антигена.

ПРИМЕР 14: Исследования эквивалентности связывания антитела к Vδ1 с антигеном Vδ1 зародышевой линии человека и его полиморфным вариантом.

Было проведено сравнение исследований связывания на основе ИФА для изучения связывания антитела к Vδ1 с антигеном Vδ1 зародышевой линии человека в соответствии с базой данных IMGT (см. SEQ ID NO:1) по сравнению со связыванием с полиморфным антигеном Vδ1 зародышевой линии человека (SED ID NO:128). В частности, проводили сравнение связывания антител и перекрестной реактивности с антигеном L1 (содержащим каноническую последовательность зародышевой линии TRDV1/TRGV4) и L1AV (вариантом TRDV1/TRGV4, имеющим указанный полиморфизм зародышевой линии TRDV1). Результаты представлены на **Фиг. 16**. Антитела указаны следующим образом: G04=1245_P02_G04 (SEQ ID NO:112); G04 LAGA=G04 с модификацией шарнира-Fc (нумерация L235A, G237AEU; SEQ ID NO: 136). E07 LAGA =1245_P01_E07 с L235A, G237A, SEQ ID NO: 137. C08 LAGA =1252_P01_C08 с L235A, G237A, SEQ ID NO:138, D1.3=контроль. Проводили серийные разведения каждого антитела к указанным антигенам, и при всех разведениях для каждого варианта антител наблюдали

эквивалентное связывание с обоими антигенами. Показано эквивалентное связывание, наблюдаемое для одного примера разведения (1 нМ антитела) в указанной серии.

ПРИМЕР 15: Связывание антитела к Vδ1 приводило к увеличению секреции цитокинов Vδ1+ клетками

Вкратце, все антитела разводили до 10 мкг/мл и инкубировали в течение ночи для связывания антител с планшетом перед промывкой. Полученные из кожи γδ Т-клетки из двух различных донорских кож получали, как описано в другом месте в данном документе (см. Пример 1; в частности, раздел, посвященный получению полученных из кожи γδ Т-клеток). Затем эти клетки кожи добавляли в планшеты для тканевых культур (100000 клеток на лунку), содержащие связанные антитела, как указано. Затем клетки оставляли на сутки до сбора супернатанта и хранения при -80°C. Для анализа цитокинов в супернатантах использовали анализ MSD U-PLEX Human Assay: K151TTK-1, K151UCK-1 (Mesoscale Diagnostics, Мэриленд). Антитела, использованные в этом исследовании, включали IgG1 (контроль, связывающийся не с Vδ1), B07 (1245_P01_B07), E07 (1245_P01_E07), G04 (1245_P02_G04; 1245), и C08 (1252_P01_C08). Результаты этого исследования представлены на **Фиг. 17**. В частности, на **Фиг. 17 (A)** и **(B)** соответственно показаны количества TNF-альфа и IFN-гамма, обнаруженные в супернатанте при применении полученных из кожи γδ Т-клеток, и более высокие уровни, наблюдаемые при применении антител к Vδ1, как указано.

ПРИМЕР 16: Антитело к Vδ1 вызывало увеличение уровней/активности гранзима B в Vδ1+ клетках

Полученные из кожи γδ Т-клетки получали, как описано в другом месте данного документа (см. Пример 1; раздел, посвященный получению полученных из кожи γδ Т-клеток). Клетки THP-1 сначала нагружали зондом GranToxiLux (проницаемый для клеток флуорогенный субстрат предназначен для обнаружения активности гранзима B в целевых клетках) и в соответствии с инструкциями производителя (OncoImmunin, Inc. Гейтерсбург, США). Затем клетки THP-1 обрабатывали антителами, как показано на **Фиг. 18**, в концентрации 10 мкг/мл перед смешиванием с полученным из кожи γδ Т при соотношении мишень/эффектор 1:20. Затем совместные культуры кратковременно центрифугировали, чтобы обеспечить быстрое образование конъюгата, перед совместным культивированием в течение 1 часа и последующим проточным анализом в соответствии с протоколами GranToxiLux. Антитела, использованные в этом исследовании, включали IgG1 (контроль, не связывающийся не с Vδ1), B07 (1245_P01_B07), E07 (1245_P01_E07), G04 (1245_P02_G04; 1245), и C08 (1252_P01_C08). Результаты представлены на **Фиг. 18** и подчеркивают более высокие уровни гранзима B в раковых целевых клетках, наблюдаемые при применении антител к Vδ1, как указано, к этой модельной системе совместной культуры Vδ1+/THP-1.

ПРИМЕР 17: Антитело к Vδ1 вызывает модуляцию и пролиферацию иммунных клеток в тканях человека.

Биоптаты кожи человека (от пяти разных доноров) инкубировали в течение 21 дня в культуре с указанными антителами. Образцы кожи получали путем удаления подкожного жира и т.д., как описано в данном документе (см. Пример 1; раздел о получении полученных из кожи γδ Т-клеток). Повторные образцы кожи от каждого донора затем помещали на сетки с углеродной матрицей, которые затем помещали в лунку G-REX6 (Wilson Wolf). Каждую лунку заполняли полной средой, как также описано в другом месте данного документа. Для исследования и сравнения действия различных антител их добавляли на 0, 7, 14 день до рабочей концентрации 100 нг/мл. Через 21 день в культуре клетки собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Результаты указанного исследования представлены на **Фиг. 19** и особенно подчеркивают заметные различия в модулирующем эффекте различных антител: порядок слева направо: Vd1 TS8.2=TS8.2 (Thermo Fisher); OKT-3 (Biolegend); C08 IgG1=1252_P01_C08; E07 =1245_P01_E07; G04=1245_P02_G04. На **Фиг. 19 (A)** показано среднее количество жизнеспособных пан-γδ TCR-положительных клеток, наблюдаемое в конце культивирования; результаты представлены в виде гейтированной фракции (среднее процентное значение+стандартное отклонение) от общей популяции живых клеток, проанализированной с помощью проточной цитометрии. Для анализа содержания пан-γδ используется следующая стратегия гейтирования: синглеты > живые клетки > антитело к пан-γδ (Miltenyi, 130-113-508). На **Фиг. 19 (B)** показано среднее количество жизнеспособных Vδ1+ TCR-положительных клеток, наблюдаемое в конце культивирования; результаты представлены в виде процента гейтированной фракции (среднее процентное значение+стандартное отклонение) от общей популяции живых клеток, проанализированной с помощью проточной цитометрии. Для анализа содержания клеток Vδ1+ используйте следующую стратегию гейтирования: синглеты > живые клетки > пан-γδ (Miltenyi, 130-113-508) > Vδ1 (Miltenyi, 130-100-553). На **Фиг. 19 (C)** показано количество жизнеспособных двойных Vδ1+ CD25+ положительных клеток, наблюдаемых в конце культивирования; результаты представлены в виде гейтированной фракции (среднее процентное значение+стандартное отклонение) от общей популяции живых клеток. Для анализа содержания CD25+ Vδ1+ клеток используют следующую стратегию гейтирования с помощью проточной цитометрии: Синглеты > живые клетки > пан-γδ (Miltenyi, 130-113-508) > Vδ1 (Miltenyi, 130-100-553) > CD25 (Miltenyi, 130-113-286. Объединенные результаты этого исследования обобщают дифференциальный эффект антител по изобретению, как описано в данном документе, по сравнению с антителами сравнения TS8.2 и OKT3. И хотя это не связано с этой теорией, одна из возможностей для менее благоприятных эффектов, оказываемых на Vδ1+ клетки TS8.2 или OKT3, может быть связана с вредным эффектом, оказываемым этими молекулами сравнения на функцию иммунных клеток с течением времени в этой модельной системе.

ПРИМЕР 18: Антитело к Vδ1 вызывало модуляцию и пролиферацию иммунных клеток в TIL.

Были проведены исследования по изучению модуляции и пролиферации опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов человека (TIL) с помощью антител к Vδ1. Для этих исследований биоптаты опухоли почечно-клеточной карциномы человека (RCC) поставляли в свежем виде и подвергали обработке при получении. В частности, ткань разрезали на кусочки размером ~2 мм^2. В каждую пробирку Miltenyi C помещали до 1 г ткани вместе с 4,7 мл RPMI и ферментами из набора для диссоциации опухоли Tumour Dissociation Kit от Miltenyi в концентрациях, рекомендованных производителем, за исключением фермента R, который использовали в 0,2X концентрации для предотвращения расщепления соответствующих молекул клеточной поверхности. Пробирки типа C помещали в прибор gentleMACS™ Octo Dissociator с нагревательными блоками. Выбирали программу 37C_h_TDK_1 для диссоциации мягких опухолей. Затем гидролизат фильтровали через фильтр 70 мМ для получения суспензии отдельных клеток. RPMI, содержащий 10% FBS, добавляли к расщеплению для подавления ферментативной активности. Клетки 2 раза промывали RPMI/10% FBS и ресуспендировали для подсчета. Полученные клетки затем высевали в лунки планшета для клеточных культур (24-луночный G-REX, Wilson Wolf) в количестве 2,5×10e6 на лунку. Затем клетки инкубировали без цитокинов и с антителами или без них в течение 18 дней. Антитела, включенные в исследование, показаны на **Фиг. 20**. К ним относятся OKT3 (до 50 нг/мл) и 1252_P01_C08, также известный как «C08» (до 500 нг/мл). При включении добавки в виде разовой дозы этих антител добавляли на 0, 7, 11 и 14 день. Во время указанной инкубации среду заменяли свежей на 11-й и 14-й день. Анализ методом проточной цитометрии проводили на 0 и 18 день для определения фенотипа лимфоцитов, а также кратности изменения количества клеток. Клетки сначала гейтировали по CD45+ живым клеткам, а затем, как указано. В группы, в которые были включены рекомбинантные цитокины, их добавляли следующим образом. 0 день: IL-4, IFN-γ, IL-21, IL-1β. Дополнительный IL-15 включали на 7, 11, 14 день. Дополнительные IL-21 и IFN-γ включали на 7 и 14 день, соответственно. На **Фиг. 20** (A) показано кратное увеличение Vδ1+ клеток TIL после 18-дневного культивирования в присутствии C08 или OKT3 с цитокиновой поддержкой (CK) и без нее, если указано. Эти результаты показывают существенное кратное увеличение количества Vδ1+ клеток TIL при применении либо антитела C08, либо антитела сравнения OKT3 в присутствии цитокинов по сравнению с применением только антител или цитокинов. На **Фиг. 20 (B)** показано увеличение общего количества Vδ1 клеток при сборе после применения. Эти результаты демонстрируют существенное увеличение количества Vδ1+ клеток TIL после культивирования с антителом C08 или антителом сравнения OKT3 в присутствии цитокинов по сравнению с антителом или цитокинами по отдельности. На **Фиг. 20 (C)** представлен пример стратегии гейтирования, используемой в анализе клеток методом проточной цитометрии. Из популяции CD45+ живых клеток клетки гейтировали по лимфоцитам на основании их свойств прямого и бокового рассеяния (не показано), γδ Т-клетки затем отделяли от αβ Т-клеток путем окрашивания Т-клеточных рецепторов. Наконец, определяли долю Vδ1 клеток в общей популяции γδ Т-клеток. Пример данных на

18-й день показан для 2 указанных условий (+/-1252_P01_C08): 64,3% клеток были CD45+, из этих CD45+ клеток 53,1% были γδ+, а из γδ клеток 89,7% были Vδ1+. На **Фиг. 20 (D)** представлен фенотипический профиль клеточной поверхности Vδ1+ клеток TIL при сборе. Более высокие уровни CD69 наблюдались после культивирования с антителом C08. На **Фиг. 20 (E)** представлен анализ фракции γδ-отрицательной, CD8-положительной лимфоцитов TIL в живых CD45-положительном гейте при сборе. Таким образом, объединенные результаты подчеркивают модулирующие эффекты, оказываемые антителом к Vδ1 по изобретению, описанные в данном документе, на популяции TIL.

ПРИМЕР 19: Антитело к Vδ1 вызывало усиление цитотоксичности, опосредованной Vδ1+ клетками, и цитотоксичности, специфичной для пораженных клеток.

Анализы и исследования цитотоксичности/активности проводились в модельных системах, включающих тройную культуру эффекторных Vδ1+ клеток, моноцитарных раковых клеток THP-1 и здоровых первичных моноцитов +/- антитела к Vδ1 (1245_P02_G04; 1245_P01_E07; 1252_P01_C08), как описано в данном документе, и включая контроль (без мкАт или D1.3), как указано на **Фиг. 21**. Вкратце, все антитела разводили до 10 мкг/мл в PBS и инкубировали в течение ночи при 4oC в 384-луночных планшетах для анализа на основе визуализации Ultra (Perkin Elmer) для связывания антител с планшетом перед промывкой PBS. Здоровые контрольные моноциты выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC; Lonza) путем отрицательной селекции с использованием магнитно-активированной сортировки клеток (MACS; Miltenyi Biotec). Моноциты и культивированные клетки THP-1 (ATCC) окрашивали [0,5 мкМ] витальными красителями CellTrace Violet и CellTrace CFSE, соответственно в течение 20 минут перед смешиванием в соотношении 1:1. Размноженные Vδ1γδ Т-клетки, полученные из кожи, отделяли от колб для тканевой культуры и серийно разводили для получения диапазона отношений эффектор к мишени (E:T) перед добавлением к клеточным суспензиям THP1:моноциты. Клеточные суспензии высевали в 384-луночные планшеты для анализа, чтобы получить конечную плотность посева клеток 1000 клеток THP-1 на лунку, 1000 моноцитов на лунку и диапазон γδ Т-клеток (максимальное соотношение E:T 60:1). Для определения числа живых моноцитов THP-1 и здоровых контрольных моноцитов через 24 часа были получены конфокальные изображения с использованием платформы для одновременной многопараметрической визуализации Opera Phenix, фиксирующей девять полей зрения при 10-кратном увеличении. Подсчет живых клеток определяли на основе размера, морфологии, микроструктуры и интенсивности окрашивания живых клеток. Результаты представлены на **Фиг. 21**. На **Фиг. 21 (A)** представлено количество клеток THP-1 и моноцитов через 24 часа в тройной совместной культуре с γδ Т-клетками в присутствии связанных с планшетом моноклональных антител или контролей, как указано. Количество клеток рассчитывали с помощью конфокальной микроскопии для многопараметрического анализа с визуализацией живых клеток. На **Фиг. 21 (B)** представлена гистограмма, предназначенная

для выделения интервала между специфическим уничтожением пораженных клеток и сохранением здоровых клеток при верхнем соотношении E:T (60:1) через 24 часа совместного культивирования: левая гистограмма; кратность увеличения уничтожения пораженных клеток (THP-1) по сравнению с уничтожением здоровых клеток (первичные моноциты человека). Правая гистограмма; те же данные, но представленные как процент усиленного уничтожения по сравнению с контролем. На **Фиг. 21 (C)** представлены результаты в виде таблицы, отражающие процентное улучшение активности Vδ1 γδ T-клеток, убивающих целевые клетки THP-1, в присутствии мкАт к Vδ1 по сравнению с контролем без мкАт, рассчитанным по фигуре (A). На **Фиг. 21 (D)** представлены сведенные в таблицу результаты значений EC50, рассчитанные по фигуре (A), представленные в виде количества γδ T-клеток, необходимого для обеспечения 50% уничтожения клеток THP-1. Объединенные результаты и открытия, представленные на **Фиг. 21**, подчеркивают способность описанных в данном документе антител усиливать цитотоксичность и специфичность Vδ1+ клеток в отношении пораженных клеток.

ПРИМЕР 20: Полиспецифическое антитело вызывало усиление цитотоксичности, опосредованной эффекторными Vδ1+ клетками; нацеливание на антиген, ассоциированный с заболеванием соединительной ткани.

Для изучения влияния полиспецифических антител на совместные культуры эффекторных Vδ1+ клеток и раковых клеток A-431 были проведены исследования цитотоксичности/активности. Целевые клетки A-431 ($EGFR^{++}$; ATCC) высевали в 384-луночный планшет для визуализации (Perkin Elmer) по 1000 клеток на лунку и инкубировали при 37°C в течение ночи в среде DMEM (10% FCS). Антитела и полиспецифические антитела, как указано, разводили до 10 мкг/мл и добавляли планшет для анализа (конечная анализируемая концентрация 2 мкг/мл). Размноженные Vδ1 γδ T-клетки, полученные из кожи, отделяли от колб для тканевой культуры и серийно разводили для получения ряда соотношений E:T (максимальное соотношение E:T 60:1) перед добавлением в планшет для анализа. Клетки A-431 инкубировали с Vδ1 γδ T-клетками в присутствии антител или контролей при 30°C, 5% CO_2. После инкубации в течение 24 часов к окрашенным клеткам добавляли Hoechst 33342 (ThermoFisher) (конечная концентрация 2 мкМ). Чтобы определить количество живых клеток A-431, были получены конфокальные изображения с использованием платформы для одновременной многопараметрической визуализации Opera Phenix, фиксирующей девять полей зрения при 10-кратном увеличении. Подсчет живых клеток определяли на основе размера, морфологии, микроструктуры, и интенсивности окрашивания живых клеток. Исследования зависимости эффектор/мишень (E:T) во времени для определения соотношения E:T, при котором 50% целевых клеток погибают в модельных системах +/- контроли, препараты сравнения, антитела и полиспецифические антитела, как указано. Результаты представлены на **Фиг. 22**.

Во-первых, на **Фиг. 22 (A-D)** представлены примеры результатов совместного культивирования, в которых изучались совместные культуры Vδ1+/A-431 +/-

полиспецифические антитела, содержащие биспецифические связывающие фрагменты к Vδ1 x TAA (EGFR), при этом связывающий домен VL+VH к Vδ1 (к первой мишени) объединяется с доменом CH1-CH2-CH3 связывающего фрагмента к EGFR (ко второй мишени). Используемые контроли и компараторы, как указано; слева направо: отсутствие мкАт=антитело не добавлено; D1.3=контроль D1.3; D1.3 IgG LAGA=D1.3+L235A, G237A; D1.3 FS1-67=вариабельный домен D1.3 с EGFR-связывающим константным доменом плюс L235A, G237A (SEQ ID NO: 139); цетуксимаб (собственного производства). Более конкретно, на **Фиг. 22 (A)** представлены результаты пятичасового совместного культивирования с вышеупомянутыми контролями, препаратами сравнения и следующими тестируемыми соединениями: C08-LAGA=1252_P01_C08 с L235A, G237A (SEQ ID NO:138); C08 FS1-67=1252_P01_C08 в сочетании с EGFR-связывающим доменом, содержащим L235A, G237A (SEQ ID NO:140). На **Фиг. 22 (B)** представлены эквивалентные данные пятичасового совместного культивирования с вышеупомянутыми контролями, препаратами сравнения и следующими тестируемыми соединениями: G04-LAGA=1245_P02_G04 с L235A, G237A; G04 FS1-67=1245_P02_G04 в сочетании с EGFR-связывающим доменом, содержащим L235A, G237A (SEQ ID NO:141). На **Фиг. 22 (C)** представлены эквивалентные данные пятичасового совместного культивирования с контролями, препаратами сравнения и следующими тестируемыми соединениями: E07-LAGA=1245_P01_E07 с L235A, G237A; E07 FS1-67=1245_P01_E07 в сочетании с EGFR-связывающим доменом, содержащим L235A, G237A (SEQ ID NO:142). На **Фиг. 22 (D)** представлена таблица, обобщающая процентное улучшение цитотоксичности Vδ1 γδ T-клеток в присутствии контролей, препаратов сравнения и тестируемых соединений в течение 5, 12 и 24 часов. Можно наблюдать усиление более чем на 450%, когда антитела или их фрагменты, как описано в данном документе, представлены в полиспецифическом формате.

Во-вторых, на **Фиг. 22 (E-H)** представлены примеры результатов, в которых изучались совместные культуры Vδ1+/A-431 +/- полиспецифические антитела, содержащие биспецифические связывающие фрагменты к Vδ1 x TAA (EGFR), где связывающий домен к Vδ1 (к первой мишени) содержит полноразмерное антитело (VH-CH1-CH2-CH3/VL-CL), затем объединенное со связывающим фрагментом scFv к EGFR (ко второй мишени). Используемые контроли и препараты сравнения, как указано**;** слева направо: отсутствие мкАт=антитело не добавлено; D1.3=контроль; D1.3 IgG LAGA=D1.3+L235A, G237A; D1.3 LAGA цетуксимаб=D1.3 с L235A, G237A плюс C-концевой scFv, полученный из цетуксимаба, (SEQ ID NO:143); цетуксимаб (собственного производства). Более конкретно, на **Фиг. 22 (E)** представлены пятичасовые совместные культуры с вышеупомянутыми контролями, препаратами сравнения и следующими тестируемыми соединениями: C08-LAGA=1252_P01_C08 с L235A, G237A; C08 LAGA цетуксимаб=1252_P01_C08 с L235A, G237A и с C-концевым scFv, полученным из цетуксимаба, (SEQ ID NO: 144). На **Фиг. 22 (F)** представлена пятичасовая культура с вышеупомянутыми контролями, препаратами сравнения и следующими тестируемыми

соединениями: G04-LAGA=1245_P02_G04 с L235A, G237A; G04 LAGA цетуксимаб=1245_P02_G04 с L235A, G237A и с С-концевым scFv, полученным из цетуксимаба, (SEQ ID NO: 145). На **Фиг. 22 (G)** представлена пятичасовая культура с контролями, препаратами сравнения и следующими тестируемыми соединениями: E07-LAGA=1245_P01_E07 с L235A, G237A; E07 LAGA цетуксимаб=1245_P01_E07 с L235A, G237A и с С-концевым scFv, полученным из цетуксимаба, (SEQ ID NO: 146). На **Фиг. 22 (H)** представлена таблица, обобщающая процентное улучшение в активности Vδ1 γδ Т-клеток в присутствии контролей, препаратов сравнения и тестируемых соединений в течение 5, 12 и 24 часов. Можно наблюдать усиление более чем на 300%, когда антитела или их фрагменты, как описано в данном документе, представлены в полиспецифическом формате.

В-третьих, на **Фиг. 22 (I и J)** показан пример альтернативного подхода к представлению данных. Конкретно показано процентное улучшение, обеспечиваемое полиспецифическим антителом E07 FS1-67 **(I)** или C08 FS1-67 **(J)**, при цитотоксичности эффекторных Vδ1+ клеток по отношению к EGFR+ клеткам по отношению к 24-часовой временной точке относительно всех составных частей и препаратов сравнения, как указано.

ПРИМЕР 21: Полиспецифические антитела вызывали усиление опосредованной Vδ1+ цитотоксичности и цитотоксичности, специфичной в отношении пораженных клеток; нацеливание на антиген, ассоциированный с заболеванием гемопоэтической ткани.

Анализы и исследования цитотоксичности/активности проводились в модельных системах, включающих тройную культуру Vδ1+ эффекторных клеток и раковых клеток Raji, и здоровых первичных моноцитов +/- полиспецифические антитела, включающие полиспецифические антитела к Vδ1 x TAA (CD19), для того, чтобы определить, могут ли моноклональные антитела к Vδ1, связанным с опухолеассоциированным антигеном (TAA), в биспецифическом формате усиливать уничтожение Vδ1γδ Т-клетками конкретных целевых клеток. В частности, клетки Raji (CD19++; ATCC) инкубировали с Vδ1 γδ Т-клетками в присутствии полиспецифических антител к Vδ1 x CD19. Все антитела разводили до 4 мкг/мл (конечная анализируемая концентрация 1 мкг/мл) и добавляли в 384-луночный планшет для визуализации (Perkin Elmer). Размноженные Vδ1γδ Т-клетки, полученные из кожи, отделяли от колб для тканевой культуры и серийно разводили, чтобы получить диапазон отношений эффектор к мишени (E:T). Клетки Raji окрашивали [0,5 мкМ] CellTrace Far Red перед смешиванием в соотношении 1:1 с оттитрованными Vδ1 γδ Т-клетками. Клеточные суспензии высевали в 384-луночные планшеты для анализа, чтобы получить конечную плотность посева клеток 1000 клеток Raji на лунку и диапазон γδ Т-клеток (максимальное соотношение E:T 30:1). Чтобы определить количество живых Raji через 24 часа, были получены конфокальные изображения с использованием платформы для одновременной многопараметрической визуализации Opera Phenix, фиксирующей девять полей зрения при 10-кратном

увеличении. Подсчет живых клеток определяли на основе размера, морфологии, микроструктуры, и интенсивности окрашивания живых клеток. Результаты представлены на **Фиг. 23**. Антитела и препараты сравнения, используемые в данном документе, являются такими, как указано. В частности, IgG к RSV=несвязывающий контроль мотавизумаба, G04=1245_P02_G04; E07= 1245_P01_E07; D1.3 VHVL=D1.3 HEL с C-концевым состоящим из тяжелых цепей scFv к CD19 (см. SEQ ID NO: 157 для используемого связывающего модуля scFv); G04 VHVL=1245_P02_G04 LAGA с C-концевым состоящим из тяжелых цепей scFv к CD19 (SEQ ID NO: 158); E07 VHVL=1245_P01_E07 LAGA с C-концевым состоящим из тяжелых цепей scFv к CD19 (SEQ ID NO: 159). **Фиг. 23 (A):** Таблица, обобщающая (i) расчетные значения EC50, представленные в виде числа γδ T-клеток или соотношения E:T, необходимые для индуцирования 50% уничтожения клеток Raji, и (ii) процентное улучшение значений EC50 по сравнению с контролем без мкАт.**Фиг. 23 (B):** Гистограмма, представляющая процентное улучшение способности γδ T-клеток лизировать 50% целевых клеток Raji в присутствии полиспецифических антител к Vδ1-CD19.

ПРИМЕР 24: Аффинность связывания биспецифического антитела к Vδ1-CD19 с Vδ1 человека и яванского макака

Аффинность связывания антител с мишенью (т.е. Vδ1-цепью γδ TCR, антигенами как человека, так и яванского макака) устанавливают с помощью анализа методом ППР с использованием прибора Reichert 4SPR (Reichert Technologies). Антитело наносят на сенсорный чип Planar Protein A (Reichert Technologies) для обеспечения увеличения по сравнению с базовым уровнем приблизительно на 500 uRIU. Через ячейку пропускали гетеродимер рекомбинантного Vδ1 человека или гетеродимер Vδ1 яванского макака. Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Эти данные демонстрируют, что биспецифическое антитело связывает Vδ1 как человека, так и яванского макака.

ПРИМЕР 25A: Биспецифические антитела к Vδ1-CD19 в анализах активации и цитотоксичности Vδ1 γδT-клеток.

Здоровые B-клетки выделяли из PBMC (Lonza) с использованием отрицательной магнитно-активированной сортировки клеток (MACS; MiltenyiBiotec). Определяли экспрессию CD19 на раковых клетках NALM-6 (ATCC), клетках Raji (ATCC) и здоровых выделенных B-клетках. Вкратце, клетки 5×10^4 инкубировали с антителами к CD19 (Biolegend) в течение 15 минут при 4°C перед промывкой и фиксацией. Экспрессию CD19 определяли с помощью проточной цитометрии (MACSQuant10, MiltenyiBiotec). Результаты показаны на **Фиг. 25A**.

Влияние биспецифических антител к CD19-Vδ1 на цитотоксичность в отношении $CD19^+$ целевых клеток и сохранение здоровых $CD19^+$ клеток определяли с помощью конфокальной визуализации с одновременным многопараметрическим анализом в Opera Phenix (Perkin Elmer). NALM-6, Raji и B-клетки окрашивали [0,5 мкМ] витальным красителем CellTrace CFSE в течение 20 минут. Биспецифические антитела и контроли серийно разводили в PBS перед добавлением в 384-луночные планшеты для анализа на

основе визуализации (Perkin Elmer). Размноженные Vδ1γδ Т-клетки, полученные из кожи, отделяли от колб для тканевой культуры и ресуспендировали в основной ростовой среде для выращивания перед смешиванием 1:1 либо с NALM-6, Raji, либо с В-клетками в суспензии. Клеточные суспензии высевали в 384-луночные планшеты для анализа, чтобы получить конечную плотность посева клеток 2000 NALM-6, Raji или В-клеток на лунку и 2000 Vδ1 γδ Т-клеток на лунку. Конечные анализируемые концентрации антител находились в диапазоне от 6,6 нМ до 66 пМ. Клетки совместно культивировали в течение 24 часов перед окрашиванием DRAQ7 (конечный результат 1:300, Abcam). Чтобы определить количество живых целевых клеток, были получены конфокальные изображения с использованием платформы для одновременной многопараметрической визуализации Opera Phenix, фиксирующей девять полей зрения при 10-кратном увеличении. Подсчет живых клеток определяли на основе размера, морфологии, микроструктуры и интенсивности окрашивания CFSE и отсутствия окрашивания DRAQ7. Результаты показаны на **Фиг. 25, B-E**.

Чтобы определить влияние биспецифических антител к CD19-Vδ1 на активацию и дегрануляцию Vδ1 γδ Т-клеток, количественно определяли снижение количества Vδ1 TCR и повышение количества CD107a в присутствии $CD19^+$ целевых клеток и здоровых $CD19^+$ клеток. Вкратце, антитела серийно разводили в PBS перед добавлением в 96-луночные планшеты с U-образным дном. NALM-6 и выделенные В-клетки окрашивали [0,5 мкМ] витальным красителем CellTrace CFSE в течение 20 минут. Полученные из кожи Vδ1 γδ Т-клетки отделяли от колб для культивирования и клеточные суспензии смешивали 0,5:1 с NALM-6 или В-клетками. Клеточные суспензии высевали в планшеты для анализа в количестве от 2,5×10^4 Vδ1 γδ Т-клеток на лунку до 5×10^4 NALM-6 или В-клеток на лунку. Конечные анализируемые концентрации антител находятся в диапазоне от 60 нМ до 3 пМ. Клетки инкубировали 4 часа при 37°C, 5% CO_2. Клетки промывали и окрашивали на мертвые клетки (eFlour 520, Invitrogen), поверхностную экспрессию Vδ1 TCR (MiltenyiBiotec) и aCD107a (Miltenyi) в течение 30 минут при 4°C. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD sciences) перед инкубацией в течение ночи при 4°C в темноте. Уровень экспрессии VD1 TCR измеряли с помощью проточной цитометрии на следующий день с использованием MACS Quant Analyzer 16. Результаты показаны на **Фиг. 25, F-K**.

Выводы: Биспецифические антитела к Vδ1-CD19 усиливают цитотоксичность, опосредованную γδТ-клетками, в отношении $CD19^+$ целевых клеток, не затрагивая при этом $CD19^+$ здоровые клетки.

Пример 38: Биспецифические антитела к Vδ1-CD19 селективно усиливают цитотоксический эффект Vδ1 γδТ-клеток на раковые клетки, не затрагивая при этом здоровые клетки

Влияние биспецифических антител к CD19-Vδ1 на цитотоксичность в отношении CD19+ целевых клеток и сохранение здоровых CD19+ клеток определяли с помощью конфокальной визуализации с одновременным многопараметрическим анализом в Opera

Phenix (Perkin Elmer). Здоровые B-клетки выделяли из PBMC (Lonza) с использованием отрицательной магнитно-активированной сортировки клеток (MACS; MiltenyiBiotec). Клетки Raji и здоровые первичные B-клетки окрашивали красителями CellTrace. Размноженные Vδ1γδ T-клетки, полученные из кожи, и αβT-клетки, совместимые с донором, удаляли из культуры, промывали и ресуспендировали в культуральной среде перед смешиванием 1:1 с клетками Raji и B-клетками. Биспецифические антитела и контроли серийно разводили в PBS перед добавлением в 384-луночные планшеты для анализа на основе визуализации (Perkin Elmer). Клеточные суспензии либо γδ T-клеток, клеток Raji и B-клеток, либо αβT-клеток, клеток Raji и B-клеток, либо Vδ1 γδ T-клеток, αβT-клеток, клеток Raji и B-клеток добавляли в 384-луночный планшет для анализа на основе визуализации для получения 2000 клеток каждого типа на лунку и конечных анализируемых концентраций антител в диапазоне от 6,6 нМ до 66 пМ. Чтобы определить количество живых целевых клеток, были получены конфокальные изображения с использованием платформы для одновременной многопараметрической визуализации Opera Phenix, фиксирующей девять полей зрения при 10-кратном увеличении. Подсчет живых клеток определяли на основе размера, морфологии, микроструктуры и интенсивности окрашивания CFSE через 24 часа. Результаты показаны на **Фиг. 38, A-F**.

Чтобы определить, приводит ли активация Vδ1 γδ T-клеток или αβT-клеток к повышенной продукции проонкогенного цитокина IL-17, супернатанты собирали с планшетов для визуализации после получения изображений через 24 часа. Супернатанты анализировали на U-Plex 10-plex Meso Scale Discovery (MSD) для количественного определения уровней IL-17A. Результаты показаны на **Фиг. 38, G-I**.

IL-17A (интерлейкин-17A) представляет собой проонкогенный цитокин, продуцируемый активированными T-клетками. IL-17A может усиливать рост опухоли и ослаблять противораковый иммунный ответ. Как показано на Фиг. 38, G-I, антитела к vδ1 не индуцируют секрецию IL-17A, тогда как антитела к CD3 индуцируют.

Выводы: Биспецифические антитела к Vδ1-CD19 усиливают цитотоксичность, опосредованную γδT-клетками, в отношении CD19+ целевых клеток, не затрагивая при этом CD19+ здоровые клетки. Напротив, биспецифические соединения к CD3xCD19 усиливали опосредованный как γδT-клетками, так и αβT-клетками лизис CD19+ целевых клеток, однако активация αβT-клеток также усиливала лизис здоровых первичных CD19+ B-клеток, а также секрецию проонкогенного цитокина IL-17A.

ПРИМЕР 26: Биспецифические антитела к Vδ1-Her2 в многопараметрических анализах связывания и цитотоксичности.

Экспрессию Her2 и Vδ1 определяли на клетках SK-BR-3 (Caltag-Medsystems Ltd), клетках BT-474 (ATCC), клетках MDA-MB-231-Luc (Creative Biogene Biotechnology) и Vδ1 γδT-клетках. Вкратце, клетки 5×10^4 инкубировали с антителами к Her2 и Vδ1 (MiltenyiBiotec) в течение 15 минут при 4°C перед промывкой и фиксацией. Экспрессию Her2 и Vδ1 определяли с помощью проточной цитометрии (MACSQuant10, MiltenyiBiotec). Результаты показаны на **Фиг. 26A и 26B**. Связывание биспецифических

антител к Her2-Vδ1 определяли путем инкубации целевых клеток с диапазоном концентраций антитела к Vδ1 или биспецифических антител к Vδ1 или с контролями (контроль IgG или трастузумаб) в течение 15 минут. После промывки клетки инкубировали еще 15 минут со вторичными антителами к IgG человека перед промывкой и фиксацией. Количество антител, связанных с каждым типом клеток, определяли с помощью проточной цитометрии. Результаты показаны на **Фиг. 26, C-F**.

Влияние биспецифических антител к Her2-Vδ1 на цитотоксичность в отношении $Her2^+/Her2^-$ целевых клеток определяли с помощью конфокальной визуализации с одновременным многопараметрическим анализом в Opera Phenix (Perkin Elmer). Вкратце, клетки SK-BR-3, BT-474 и MDA-MB-231 высевали в 384-луночные планшеты для визуализации (Perkin Elmer), чтобы получить конечную плотность посева 2000 целевых клеток на лунку перед инкубацией в течение ночи при 37°C, 5% CO_2. Антитела разводили в PBS и последовательно разводили 1:10 перед добавлением в планшеты для анализа, чтобы получить конечные анализируемые концентрации от 333 нМ до 0,33 пМ. Размноженные Vδ1γδ Т-клетки, полученные из кожи, отделяли от колб для тканевой культуры и повторно суспендировали в основной ростовой среде перед добавлением в планшет для анализа в количестве 2000 клеток на лунку при соотношении эффектор:мишень 1:1. Клетки совместно культивировали в течение 24 часов перед окрашиванием Hoechst (конечная 1:1000, Invitrogen) и DRAQ7 (конечная 1:300, Abcam). Чтобы определить количество живых целевых клеток, были получены конфокальные изображения с использованием платформы для одновременной многопараметрической визуализации Opera Phenix, фиксирующей девять полей зрения при 10-кратном увеличении. Подсчет живых клеток определяли на основе размера, морфологии, микроструктуры и интенсивности окрашивания живых клеток и отсутствия окрашивания DRAQ7. Результаты показаны на **Фиг. 26, G-J**.

Выводы: Биспецифические антитела к Vδ1-Her2 усиливают цитотоксичность, опосредованную γδТ-клетками, в отношении Her2+ целевых клеток, не затрагивая при этом Her2- клетки.

ПРИМЕР 27: Аффинность связывания биспецифического антитела к Vδ1-EGFR с антигеном Vδ1 человека и EGFR человека

Аффинность связывания антител с мишенью (т.е. Vδ1-цепью γδ TCR и EGFR) устанавливают с помощью анализа методом ППР с использованием прибора Reichert 4SPR (Reichert Technologies). Антитело (1,5 мкг/мл) наносят на сенсорный чип Planar Protein A (Reichert Technologies) для обеспечения увеличения по сравнению с базовым уровнем приблизительно на 500 uRIU. Гетеродимер рекомбинантного Vδ1 человека или EGFR человека пропускали через ячейку в концентрации 100 нМ со следующими параметрами: ассоциация 180 с, диссоциация 480 с, скорость потока 25 мкл/мин, рабочий буфер PBS+0,05% Твин 20. Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Результаты показаны на **Фиг. 27A и 27B**.

Выводы: эти данные демонстрируют, что биспецифические антитела к Vδ1/EGFR демонстрируют связывание с Vδ1 человека, которое сравнимо с их исходным моноспецифическим антителом, в дополнение к приобретению способности связывания EGFR человека.

ПРИМЕР 28: Связывание биспецифических антител к Vδ1-EGFR с целевыми клетками

EGFR-положительные A431 и Vδ1-положительные первичные γδT-клетки анализировали для определения специфичности и аффинности связывания биспецифического антитела к EGFR/Vδ1. Целевые клетки отделяли от колбы для тканевых культур, ресуспендировали в PBS и высевали при конечной плотности 100000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты с V-образным дном. Клетки подвергали центрифугированию, а клеточные осадки ресуспендировали в FcR-блокирующем реагенте в соответствии с инструкциями производителя и инкубировали в течение 20 минут при 4°C перед дальнейшей промывкой. Антитела разбавляли до 500 нМ в PBS и последовательно разводили 1:10 в PBS до 50 пМ и добавляли к клеткам с последующей 20-минутной инкубацией при 4°C. Для определения количества мкАт, связанного с клеточной поверхностью, клетки затем окрашивали конъюгированным с APC мышиным вторичным антителом к IgG человека (код продукта..., разведение: 1:100) в дополнение к красителю для оценки жизнеспособности клеток. После 20-минутной инкубации при 4°C клетки дважды промывали и измеряли флуоресценцию с использованием MACSQuant. Результаты показаны на **Фиг. 28, A-F**.

Выводы: Эти данные демонстрируют, что биспецифические антитела к Vδ1/EGFR демонстрируют связывание с Vδ1 γδT-клетками, которое сравнимо с их исходными моноспецифическими мкАт, в дополнение к приобретению связывания с EGFR-положительной линией клеток A431.

ПРИМЕР 29: Оценка активации γδ Т-клеток и цитотоксичности в отношении целевых клеток in vitro

Размноженные полученные из кожи Vδ1γδ Т-клетки и клетки A431 отделяли от колб для тканевой культуры, ресуспендировали в основной ростовой среде и высевали в 96-луночные планшеты при соответствующих разведениях клеток в зависимости от желаемого соотношения эффектор:мишень. МкАТ разводили и добавляли в каждую лунку в указанной концентрации. Затем культуры инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 4 **(D)** или 24 часов **(A-C, E)**. Для определения количества живых клеток клетки собирали и окрашивали красителем для оценки жизнеспособности в разведении 1:1000 в течение 20 минут. Для определения статуса по CD25 после сбора клеток поверхность клеток окрашивали антителом к CD25. Для измерения дегрануляции конъюгированное с флуорофором антитело к CD107α добавляли непосредственно в смесь клеток и антител в начале совместного культивирования. После двух промывок и фиксации клеток измеряли флуоресценцию с использованием MACSQuant, подсчитывали количество живых клеток и

определяли медианную интенсивность флуоресценции. Результаты показаны на **Фиг. 29, A-E**.

Выводы: эти данные демонстрируют, что биспецифические антитела к Vδ1/EGFR индуцируют активацию и дегрануляцию первичных Vδ1-положительных γδ Т-клеток, что приводит к усилению клеточно-опосредованного лизиса EGFR-положительной линии клеток A431.

ПРИМЕР 30: Антитело к vδ1 вызывает снижение количества CD3 на vδ1 клетках.

Были проведены исследования для изучения влияния стимуляции/активации vδ1 клеток антителами к vδ1 на снижение количества CD3 на vδ1 клетках. Это было проверено путем инкубации клона ADT1-4-2 к vδ1 с PBMC и последующего анализа TCR путем фенотипирования.

Криоконсервированные мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) были получены из коммерческих источников и высеяны в круглодонные 96-луночные планшеты для тканевых культур по 250000 клеток на лунку в 250 мкл полной среды (RPMI с добавлением 10% FCS, пенициллина/стрептомицина, заменимых аминокислот, пирувата натрия и HEPES) с 10 нг/мл IL15.Антитело к vδ1 ADT1-4-2 для титрования добавляли до конечной концентрации 1 мкг/мл (6,67 нМ), 0,01 мкг/мл (0,067 нМ) или 0,0001 мкг/мл (0,00067 нМ).Антитело IgG к RSV было включено в качестве контроля в соответствующей концентрации.Культуры инкубировали в течение 14 дней с пополнением среды и антител каждые 3 дня.Анализ методом проточной цитометрии проводили в конечной точке для определения фенотипа vδ1 клеток и экспрессии TCR для каждого из условий.Клетки сначала гейтировали по живым синглетам, а затем по пан-γδ (Miltenyi REA592; 130-113-508), который был исходным гейтом для vδ1 (Miltenyi REA173; 130-100-553), который сам по себе был исходным гейтом для CD3 (Miltenyi REA613; 130-113-142). Популяции клеток идентифицировали по положительному окрашиванию, а также определяли относительный уровень экспрессии каждого маркера между образцами по MFI.

На Фиг. 30A показана MFI vδ1 TCR при стимуляции антителами как показатель взаимодействия мкАт с мишенью.**На Фиг. 30B** показана MFI экспрессии CD3 на положительно гейтированных vδ1 клетках. Стимуляция клоном антитела к vδ1 ADT1-4-2 взаимодействовала с vδ1 клетками и привела к снижению количества как vδ1, так и CD3 на vδ1 клетках.

ПРИМЕР 31: Биспецифические антитела к Vδ1-FAPα усиливают активацию Vδ1 γδT-клеток и лизис FAPα+ фибробластов.

Кинетику связывания связывания антител к Vδ1, к FAPα и к Vδ1xFAPα с их мишенями (т.е. Vδ1-цепью γδ TCR и FAPα) определяют с помощью анализа методом ППР с использованием прибора Reichert 4SPR (Reichert Technologies). Антитело (1,5 мкг/мл) наносят на сенсорный чип Planar Protein A (Reichert Technologies) для обеспечения увеличения по сравнению с базовым уровнем приблизительно на 500 uRIU. Гетеродимер

рекомбинантного Vδ1 человека или FAPα человека пропускали через ячейку в концентрации 100 нМ со следующими параметрами: ассоциация 180 с, диссоциация 480 с, скорость потока 25 мкл/мин, рабочий буфер PBS+0,05% Твин 20. Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Результаты представлены на **Фиг. 31, А**.

Связывание биспецифических антител к Vδ1-FAPα определяли путем инкубации $FAP\alpha^+$ целевых клеток или $V\delta1^+$ эффекторных клеток с диапазоном концентраций антитела к Vδ1 или биспецифических антител к Vδ1 или контролей (контроль IgG или анти-FAPα) в течение 15 минут. После промывки клетки инкубировали еще 15 минут со вторичными антителами к Fc человека перед промывкой и фиксацией. Количество антител, связанных с каждым типом клеток, определяли с помощью проточной цитометрии. Результаты показаны на **Фиг. 31, B-C**.

Чтобы определить влияние биспецифических антител к Vδ1-FAPα на активацию и дегрануляцию Vδ1γδ Т-клеток, количественно определяли снижение количества Vδ1 TCR и повышение количества CD107a в присутствии $FAP\alpha^+$ целевых клеток. Вкратце, антитела к Vδ1, к FAPα и биспецифические антитела к Vδ1xFAPα серийно разводили в PBS перед добавлением в 96-луночные планшеты с U-образным дном. $FAP\alpha^+$ целевые клетки (фибробласты BJ или фибробласты кожи человека) окрашивали [0,5 мкМ] витальным красителем CellTrace CFSE в течение 20 минут. Полученные из кожи Vδ1 γδ Т-клетки отделяли от колб для культивирования и клеточные суспензии смешивали 1:1 с $FAP\alpha^+$ целевыми клетками или разводили 1:1 средой. Клеточные суспензии высевали в планшеты для анализа в количестве 2,5×10^4 Vδ1γδ Т-клеток на лунку в присутствии или в отсутствие 2,5×10^4 $FAP\alpha^+$ целевых клеток на лунку. Конечные анализируемые концентрации антител находятся в диапазоне от 200 нМ до 2 пМ. Клетки инкубировали в течение 4 часов при 37°C, 5% CO_2 перед промывкой и окрашиванием для обнаружения мертвых клеток (eFlour 520, Invitrogen), поверхностной экспрессии Vδ1 TCR (MiltenyiBiotec) и aCD107a (Miltenyi) в течение 30 минут при 4°C. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD sciences) перед инкубацией в течение ночи при 4°C в темноте. Уровень экспрессии VD1 TCR и CD107a, определенный по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), измеряли с помощью проточной цитометрии на следующий день с использованием MACS Quant Analyzer 16. Результаты показаны на **Фиг. 31 D-G**.

Умеренное снижение количества Vδ1 TCR наблюдается в отсутствие $FAP\alpha^+$ фибробластов (**Фиг. 31, D**). Однако в присутствии $FAP\alpha^+$ фибробластов биспецифические антитела к FAPα-Vδ1 значительно усиливают снижение количества TCR (**Фиг. 31, E**). Это демонстрирует, что эффект биспецифических антител к FAPα-Vδ1 на снижение количества Vδ1 TCR на Vδ1 γδT-клетках усиливается за счет связывания с опухолеспецифическим антигеном, таким как FAPα, на соседних клетках.

В присутствии биспецифических антител к Vδ1xFAPα и $FAP\alpha^+$ фибробластов количество CD107a (маркер дегрануляции) повышается на Vδ1 γδT-клетках по сравнению с моноклональным контролем (**Фиг. 31, G**), когда $FAP\alpha^+$ фибробласты не присутствуют

количество CD107a не повышается на Vδ1 γδT-клетках по сравнению с моноклональным контролем (**Фиг. 31, F**), это демонстрирует, что эффект биспецифических антител к FAPα-Vδ1 на повышение количества CD107a на Vδ1 γδ T-клетках специфичен, а биспецифические антитела к FAPα-Vδ1 усиливают дегрануляцию и активацию Vδ1 γδT-клеток в присутствии $FAP\alpha^+$ клеток.

Влияние биспецифических антител к FAPα-Vδ1 на цитотоксичность в отношении $FAP\alpha^+$ целевых клеток определяли с помощью конфокальной визуализации с одновременным многопараметрическим анализом в Opera Phenix (Perkin Elmer). $FAP\alpha^+$ целевые клетки (фибробласты BJ, фибробласты кожи человека) высевали в 384-луночные планшеты для визуализации (Perkin Elmer) и инкубировали в течение 24 часов. Биспецифические антитела и контроли серийно разводили в PBS перед добавлением в планшеты для анализа. Размноженные Vδ1γδ T-клетки, полученные из кожи, отделяли от колб для тканевой культуры и ресуспендировали в основной ростовой среде перед добавлением в планшеты для анализа при соотношении эффектор:мишень 1:1. Конечные анализируемые концентрации антител находились в диапазоне от 6,6 нМ до 66 фМ. Клетки совместно культивировали в течение 24 часов перед окрашиванием DRAQ7 (1:300 конечный, Abcam) и Hoechst (1:1000, Invitrogen). Чтобы определить количество живых целевых клеток, были получены конфокальные изображения с использованием платформы для одновременной многопараметрической визуализации Opera Phenix, фиксирующей девять полей зрения при 10-кратном увеличении. Подсчет живых клеток определяли на основе размера, морфологии, микроструктуры и интенсивности окрашивания Hoechst и отсутствия окрашивания DRAQ7. Результаты показаны на **Фиг. 31, H**. В присутствии биспецифических антител к FAPα-Vδ1 наблюдалось заметное увеличение цитотоксичности фибробластов по сравнению с контролями к Vδ1 и к FAPα (**Фиг. 31, H**). Это демонстрирует, что прямое связывание Vδ1 γδ T-клеток с целевыми клетками может специфически усиливать активацию и цитотоксический эффект Vδ1 γδ T-клеток.

Выводы: Биспецифические антитела к Vδ1-FAPα специфически связываются с $V\delta1^+$ γδ T-клетками и FAPα+ целевыми клетками, что приводит к усиленной активации Vδ1 γδ T-клеток в присутствии $FAP\alpha^+$ клеток, на что указывает повышенное снижение количества Vδ1 TCR, повышение количества CD107a, и лизис $FAP\alpha^+$ фибробластов.

ПРИМЕР 32: Биспецифические антитела к Vδ1-MSLN усиливают активацию Vδ1 γδT-клеток и лизис $MSLN^+$ целевых клеток.

Кинетику связывания антител к Vδ1, к MSLN (мезотелину) и к Vδ1xMSLN с их мишенями (т. е.Vδ1-цепью γδ TCR и MSLN) определяют с помощью анализа методом ППР с использованием прибора Reichert 4SPR (Reichert Technologies). Антитело (1,5 мкг/мл) наносят на сенсорный чип Planar Protein A (Reichert Technologies) для обеспечения увеличения по сравнению с базовым уровнем приблизительно на 500 uRIU. Гетеродимер рекомбинантного Vδ1 человека или MSLN человека пропускали через ячейку в максимальной концентрации 100 нМ со следующими параметрами: ассоциация 180 с,

диссоциация 480 с, скорость потока 25 мкл/мин, рабочий буфер PBS+0,05% Твин 20. Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Результаты представлены на **Фиг. 32, А**.

Связывание биспецифических антител к MSLN-Vδ1 определяли путем инкубации $MSLN^+$ целевых клеток или $V\delta1^+$ эффекторных клеток с диапазоном концентраций антитела к Vδ1 или биспецифических антител к Vδ1 или контролей (контроль IgG или анти-MSLN) в течение 15 минут. После промывки клетки инкубировали еще 15 минут со вторичными антителами к IgG человека перед промывкой и фиксацией. Количество антител, связанных с каждым типом клеток, определяли с помощью проточной цитометрии. Результаты показаны на **Фиг. 32, B-C**.

Чтобы определить влияние биспецифических антител к MSLN-Vδ1 на активацию и дегрануляцию Vδ1 γδ Т-клеток, количественно определяли снижение количества Vδ1 TCR и повышение количества CD107a в присутствии $MSLN^+$ целевых клеток. Вкратце, антитела к Vδ1, к MSLN и биспецифические антитела к Vδ1xMSLN серийно разводили в PBS перед добавлением в 96-луночные планшеты с U-образным дном. $MSLN^+$ целевые клетки (OVCAR-3 или HeLa) окрашивали [0,5 мкМ] витальным красителем CellTrace CFSE в течение 20 минут. Полученные из кожи Vδ1 γδ Т-клетки отделяли от колб для культивирования и клеточные суспензии смешивали 1:1 с $MSLN^+$ целевыми клетками или разводили 1:1 средой. Клеточные суспензии высевали в планшеты для анализа в количестве 2,5×10^4 Vδ1γδ Т-клеток на лунку в присутствии или в отсутствие 2,5×10^4 $MSLN^+$ целевых клеток на лунку. Конечные анализируемые концентрации антител находятся в диапазоне от 200 нМ до 2 пМ. Клетки инкубировали в течение 4 часов при 37°C, 5% CO_2 перед промывкой и окрашиванием для выявления мертвых клеток (eFlour 520, Invitrogen), поверхностной экспрессии Vδ1 TCR (MiltenyiBiotec) и aCD107a (Miltenyi) в течение 30 минут при 4oC. Клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в Cell Fix (BD sciences) перед инкубацией в течение ночи при 4°C в темноте. Уровень экспрессии VD1 TCR и CD107a, определенный по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), измеряли с помощью проточной цитометрии на следующий день с использованием MACS Quant Analyzer 16. Результаты показаны на **Фиг. 32 D-G**.

Умеренное снижение количества Vδ1 TCR наблюдается в отсутствие $MSLN^+$ целевых клеток (**Фиг. 32, D**). Однако в присутствии $MSLN^+$ клеток OVCAR-3 биспецифические антитела к MSLN-Vδ1 значительно усиливают снижение количества TCR (**Фиг. 32, E**). Это демонстрирует, что эффект биспецифических антител к MSLN-Vδ1 на снижение количества Vδ1 TCR на Vδ1 γδ Т-клетках усиливается за счет связывания с опухолеспецифическим антигеном, таким как MSLN, на соседних клетках.

В присутствии биспецифических антител к Vδ1xMSLN и $MSLN^+$ клеток OVCAR-3 количество CD107a (маркер дегрануляции) повышается на Vδ1 γδT-клетках по сравнению с моноклональным контролем (**Фиг. 32, G**), когда $MSLN^+$ клетки OVCAR-3 не присутствуют количество CD107a не повышается на Vδ1 γδT-клетках по сравнению с моноклональным контролем (**Фиг. 32, F**), это демонстрирует, что эффект

биспецифических антител к MSLN-Vδ1 на повышение количества CD107a на Vδ1 γδ Т-клетках специфичен, а биспецифические антитела к MSLN-Vδ1 усиливают дегрануляцию и активацию Vδ1 γδТ-клеток в присутствии $MSLN^+$ клеток.

Влияние биспецифических антител к MSLN-Vδ1 на цитотоксичность в отношении $MSLN^+$ целевых клеток определяли с помощью конфокальной визуализации с одновременным многопараметрическим анализом в Opera Phenix (Perkin Elmer). $MSLN^+$ целевые клетки (HeLa или OVCAR-2) высевали в 384-луночные планшеты для визуализации (Perkin Elmer) и инкубировали в течение 24 часов. Биспецифические антитела и контроли серийно разводили в PBS перед добавлением в планшеты для анализа. Размноженные Vδ1γδ Т-клетки, полученные из кожи, отделяли от колб для тканевой культуры и ресуспендировали в основной ростовой среде перед добавлением в планшеты для анализа при соотношении эффектор:мишень 1:1. Конечные анализируемые концентрации антител находились в диапазоне от 6,6 нМ до 66 фМ. Клетки совместно культивировали в течение 24 часов перед окрашиванием DRAQ7 (1:300 конечный, Abcam) и Hoechst (1:1000, Invitrogen). Чтобы определить количество живых целевых клеток, были получены конфокальные изображения с использованием платформы для одновременной многопараметрической визуализации Opera Phenix, фиксирующей девять полей зрения при 10-кратном увеличении. Подсчет живых клеток определяли на основе размера, морфологии, микроструктуры и интенсивности окрашивания Hoechst и отсутствия окрашивания DRAQ7. Результаты показаны на **Фиг. 32, Н**. В присутствии биспецифических антител к MSLN-Vδ1 наблюдалось заметное увеличение цитотоксичности в отношении целевых клеток по сравнению с контрольными антителами к Vδ1 и к MSLN (**Фиг. 32, Н**). Это демонстрирует, что прямое связывание Vδ1 γδ Т-клеток с целевыми клетками может специфически усиливать активацию и цитотоксический эффект Vδ1 γδ Т-клеток.

Выводы: Биспецифические антитела к Vδ1xMSLN специфически связываются с $Vδ1^+$ γδ Т-клетками и $MSLN^+$ целевыми клетками, что приводит к усиленной активации Vδ1 γδТ-клеток в присутствии $MSLN^+$ клеток, на что указывает повышенное снижение количества Vδ1 TCR, повышение количества CD107a и лизис $MSLN^+$ целевых клеток.

ПРИМЕР 33: Биспецифические антитела к Vδ1-PD-1 усиливают активацию Vδ1 γδТ-клеток и блокируют ингибирование контрольной точки PD-1/PD-L1

Кинетику связывания антител к Vδ1, к PD-1 и к Vδ1xPD-1 для (т. Е. Vδ1-цепи γδ TCR и PD-1) определяют с помощью анализа методом ППР с использованием прибора Reichert 4SPR (Reichert Technologies). Антитело (1,5 мкг/мл) наносят на сенсорный чип Planar Protein A (Reichert Technologies) для обеспечения увеличения по сравнению с базовым уровнем приблизительно на 500 uRIU. Гетеродимер рекомбинантного Vδ1 человека или PD-1 человека пропускали через ячейку при максимальной концентрации 100 нМ. Результаты приведены на **Фиг. 33 А**.

Для оценки двойного связывания биспецифических антител с обоими целевыми лигандами рекомбинантный PD-1 сначала иммобилизовали на сенсорном чипе на основе

карбоксиметилдекстрана (Reichert Technologies) в концентрации 10 мкг/мл, а затем пропускали через чип биспецифические антитела в концентрации 100 нМ. Способность впоследствии связываться с TCR Vδ1γδ затем оценивали пропусканием гетеродимера рекомбинантного Vδ1 человека при концентрации 100 нМ. Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Результаты показаны на **Фиг. 33 B.**

Связывание биспецифических антител к Vδ1xPD-1 с Vδ1 γδ Т-клетками и PD-1$^+$ иммунными клетками оценивали с помощью проточной цитометрии. Первоначально CD4 и CD8 Т-клетки были отрицательно отобраны с помощью магнитной сортировки из лейкоцитарных пленок с PBMC, выделенных из цельной крови. После активации антителами к CD3/CD28, конъюгированными с Dynabead (Invitrogen), экспрессия PD-1 на клеточной поверхности была обнаружена на CD4 и CD8 Т-клетках. Активированные Т-клетки и Vδ1 γδ Т-клетки инкубировали с рядом концентраций биспецифических антител к Vδ1xPD-1 или контролей (контроль IgG или анти-PD-1) в течение 15 минут. После промывки клетки инкубировали еще 15 минут со вторичными антителами к IgG человека перед промывкой и фиксацией. Количество антител, связанных с каждым типом клеток, определяли с помощью проточной цитометрии. Результаты показаны на **Фиг. 33 C, D**.

Для определения влияния биспецифических антител к Vδ1xPD-1 на активацию Vδ1γδ Т-клеток было количественно определено снижение количества Vδ1 TCR в присутствии PD-1$^+$ Т-клеток. Вкратце, антитела к Vδ1, к PD-1 и биспецифические антитела к Vδ1xPD-1 серийно разводили в PBS перед добавлением в планшеты для анализа. PD-1$^+$ Т-клетки окрашивали витальным красителем CellTrace CFSE и смешивали 1:1 с Vδ1 γδ Т-клетками, полученными из кожи, или разводили средой 1:1. Клеточные суспензии высевали в планшеты для анализа в количестве 2,5×10^4 Vδ1γδ Т-клеток на лунку в присутствии или в отсутствие 2,5×10^4 PD-1$^+$ Т-клеток на лунку. Конечные анализируемые концентрации антител находятся в диапазоне от 200 нМ до 2 пМ. Клетки инкубировали в течение 4 часов при 37°C, 5% CO_2 перед промывкой и окрашиванием для выявления мертвых клеток (eFlour 520, Invitrogen) и Vδ1 TCR (MiltenyiBiotec). Клетки промывали и ресуспендировали в Cell Fix (BD sciences). Уровень экспрессии VD1 TCR определяли по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), измеренной с помощью проточной цитометрии с использованием MACS Quant Analyzer 16. Результаты представлены на **Фиг. 33 E, F.**

Чтобы оценить влияние биспецифических антител к Vδ1xPD-1 на активацию PD-1$^+$ Т-клеток, клеток PD-1$^+$ NFAT Jurkat (Promega, JA2191) инкубировали с биспецифическими антителами к Vδ1xPD-1 или контролями (моноклональное антитело к PD-1 или IgG к RSV x анти-PD-1) в течение 5 часов при 37°C, 5% CO_2. Анализ проводили в присутствии или в отсутствие рекомбинантного белка Vδ1, предварительно нанесенного в количестве 1 мкг на лунку в непрозрачные белые 96-луночные планшеты. Через 5 часов к клеткам добавляли реагент Bio-Glo Luciferase (Promega) в соотношении 1:1. После инкубации в течение 5 минут при комнатной температуре сигнал люминесценции регистрировали на планшет-ридере BioTek Synergy. Необработанный люминесцентный

сигнал был преобразован в кратные относительные единицы люминесценции (RLU). Результаты показаны на **Фиг. 33 G**.

Выводы: биспецифические антитела к Vδ1xPD-1 усиливают активацию Vδ1 γδ Т-клеток, например, путем перекрестного связывания через PD-1$^+$ CD4 или CD8 Т-клетки, а также блокируя ингибирование иммунных контрольных точек PD-1/PD-L1 в CD4 или CD8 Т-клетках.

ПРИМЕР 34: Биспецифические антитела к Vδ1-4-1BB усиливают активацию Vδ1 γδТ-клеток и CD8 Т-клеток

Кинетику связывания антител к Vδ1, к 4-1BB и к Vδ1×4-1BB с их мишенями (т.е. Vδ1-цепью γδ TCR и 4-1BB) определяют с помощью анализа метода ППР с использованием прибора Reichert 4SPR (Reichert Technologies). Антитело (1,5 мкг/мл) наносят на сенсорный чип Planar Protein A (Reichert Technologies) для обеспечения увеличения по сравнению с базовым уровнем приблизительно на 500 uRIU. Гетеродимер рекомбинантного Vδ1 человека или 4-1BB человека пропускали через ячейку при максимальной концентрации 100 нМ. Результаты приведены на **Фиг. 34A**.

Для оценки двойного связывания биспецифических антител с обоими целевыми лигандами рекомбинантный 4-1BB сначала иммобилизовали на сенсорном чипе на основе карбоксиметилдекстрана (Reichert Technologies) в концентрации 10 мкг/мл, а затем пропускали через чип биспецифические антитела в концентрации 100 нМ. Способность впоследствии связываться с TCR Vδ1γδ затем оценивали пропусканием гетеродимера рекомбинантного Vδ1 человека при концентрации 100 нМ. Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Результаты приведены на **Фиг. 34 B.**

Связывание биспецифических антител к Vδ1×4-1BB с Vδ1 γδ Т-клетками и 4-1BB$^+$ иммунными клетками оценивали с помощью проточной цитометрии. Первоначально CD8$^+$ Т-клетки были отрицательно отобраны с помощью магнитной сортировки из лейкоцитарных пленок с PBMC, выделенных из цельной крови. После активации антителами к CD3/CD28, конъюгированными с Dynabead (Invitrogen), экспрессия 4-1BB повышалась на поверхности CD8 Т-клеток. Активированные 4-1BB$^+$ CD8 Т-клетки и Vδ1 γδ Т-клетки инкубировали с рядом концентраций биспецифических антител у Vδ1×4-1BB или контролей (контроль IgG или анти-4-1BB) в течение 15 минут. После промывки клетки инкубировали еще 15 минут со вторичными антителами к IgG человека перед промывкой и фиксацией. Количество антител, связанных с каждым типом клеток, определяли с помощью проточной цитометрии. Результаты показаны на **Фиг. 34 C, D**.

Чтобы определить влияние биспецифических антител к Vδ1×4-1BB на активацию Vδ1 γδ Т-клеток, было количественно определено снижение количества Vδ1 TCR в присутствии 4-1BB$^+$ Т-клеток. Вкратце, антитела к Vδ1, к 4-1BB и биспецифические антитела к Vδ1×4-1BB серийно разводили в PBS перед добавлением в планшеты для анализа. 4-1BB$^+$ CD8 Т-клетки окрашивали витальным красителем CellTrace CFSE и смешивали 1:1 с Vδ1 γδ Т-клетками, полученными из кожи, или разводили 1:1 средой. Клеточные суспензии клеток высевали в планшеты для анализа в количестве 2,5×10^4

Vδ1γδ Т-клеток на лунку в присутствии или в отсутствие 2,5×10^4 4-1BB$^+$ CD8 Т-клеток на лунку. Конечные анализируемые концентрации антител находятся в диапазоне от 200 нМ до 2 пМ. Клетки инкубировали в течение 4 часов при 37°C, 5% CO_2 перед промывкой и окрашиванием для выявления мертвых клеток (eFlour 520, Invitrogen) и Vδ1 TCR (MiltenyiBiotec). Клетки промывали и ресуспендировали в Cell Fix (BD sciences). Уровень экспрессии VD1 TCR определяли по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), измеренной с помощью проточной цитометрии с использованием MACS Quant Analyzer 16. Результаты представлены на **Фиг. 34, E, F.**

Для оценки влияния биспецифических антител к Vδ1×4-1BB на активацию 4-1BB$^+$ Т-клеток клетки 4-1BB$^+$ NFAT Jurkat (Promega, JA2191) инкубировали с биспецифическими антителами к Vδ1×4-1BB или контролями (моноклональные антитела к 4-1BB или IgG к RSV x 4-1BB) в течение 5 часов при 37°C, 5% CO_2. Анализ проводили в присутствии или в отсутствие рекомбинантного белка Vδ1, предварительно нанесенного в количестве 1 мкг на лунку в непрозрачные белые 96-луночные планшеты. Через 5 часов к клеткам добавляли реагент Bio-Glo Luciferase (Promega) в соотношении 1:1. После инкубации в течение 5 минут при комнатной температуре сигнал люминесценции регистрировали на планшет-ридере BioTek Synergy. Необработанный люминесцентный сигнал был преобразован в кратные относительные единицы люминесценции (RLU). Результаты приведены на **Фиг. 34, G**.

Выводы: биспецифические антитела к Vδ1×4-1BB усиливают активацию Vδ1 γδ Т-клеток, например, путем перекрестного связывания с 4-1BB$^+$ CD8 Т-клетками, а также активируют 4-1BB$^+$ Т-клетки.

ПРИМЕР 35: Биспецифические антитела к Vδ1-OX40 усиливают активацию Vδ1 γδT-клеток и CD4 Т-клеток

Кинетику связывания антител к Vδ1, к OX40 и к Vδ1xOX40 с их мишенями (т.е. Vδ1-цепью γδ TCR и OX40) определяют с помощью анализа метода ППР с использованием прибора Reichert 4SPR (Reichert Technologies). Антитело (1,5 мкг/мл) наносят на сенсорный чип Planar Protein A (Reichert Technologies) для обеспечения увеличения по сравнению с базовым уровнем приблизительно на 500 uRIU. Гетеродимер рекомбинантного Vδ1 человека или OX40 человека пропускали через ячейку при максимальной концентрации 100 нМ. Результаты представлены на **Фиг. 35, A.**

Для оценки двойного связывания биспецифических антител с обоими целевыми лигандами рекомбинантный OX40 сначала иммобилизовали на сенсорном чипе на основе карбоксиметилдекстрана (Reichert Technologies) в концентрации 10 мкг/мл, а затем пропускали через чип биспецифические антитела в концентрации 100 нМ. Способность впоследствии связываться с TCR Vδ1γδ затем оценивали пропусканием гетеродимера рекомбинантного Vδ1 человека при концентрации 100 нМ. Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Результаты приведены на **Фиг. 35, B.**

Связывание биспецифических антител к Vδ1xOX40 с Vδ1 γδ Т-клетками и OX40$^+$ иммунными клетками оценивали с помощью проточной цитометрии. Первоначально CD4$^+$

Т-клетки были отрицательно отобраны с помощью магнитной сортировки из лейкоцитарных пленок с PBMC, выделенных из цельной крови. После активации антителами к CD3/CD28, конъюгированными с Dynabead (Invitrogen), экспрессия OX40 повышалась на поверхности CD4 Т-клеток. Активированные $OX40^+$ CD4 Т-клетки и Vδ1 γδ Т-клетки инкубировали с рядом концентраций биспецифических антител к Vδ1xOX40 или контролей (контроль IgG или анти-OX40) в течение 15 минут. После промывки клетки инкубировали еще 15 минут со вторичными антителами к IgG человека перед промывкой и фиксацией. Количество антител, связанных с каждым типом клеток, определяли с помощью проточной цитометрии. Результаты представлены на **Фиг. 35, C, D.**

Чтобы определить влияние биспецифических антител к Vδ1xOX40 на активацию Vδ1 γδ Т-клеток, было количественно определено снижение количества Vδ1 TCR в присутствии $OX40^+$ Т-клеток. Вкратце, антитела к Vδ1, к OX40 и биспецифические антитела к Vδ1xOX40 серийно разводили в PBS перед добавлением в планшеты для анализа. $OX40^+$ CD4 Т-клетки окрашивали витальным красителем CellTrace CFSE и смешивали 1:1 с Vδ1 γδ Т-клетками кожи, полученными из кожи, или разводили средой 1:1. Клеточные суспензии клеток высевали в планшеты для анализа в количестве 2,5×10^4 Vδ1γδ Т-клеток на лунку в присутствии или в отсутствие 2,5×10^4 $OX40^+$ CD4 Т-клеток на лунку. Конечные анализируемые концентрации антител находятся в диапазоне от 200 нМ до 2 пМ. Клетки инкубировали в течение 4 часов при 37°C, 5% CO_2 перед промывкой и окрашиванием для выявления мертвых клеток (eFlour 520, Invitrogen) и Vδ1 TCR (MiltenyiBiotec). Клетки промывали и ресуспендировали в Cell Fix (BD sciences). Уровень экспрессии VD1 TCR определяли по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), измеренной с помощью проточной цитометрии с использованием MACS Quant Analyzer 16. Результаты представлены на **Фиг. 35, E, F.**

Чтобы оценить влияние биспецифических антител к Vδ1xOX40 на активацию $OX40^+$ Т-клеток, клетки $OX40^+$ NFAT Jurkat (Promega, JA2191) инкубировали с биспецифическими антителами к Vδ1xOX40 или контролями (OX40L (лиганд OX40), анти-OX40 или IgG к RSV x анти-OX40) в течение 5 часов при 37°C, 5% CO_2. Анализ проводили в присутствии или в отсутствие рекомбинантного белка Vδ1, предварительно нанесенного в количестве 1 мкг на лунку в непрозрачные белые 96-луночные планшеты. Через 5 часов к клеткам добавляли реагент Bio-Glo Luciferase (Promega) в соотношении 1:1. После инкубации в течение 5 минут при комнатной температуре сигнал люминесценции регистрировали на планшет-ридере BioTek Synergy. Необработанный люминесцентный сигнал был преобразован в кратные относительные единицы люминесценции (RLU). Результаты приведены на **Фиг. 35, G**.

Выводы: биспецифические антитела к Vδ1xOX40 усиливают активацию Vδ1 γδ Т-клеток, например, путем перекрестного связывания с $OX40^+$ CD4 Т-клетками, а также активируют $OX40^+$ Т-клетки.

ПРИМЕР 36: Биспецифические антитела к Vδ1-TIGIT усиливают активацию Vδ1 γδT-клеток и блокируют ингибирование контрольной точки TIGIT/PVR(CD155)

Кинетику связывания антител к Vδ1, к TIGIT и к Vδ1xTIGIT с их мишенями (т. е.Vδ1-цепью γδ TCR и TIGIT) определяют с помощью анализа методом ППР с использованием прибора Reichert 4SPR (Reichert Technologies). Антитело (1,5 мкг/мл) наносят на сенсорный чип Planar Protein A (Reichert Technologies) для обеспечения увеличения по сравнению с базовым уровнем приблизительно на 500 uRIU. Гетеродимер рекомбинантного Vδ1 человека или TIGIT человека пропускали через ячейку при максимальной концентрации 100 нМ. Результаты представлены на **Фиг. 36, А**.

Для оценки двойного связывания биспецифических антител с обоими целевыми лигандами рекомбинантный TIGIT сначала иммобилизовали на сенсорном чипе на основе карбоксиметилдекстрана (Reichert Technologies) в концентрации 10 мкг/мл, а затем пропускали через чип биспецифические антитела в концентрации 100 нМ. Способность впоследствии связываться с TCR Vδ1γδ затем оценивали пропусканием гетеродимера рекомбинантного Vδ1 человека при концентрации 100 нМ. Все эксперименты проводили при комнатной температуре. Результаты приведены на **Фиг. 36, В**.

Связывание биспецифических антител к Vδ1xTIGIT с Vδ1 γδ Т-клетками и $TIGIT^+$ иммунными клетками оценивали с помощью проточной цитометрии. Первоначально CD4 и CD8 Т-клетки были отрицательно отобраны с помощью магнитной сортировки из лейкоцитарных пленок с PBMC, выделенных из цельной крови. После активации антителами к CD3/CD28, конъюгированными с Dynabead (Invitrogen), экспрессия 4-1BB на клеточной поверхности была обнаружена на CD4 и CD8 Т-клетках. Активированные Т-клетки и Vδ1γδ Т-клетки инкубировали с рядом концентраций биспецифических антител к Vδ1×4-1BB или контролей (контроль IgG или анти-4-1BB) в течение 15 минут. После промывки клетки инкубировали еще 15 минут со вторичными антителами к IgG человека перед промывкой и фиксацией. Количество антител, связанных с каждым типом клеток, определяли с помощью проточной цитометрии. Результаты представлены на **Фиг. 36, С, D.**

Чтобы определить влияние биспецифических антител к Vδ1xTIGIT на активацию Vδ1γδ Т-клеток было количественно определено снижение количества TCR Vδ1 в присутствии $TIGIT^+$ Т-клеток. Вкратце, антитела к Vδ1, к TIGIT и биспецифические антитела к Vδ1xTIGIT серийно разводили в PBS перед добавлением в планшеты для анализа. $TIGIT^+$ CD8 Т-клетки окрашивали витальным красителем CellTrace CFSE и смешивали 1:1 с Vδ1 γδ Т-клетками, полученным из кожи, или разводили 1:1 средой. Клеточные суспензии клеток высевали в планшеты для анализа в количестве 2,5×10^4 Vδ1γδ Т-клеток на лунку в присутствии или в отсутствие 2,5×10^4 $TIGIT^+$ CD8 Т-клеток на лунку. Конечные анализируемые концентрации антител находятся в диапазоне от 200 нМ до 2 пМ. Клетки инкубировали в течение 4 часов при 37°C, 5% CO_2 перед промывкой и окрашиванием для выявления мертвых клеток (eFlour 520, Invitrogen) и Vδ1 TCR (MiltenyiBiotec). Клетки промывали и ресуспендировали в Cell Fix (BD sciences). Уровень экспрессии VD1 TCR определяли по медианной интенсивности флуоресценции (MFI),

измеренной с помощью проточной цитометрии с использованием MACS Quant Analyzer 16. Результаты представлены на **Фиг. 36, E, F.**

Для оценки влияния биспецифических антител к Vδ1xTIGIT на активацию $TIGIT^+$ Т-клеток клетки $TIGIT^+$ NFAT Jurkat (Promega, JA2191) инкубировали с биспецифическими антителами к Vδ1xTIGIT или контролями (моноклональное антитело к TIGIT или IgG к RSV x анти-TIGIT) в течение 5 часов при 37°C, 5% CO_2. Анализ проводили в присутствии или в отсутствие рекомбинантного белка Vδ1, предварительно нанесенного в количестве 1 мкг на лунку в непрозрачные белые 96-луночные планшеты. Через 5 часов к клеткам добавляли реагент Bio-Glo Luciferase (Promega) в соотношении 1:1. После инкубации в течение 5 минут при комнатной температуре сигнал люминесценции регистрировали на планшет-ридере BioTek Synergy. Необработанный люминесцентный сигнал был преобразован в кратные относительные единицы люминесценции (RLU). Результаты показаны на **Фиг. 36, G.**

Выводы: биспецифические антитела к Vδ1xTIGIT усиливают активацию Vδ1 γδ Т-клеток за счет перекрестного связывания через $TIGIT^+$ CD8 Т-клетки, а также блокируют ингибирование иммунных контрольных точек TIGIT/CD155 в CD8 Т-клетках.

ПРИМЕР 37: Антитела к vδ1 не индуцируют ADCC.

Биолюминесцентный репортерный анализ ADCC (Promega) использовали для оценки уровня ADCC (антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности), индуцированного антителами к vδ1, по сравнению с контрольными антителами.

ADCC относится к биологическому явлению, при котором эффекторные клетки убивают целевые клетки, помеченные антителами. Эффекторные клетки связываются с антителами через свои Fcγ-рецепторы и впоследствии убивают целевую клетку. Представленный в данном документе биолюминесцентный репортерный анализ ADCC позволяет выявить потенциальные механизмы действия ADCC для антител, которые тестируются в рамках анализа, путем обнаружения ранней инициации ADCC через активацию транскрипции генов по пути NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток). Репортерный анализ представляет собой сконструированную систему, в которой используются эффекторные клетки (Jurkat), которые экспрессируют высокоаффинный рецептор FcγRIIIa, связанный с путем NFAT, который дополнительно сконструирован для того, чтобы после его активации индуцировать дальнейшую активацию фермента люциферазы светлячка. Активность люциферазы количественно оценивают по данным люминесценции, которые могут коррелировать с имеющимися уровнями ADCC.

Этот анализ был использован для того, чтобы понять, будут ли антитела к Vδ1 или, в частности, плечо к Vδ1 полиспецифических антител стимулировать реакцию ADCC. Используемые целевые клетки представляли собой γδ клетки, которые связываются с антителом к vδ1 через vδ1 γδ TCR. Если функционирует механизм действия ADCC, антитело к vδ1 будет связываться с Fcγрецепторами на анализируемых эффекторных клетках и генерировать люминесцентный сигнал; если сигнал не генерируется, это предполагает, что ADCC не развивается.

Для этого анализа использовали набор ADCC Reporter Bioassay Kit (Promega). Один флакон аналитического буфера Bio-Glo Luciferase Assay Buffer был размморожен и его содержимое было перенесено во флакон с субстратом. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 4-6 часов. Планшет для разбавления готовили с концентрациями антител (при 3-кратной концентрации) в диапазоне от 10 нМ до 0,01 нМ (конечная концентрация) для следующих антител: антитело к vδ1 по настоящему изобретению, такое же антитело к vδ1, но с нефункциональным Fc (L235A, G237A), ритуксимаб, RSV и OKT3. Целевые клетки (γδ клетки) высевали в 2 планшета для анализа по 25 мкл на лунку. Затем 25 мкл раствора соответствующего антитела из планшета для разбавления антител переносили в соответствующую лунку. Эффекторные клетки (сконструированные клетки Jurkat) оттаивали в теплом буфере для анализа, ресуспендировали в 4 мл буфера для анализа и пипеткой вносили 25 мкл раствора эффекторных клеток в каждую лунку. Затем планшеты инкубировали при 37°C в течение 4,5 часов. После периода инкубации планшетам давали уравновеситься до комнатной температуры, после чего в каждую лунку добавляли 75 мкл реагента Bio-Glo Luciferase Assay и инкубировали планшеты в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем планшеты считывали с помощью планшет-ридера Biotek H4, который регистрировал сигналы люминесценции (в относительных световых единицах RLU) с планшетов. Кратность индукции рассчитывали по следующему уравнению: кратность индукции=RLU (индуцированный сигнал - фоновый уровень)/RLU (контроль без антител - фоновый уровень).

В качестве положительного контроля использовали OKT3 (антитело к CD3). В качестве дополнительного положительного контроля вместо γδ клеток в контрольные лунки высевали клетки Raji. Клетки Raji представляют собой стандартную линию клеток, используемую для демонстрации сильной реакции ADCC при использовании с антителом к CD20, ритуксимабом. В качестве внутреннего контроля и для того, чтобы понять, вызывают ли антитела к vδ1 ADCC в отсутствие связывания vδ1 на γδ клетках, использовали антитела к vδ1 по настоящему изобретению и те же антитела к vδ1, но с нефункциональным Fc, L235A, G237A) также добавляли только к эффекторным клеткам .

Результаты приведены на **Фиг. 37.**

Выводы: Сильная реакция ADCC была показана в положительном контроле с использованием ритуксимаба с клетками Raji, и еще более сильная реакция ADCC была продемонстрирована с OKT3 против γδ клеток. Напротив, реакции ADCC не было обнаружено ни в одном из условий с использованием антител к vδ1 по настоящему изобретению, тех же антител к vδ1, но также нефункциональным Fc L235A, G237A или RSV-отрицательного контроля. Это свидетельствует о том, что в данной системе антитела по данному изобретению, которые связываются с vδ1, (такие как мкАт к vδ1 или полиспецифические антитела к vδ1) не демонстрируют механизм действия ADCC. Примечательно, что даже антитела к Vδ1 с функциональным Fc не истощают γδ Т-клетки, что обеспечивает возможность сохранения функции Fc в представленных в данном документе антителах к Vδ1, добавляя функциональность, например, в опухолевом

окружении с высоким содержанием Fcγ. Это дополнительно подчеркивает пригодность таких антител к Vδ1 для включения в форматы биспецифических антител, как описано в данном документе.

Соответственно, функциональные свойства антител, когда они предоставлены в моноспецифическом формате, являются общими для полиспецифических антител по изобретению, которые дополнительно специфически связываются со вторым антигеном.

Варианты осуществления изобретения

Настоящее изобретение включает по меньшей мере следующие пронумерованные варианты осуществления:

1. Полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые специфически связывают:

a. первый целевой эпитоп, где первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп V-области вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR); и

b. второй целевой эпитоп.

2. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по варианту осуществления 1, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело.

3. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что второй целевой эпитоп не является эпитопом V-области вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR).

4. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что второй целевой эпитоп не является эпитопом Т-клеточного рецептора (TCR).

5. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп в V-области Vδ1-цепи γδ TCR.

6. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп в пределах аминокислотных остатков 1-90 SEQ ID NO: 1 и/или SEQ ID NO: 128.

7. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп, содержащий один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей:

(i) 3-20 SEQ ID NO: 1; и/или

(ii) 37-77 SEQ ID NO: 1.

8. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп содержит по

меньшей мере один из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 SEQ ID NO: 1.

9. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

10. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 SEQ ID NO: 1.

11. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 5-20 и 62-77 SEQ ID NO: 1.

12. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в аминокислотной области 50-64 SEQ ID NO: 1.

13. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 37-53 и 59-77 SEQ ID NO: 1.

14. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп не является эпитопом, обнаруженным в CDR3 Vδ1-цепи γδ TCR.

15. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп не является эпитопом в аминокислотной области 91-105 (CDR3) SEQ ID NO: 272.

16. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп представляет собой активирующий эпитоп γδ Т-клетки.

17. Полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что связывание активирующего эпитопа: (i) снижает количество γδ TCR; (ii) активирует дегрануляцию γδ Т-клеток; и/или (iii) способствует опосредованному γδ Т-клетками уничтожению.

18. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп, который повышает экспрессию CD107a, CD25, CD69 и/или Ki67.

19. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его

фрагмент связывают первый эпитоп с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, менее чем $1,5\times10^{-7}$ М.

20. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его фрагмент связывают первый эпитоп с KD менее $1,3\times10^{-7}$ М или менее, например, менее $1,0\times10^{-7}$ М, в частности менее 5,0 x 10^{-8} М.

21. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его фрагмент имеют значение EC50 для снижения количества γδ TCR при связывании, которое составляет менее 0,5 мкг/мл.

22. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его фрагмент имеют значение EC50 для снижения количества γδ TCR при связывании, которое составляет менее 0,06 мкг/мл.

23. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его фрагмент имеют значение EC50 для дегрануляции γδ Т-клеток при связывании, которое составляет менее 0,05 мкг/мл.

24. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его фрагмент имеют значение EC50 для дегрануляции γδ Т-клеток при связывании, которое составляет менее 0,005 мкг/мл, например, менее 0,002 мкг/мл.

25. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что значение EC50 дегрануляции γδ Т-клеток измеряют путем определения экспрессии CD107a.

26. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его фрагмент имеют значение EC50 для опосредованного γδ Т-клетками уничтожения при связывании, которое составляет менее 0,5 мкг/мл.

27. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его фрагмент имеют значение EC50 для опосредованного γδ Т-клетками уничтожения при связывании, которое составляет менее 0,055 мкг/мл, например, менее 0,020 мкг/мл.

28. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его фрагмент имеют значение EC50 для снижения количества γδ TCR при связывании, которое составляет менее 0,5 мкг/мл; значение EC50 для дегрануляции γδ Т-клеток при связывании составляет менее 0,05 мкг/мл; и/или значение EC50 для опосредованного γδ Т-клетками уничтожения при связывании, которое составляет менее 0,5 мкг/мл.

29. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 21-28, отличающееся тем, что значение EC50 измеряют с помощью проточной цитометрии.

30. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что второй эпитоп представляет собой белок клеточной поверхности.

31. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что второй эпитоп находится на Vδ1+ Т-клетке.

32. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-30, отличающиеся тем, что второй эпитоп не находится на Vδ1+ Т-клетке.

33. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что второй эпитоп находится на иммунной клетке.

34. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что второй эпитоп представляет собой эпитоп ракового антигена или ассоциированного с раком антигена.

35. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по варианту осуществления 34, отличающиеся тем, что раковый антиген или ассоциированный с раком антиген представляет собой опухолеассоциированный антиген (TAA).

36. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по варианту осуществления 35, отличающиеся тем, что раковый антиген или ассоциированный с раком антиген представляет собой антиген, выбранный из группы, состоящей из AFP, AKAP-4, ALK, альфа-фетопротеина, андрогенового рецептора, B7H3, BAGE, BCA225, BCAA, Bcr-abl, бета-катенина, бета-HCG, человеческого хорионического гонадотропина бета, BORIS, BTAA, CA 125, CA 15-3, CA 195, CA 19-9, CA 242, CA 27.29, CA 72-4, CA-50, CAM 17.1, CAM43, карбоангидразы IX, карциноэмбрионального антигена, CD22, CD33/IL3Ra, CD68\P1, CDK4, CEA, хондроитинсульфатного протеогликана 4 (CSPG4), c-Met, CO-029, CSPG4, циклина B1, ассоциированного с циклофилином C белка, CYP1B1, E2A-PRL, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EpCAM, EphA2, EphrinB2, антигена вируса Эпштейна-Барра EBVA, ERG (слитого гена TMPRSS2ETS), ETV6-AML, FAP, FGF-5, Fos-родственного антигена 1, фукозил GM1, G250, Ga733\EpCAM, GAGE-1, GAGE-2, GD2, GD3, ассоциированного с глиомой антигена, GloboH, гликолипида F77, GM3, GP 100, GP 100 (Pmel 17), H4-RET, HER-2/neu, HER-2/Neu/ErbB-2, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена (HMW-MAA), HPV E6, HPV E7, hTERT, HTgp-175, обратной транскриптазы теломеразы человека, идиотипа, рецептора IGF-I, IGF-II, IGH-IGK, фактора роста инсулина (IGF)-I, кишечной карбоксиэстеразы, K-ras, LAGE-1a, LCK, лектин-реактивного AFP, легумаина, LMP2, M344, MA-50, Mac-2-связывающего белка, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-

4, MAGE-5, MAGE-6, MART-1, MART-1/MelanA, M-CSF, связанного с меланомой хондроитинсульфат протеогликана (MCSP), мезотелина, MG7-Ag, ML-IAP, MN-CA IX, MOV18, MUC1, Mum-1, hsp70-2, MYCN, MYL-RAR, NA17, NB/70K, нейрон-глиального антигена 2 (NG2), нейтрофильной эластазы, nm-23H1, NuMa, NY-BR-1, NY-CO-1, NY-ESO, NY-ESO-1, NY-ESO-1, OY-TES1, p15, p16, p180erbB3, p185erbB2, p53, мутанта p53, Page4, PAX3, PAX5, PDGFR-бета, PLAC1, полисиаловой кислоты, опухолевого антигена-1 карциномы предстательной железы (PCTA-1), простатспецифического антигена, простатической кислой фосфатазы (PAP), протеиназы-3 (PR1), PSA, PSCA, PSMA, RAGE-1, Ras, Ras-мутанта, RCAS1, RGS5, RhoC, ROR1, RU1, RU2 (AS), SART3, SDCCAG16, sLe(a), белка спермы 17, SSX2, STn, сурвивина, TA-90, TAAL6, a TAG-72, теломеразы, тиреоглобулина, Tie 2, TLP, Tn, TPS, TRP-1, TRP-2, TRP-2, TSP-180, тирозиназы, VEGF, VEGFR2, VISTA, WT1, XAGE 1, 43-9F, 5T4, и 791Tgp72.

37. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело в виде привлекающего Т-клетки активатора.

38. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой эпитоп CD19, Her2 (CD340), EGFR, FAPα или мезотелина (MSLN).

39. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой эпитоп CD19.

40. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-37, отличающиеся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой эпитоп Her2 (CD340).

41. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-37, отличающиеся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой эпитоп EGFR.

42. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-37, отличающееся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой эпитоп FAPα.

43. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-37, отличающиеся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой эпитоп мезотелина (MSLN).

44. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-33, отличающиеся тем, что второй эпитоп представляет собой эпитоп иммуномодулирующего антигена.

45. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по варианту осуществления 44, отличающиеся тем, что иммуномодулирующий антиген может быть выбран из группы, состоящей из B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-DC (CD273), B7-H1 (CD274), B7-H2 (CD275), B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), B7-H5 (VISTA), BTLA (CD272), 4-1BB (CD137), CD137L, CD24, CD27, CD28, CD38, CD40, CD40L (CD154), CD54, CD59, CD70, CTLA4 (CD152), CXCL9, GITR (CD357), HVEM (CD270), ICAM-1 (CD54), ICOS (CD278), LAG-3 (CD223), OX40 (CD134), OX40L (CD252), PD-1 (CD279), PD-L1 (CD274), TIGIT, CD314, CD334, CD335, CD337, и TIM-3 (CD366).

46. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по варианту осуществления 44 или 45, отличающиеся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой молекулу стимулирующей иммунной контрольной точки.

47. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по варианту осуществления 44 или 45, отличающиеся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой молекулу ингибирующей иммунной контрольной точки.

48. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по варианту осуществления 44 или 45, отличающиеся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой эпитоп PD-1, 4-1BB (CD137), OX40 или TIGIT.

49. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по варианту осуществления 44 или 45, отличающиеся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой эпитоп PD-1.

50. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по варианту осуществления 44 или 45, отличающиеся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой эпитоп 4-1BB (CD137).

51. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по варианту осуществления 44 или 45, отличающиеся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой эпитоп OX40.

52. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по варианту осуществления 44 или 45, отличающиеся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой эпитоп TIGIT.

53. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп антигена кластера дифференцировки CD.

54. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по варианту осуществления 53, отличающиеся тем, что антиген CD выбран из группы, состоящей из CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16a, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32A, CD32B, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42,

CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64a, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79A, CD79B, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85A, CD85B, CD85C, CD85D, CD85F, CD85G, CD85H, CD85I, CD85J, CD85K, CD85M, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140A, CD140B, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158, CD158A, CD158B1, CD158B2, CD158C, CD158D, CD158E1, CD158E2, CD158F1, CD158F2, CD158G, CD158H, CD158I, CD158J, CD158K, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD167b, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD187, CD188, CD189, CD190, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CDw199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CDw210a, CDw210b, CD211, CD212, CD213a1, CD213a2, CD214, CD215, CD216, CD217, CD218a, CD218b, CD219, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD237, CD238, CD239, CD240CE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD250, CD251, CD252, CD253, CD254, CD255, CD256, CD257, CD258, CD259, CD260, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD285, CD286, CD287, CD288, CD289, CD290, CD291, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300A, CD300C, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD308, CD309, CD310, CD311, CD312, CD313, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD323, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD330, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD344, CD349, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD360, CD361, CD362, CD363, CD364, CD365, CD366, CD367, CD368, CD369, CD370, и CD371.

55. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его фрагмент представляют собой полиспецифическое антитело, выбранное из группы, состоящей из CrossMab, DAF (два в одном), DAF (четыре в одном), DutaMab, DT-IgG,

«выступы-во-впадины» (KIH), «выступы-во-впадины» (общую легкую цепь), зарядовой пары, обмена Fab-плечами, SEEDbody, Triomab, LUZ-Y, Fcab, κλ-тела, ортогонального Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L, H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody, DVI-IgG (четыре в одном), наноантитела, наноантитела-HAS, BiTE, диатела, DART, TandAb, одноцепочечного диатела, одноцепочечного диатела-CH3, диатела-CH3, тройного тела, форматов Моррисона, миниантитела, минитела, минитела TriBi, scFv-CH3 KIH, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')2, F(ab)2-scFv2, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, тетравалентного HCAb, одноцепочечного диатела-Fc, диатела-Fc, тандемного scFv-Fc, интраантитела, DOCK-AND-LOCK, ImmTAC, HSA-тела, одноцепочечного диатела-HAS, тандемного scFv-токсина, IgG-IgG, ov-X-тела, DuoBody, mab^2 и scFv1-PEG-scFv2.

56. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его фрагмент представляют собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

57. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его фрагмент представляют собой конъюгат биспецифического антитела (такой как IgG2, scFv, тандемный scFv, $F(ab')_2$, биспецифическое антитело KiH, биспецифическое антитело в формате Моррисона (IgG-HC-scFv), диатело, триантитело, минитело или полноразмерное биспецифическое антитело.

58. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело имеет размер более чем около 70 кДа.

59. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой полиспецифическое антитело IgA, IgD, IgE, IgG, IgM или IgY.

60. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой полиспецифическое антитело IgG, например, при этом полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой полиспецифическое антитело IgG1.

61. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное полиспецифическое антитело.

62. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело имеет функциональный Fc.

63. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело характеризуется тем, что оно:

a. вызывает снижение количества TCR на Vδ1 Т-клетках;

b. не проявляет CDC или ADCC; и

c. не истощает Vδ1 Т-клетки.

64. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело вызывает истощение менее около 30%, или менее около 20%, или менее около 10% жизнеспособной популяции Vδ1 Т+ клеток посредством ADCC и/или CDC.

65. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело не индуцирует секрецию IL-17A.

66. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело индуцирует менее около 30%, или менее около 20%, или менее около 10% секреции IL-17A, индуцированной эквивалентными полиспецифическими антителами к CD3.

67. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, которые содержат одно или более из:

CDR3, содержащей последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25;

CDR2, содержащей последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37 и SEQ ID NO: 160-171; и/или

CDR1, содержащей последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-61.

68. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по варианту осуществления 67, которое содержит:

HCDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13;

HCDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37;

HCDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-49;

LCDR3, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25;

LCDR2, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 160-171; и/или

LCDR1, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 50-61.

69. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по варианту осуществления 67, которые содержат:

HCDR3, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 2-13;

HCDR2, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 26-37;

HCDR1, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 38-49;

LCDR3, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 14-25;

LCDR2, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 160-171; и/или

LCDR1, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 50-61.

70. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, которые содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-85.

71. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, которые содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73.

72. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, которые содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73.

73. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, которые содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 96% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73.

74. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, которые содержат область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85.

75. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, которые содержат область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85.

76. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, которые содержат область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 96% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85.

77. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 62-73, и область VL, содержащую

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 74-85.

78. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 62-73, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 96% идентичности с любой из SEQ ID NO: 74-85.

79. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому предшествующему варианту осуществления, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 62-73, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 74-85.

80. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая полиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом предыдущем варианте осуществления.

81. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность, как определено в варианте осуществления 80.

82. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотидную последовательность, как определено в варианте осуществления 80, или вектор экспрессии, как определено в варианте осуществления 81.

83. Клетка-хозяин по варианту осуществления 82, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой рекомбинантную клетку-хозяин.

84. Клетка-хозяин по варианту осуществления 82 или варианту осуществления 83, содержащая первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность антитела или фрагмента антитела, которая специфически связывается с первым эпитопом, и вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность антитела или фрагмента антитела, которая специфически связывается со вторым эпитопом.

85. Клетка-хозяин по варианту осуществления 82 или варианту осуществления 83, содержащая первый вектор экспрессии, содержащий первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность антитела или фрагмента антитела, которая специфически связывается с первым эпитопом, и второй вектор экспрессии, содержащий вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность антитела или фрагмента антитела, которая специфически связывается со вторым эпитопом.

86. Клетка-хозяин по варианту осуществления 82 или варианту осуществления 83, содержащая вектор экспрессии, содержащий первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность антитела или фрагмента антитела, которая специфически связывается с первым эпитопом, и вторую полинуклеотидную

последовательность, кодирующую последовательность антитела или фрагмента антитела, которая специфически связывается со вторым эпитопом.

87. Способ получения любого полиспецифического антитела или его фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-79, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из вариантов осуществления 82-86 в среде для культивирования клеток.

88. Способ по варианту осуществления 87, дополнительно включающий выделение полиспецифического антитела или его фрагмента из культуральной среды.

89. Способ получения рекомбинантного полиспецифического антитела по любому предшествующему варианту осуществления, включающий стадии

a. выбора первого моноспецифического антитела, которое специфически связывается с первым целевым эпитопом, причем первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп V-области вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR);

b. объединения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента указанного первого антитела с антителом или его фрагментом, содержащим связывающий домен, нацеленный на второй эпитоп, с получением рекомбинантного полиспецифического антитела.

90. Способ по варианту осуществления 89, отличающийся тем, что первое моноспецифическое антитело связывается с эпитопом, как определено в любом из вариантов осуществления 5-18.

91. Способ по варианту осуществления 89 или варианту осуществления 90, отличающийся тем, что первое моноспецифическое антитело связывается с TRDV1 с KD, как определено в любом из вариантов осуществления 19-20, и/или при этом первое моноспецифическое антитело имеет EC50, как определено в любом из вариантов осуществления 21-29.

92. Способ по любому из вариантов осуществления 89-91, отличающийся тем, что первое моноспецифическое антитело содержит последовательность, как определено в любом из пп. 67-79.

93. Способ по любому из вариантов осуществления 89-91, отличающийся тем, что антитело или его фрагмент, содержащие связывающий домен, нацеленный на второй эпитоп, нацелены на эпитоп, как определено в любом из вариантов осуществления 34-55.

94. Способ по варианту осуществления 89, отличающийся тем, что рекомбинантное полиспецифическое антитело представляет собой полиспецифическое антитело, как определено в любом из пп. 1-79.

95. Способ по любому из вариантов осуществления 89-94, отличающийся тем, что рекомбинантное полиспецифическое антитело придает повышенную опосредованную гамма-дельта-Т-клетками цитотоксичность по отношению к пораженной клетке, экспрессирующей второй эпитоп, по сравнению с цитотоксичностью, придаваемой эквивалентным количеством указанного первого моноспецифического антитела.

96. Полиспецифическое антитело или его фрагмент, полученный или получаемый в соответствии со способом по любому из вариантов осуществления 89-95.

97. Композиция, содержащая полиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов осуществления 1-79 или 96.

98. Фармацевтическая композиция, содержащая полиспецифическое антитело или его фрагмент, как определено в любом из вариантов осуществления 1-79 или 96, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

99. Набор, содержащий полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-79 или 96, или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 98.

100. Набор по варианту осуществления 99, дополнительно содержащий дополнительный терапевтически активный агент.

101. Набор по варианту осуществления 99 или варианту осуществления 100, дополнительно содержащий инструкции по применению.

102. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-79 или 961, или фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления 98.

103. Способ по варианту осуществления 102, отличающийся тем, что заболевание или нарушение представляет собой злокачественное новообразование, инфекционное заболевание или воспалительное заболевание.

104. Способ по любому из вариантов осуществления 102-103, дополнительно включающий введение второго агента субъекту одновременно или последовательно в любом порядке.

105. Способ модулирования иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-79 или 96, или фармацевтической композиции по варианту осуществления 98.

106. Способ по варианту осуществления 105, отличающийся тем, что субъект имеет злокачественное новообразование, инфекционное заболевание или воспалительное заболевание.

107. Способ по варианту осуществления 105 или варианту осуществления 106, отличающийся тем, что модулирование иммунного ответа у субъекта включает по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из активации γδ Т-клеток, инициирования или увеличения пролиферации γδ Т-клеток, инициирования или увеличения экспансии γδ Т-клеток, инициирования или увеличения дегрануляции γδ Т-клеток, инициирования или увеличения активности γδ Т-лимфоцитов, инициирования или увеличения цитотоксичности γδ Т, инициирования или увеличения мобилизации γδ Т-клеток, повышения выживаемости γδ Т-клеток и повышения устойчивости к истощению γδ Т-клеток.

108. Способ по любому из вариантов осуществления 102-107, отличающийся тем, что пораженные клетки уничтожают, при этом сохраняют здоровые клетки.

109. Фрагмент полиспецифического антитела по любому из вариантов осуществления 1-79 или 96, или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 98, или набор по любому из вариантов осуществления 99-101 для применения в медицине.

110. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-79-96, или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 98, или набор по любому из вариантов осуществления 99-101 для применения при лечении злокачественного новообразования, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

111. Применение полиспецифического антитела или его фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-79 или 96 в производстве лекарственного препарата.

112. Применение полиспецифического антитела или его фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-79 или 96 в производстве лекарственного препарата для лечения злокачественного новообразования, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полиспецифическое антитело или его фрагмент, которые специфически связывают:

a. первый целевой эпитоп, где первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп V-области вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1 - англ.: variable delta 1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR - англ.: T cell receptor); и

b. второй целевой эпитоп.

2. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп в пределах аминокислотных остатков 1-90 SEQ ID NO: 1 и/или SEQ ID NO: 128.

3. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп, содержащий один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей:

(i) 3-20 SEQ ID NO: 1; и/или

(ii) 37-77 SEQ ID NO: 1.

4. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп представляет собой активирующий эпитоп γδ Т-клетки.

5. Полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что связывание активирующего эпитопа: (i) снижает количество γδ TCR; (ii) активирует дегрануляцию γδ Т-клеток; и/или (iii) способствует опосредованному γδ Т-клетками уничтожению.

6. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп, который повышает экспрессию CD107a, CD25, CD69 и/или Ki67.

7. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его фрагмент связывает первый эпитоп с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, менее $1,5\times10^{-7}$ М, менее $1,3\times10^{-7}$ М, менее 1,0 х 10^{-7} М или менее 5,0 х 10^{-8} М.

8. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что второй эпитоп находится на Vδ1+ Т-клетке.

9. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что второй эпитоп представляет собой эпитоп ракового антигена или ассоциированного с раком антигена.

10. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по п. 9, отличающиеся тем, что раковый антиген или ассоциированный с раком антиген представляет собой антиген, выбранный из группы, состоящей из AFP, AKAP-4, ALK, альфа-фетопротеина, андрогенового рецептора, B7H3, BAGE, BCA225, BCAA, Bcr-abl, бета-катенина, бета-

HCG, человеческого хорионического гонадотропина бета, BORIS, BTAA, CA 125, CA 15-3, CA 195, CA 19-9, CA 242, CA 27.29, CA 72-4, CA-50, CAM 17.1, CAM43, карбоангидразы IX, карциноэмбрионального антигена, CD22, CD33/IL3Ra, CD68\P1, CDK4, CEA, хондроитинсульфатного протеогликана 4 (CSPG4), c-Met, CO-029, CSPG4, циклина B1, ассоциированного с циклофилином C белка, CYP1B1, E2A-PRL, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EpCAM, EphA2, EphrinB2, антигена вируса Эпштейна-Барра EBVA, ERG (слитого гена TMPRSS2ETS), ETV6-AML, FAP, FGF-5, Fos-родственного антигена 1, фукозил GM1, G250, Ga733\EpCAM, GAGE-1, GAGE-2, GD2, GD3, ассоциированного с глиомой антигена, GloboH, гликолипида F77, GM3, GP 100, GP 100 (Pmel 17), H4-RET, HER-2/neu, HER-2/Neu/ErbB-2, высокомолекулярного ассоциированного с меланомой антигена (HMW-MAA), HPV E6, HPV E7, hTERT, HTgp-175, обратной транскриптазы теломеразы человека, идиотипа, рецептора IGF-I, IGF-II, IGH-IGK, фактора роста инсулина (IGF)-I, кишечной карбоксиэстеразы, K-ras, LAGE-1a, LCK, лектин-реактивного AFP, легумаина, LMP2, M344, MA-50, Mac-2-связывающего белка, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE, MAGE A1, MAGE A3, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, MART-1, MART-1/MelanA, M-CSF, связанного с меланомой хондроитинсульфат протеогликана (MCSP), мезотелина, MG7-Ag, ML-IAP, MN-CA IX, MOV18, MUC1, Mum-1, hsp70-2, MYCN, MYL-RAR, NA17, NB/70K, нейрон-глиального антигена 2 (NG2), нейтрофильной эластазы, nm-23H1, NuMa, NY-BR-1, NY-CO-1, NY-ESO, NY-ESO-1, NY-ESO-1, OY-TES1, p15, p16, p180erbB3, p185erbB2, p53, мутанта p53, Page4, PAX3, PAX5, PDGFR-бета, PLAC1, полисиаловой кислоты, опухолевого антигена-1 карциномы предстательной железы (PCTA-1), простатспецифического антигена, простатической кислой фосфатазы (PAP), протеиназы-3 (PR1), PSA, PSCA, PSMA, RAGE-1, Ras, Ras-мутанта, RCAS1, RGS5, RhoC, ROR1, RU1, RU2 (AS), SART3, SDCCAG16, sLe(a), белка спермы 17, SSX2, STn, сурвивина, TA-90, TAAL6, a TAG-72, теломеразы, тиреоглобулина, Tie 2, TLP, Tn, TPS, TRP-1, TRP-2, TRP-2, TSP-180, тирозиназы, VEGF, VEGFR2, VISTA, WT1, XAGE 1, 43-9F, 5T4, и 791Tgp72.

11. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело в виде привлекающего Т-клетки активатора.

12. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой эпитоп CD19, Her2 (CD340), EGFR, FAPα или мезотелина.

13. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что второй эпитоп находится на иммунной клетке.

14. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-8 или п. 13, отличающиеся тем, что второй эпитоп представляет собой эпитоп иммуномодулирующего антигена.

15. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по п. 14, отличающиеся тем, что иммуномодулирующий антиген может быть выбран из группы, состоящей из B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-DC (CD273), B7-H1 (CD274), B7-H2 (CD275), B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), B7-H5 (VISTA), BTLA (CD272), 4-1BB (CD137), CD137L, CD24, CD27, CD28, CD38, CD40, CD40L (CD154), CD54, CD59, CD70, CTLA4 (CD152), CXCL9, GITR (CD357), HVEM (CD270), ICAM-1 (CD54), ICOS (CD278), LAG-3 (CD223), OX40 (CD134), OX40L (CD252), PD-1 (CD279), PD-L1 (CD274), TIGIT, CD314, CD334, CD335, CD337, и TIM-3 (CD366).

16. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-8 или 13-15, отличающиеся тем, что антитело представляет собой биспецифическое антитело, а второй эпитоп представляет собой эпитоп PD-1, 4-1BB, OX40 или TIGIT.

17. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что второй целевой эпитоп представляет собой эпитоп антигена кластера дифференцировки CD.

18. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по п. 17, отличающиеся тем, что антиген CD выбран из группы, состоящей из CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16a, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32A, CD32B, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64a, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79A, CD79B, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85A, CD85B, CD85C, CD85D, CD85F, CD85G, CD85H, CD85I, CD85J, CD85K, CD85M, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140A, CD140B, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158, CD158A, CD158B1, CD158B2, CD158C, CD158D, CD158E1, CD158E2, CD158F1, CD158F2, CD158G, CD158H, CD158I, CD158J, CD158K, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD167b, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a,

CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD187, CD188, CD189, CD190, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CDw199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CDw210a, CDw210b, CD211, CD212, CD213a1, CD213a2, CD214, CD215, CD216, CD217, CD218a, CD218b, CD219, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD237, CD238, CD239, CD240CE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD250, CD251, CD252, CD253, CD254, CD255, CD256, CD257, CD258, CD259, CD260, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD285, CD286, CD287, CD288, CD289, CD290, CD291, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300A, CD300C, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD308, CD309, CD310, CD311, CD312, CD313, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD323, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD330, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD344, CD349, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD360, CD361, CD362, CD363, CD364, CD365, CD366, CD367, CD368, CD369, CD370, и CD371.

19. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его фрагмент представляют собой полиспецифическое антитело, выбранное из группы, состоящей из CrossMab, DAF (два в одном), DAF (четыре в одном), DutaMab, DT-IgG, «выступы-во-впадины» (KIH), «выступы-во-впадины» (общую легкую цепь), зарядовой пары, обмена Fab-плечами, SEEDbody, Triomab, LUZ-Y, Fcab, κλ-тела, ортогонального Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L, H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody, DVI-IgG (четыре в одном), наноантитела, наноантитела-HAS, BiTE, диатела, DART, TandAb, одноцепочечного диатела, одноцепочечного диатела-CH3, диатела-CH3, тройного тела, форматов Моррисона, миниантитела, минитела, минитела TriBi, scFv-CH3 KIH, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')2, F(ab)2-scFv2, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, тетравалентного HCAb, одноцепочечного диатела-Fc, диатела-Fc, тандемного scFv-Fc, интраантитела, DOCK-AND-LOCK, ImmTAC, HSA-тела, одноцепочечного диатела-HAS, тандемного scFv-токсина, IgG-IgG, ov-X-тела, DuoBody, mab^2 и scFv1-PEG-scFv2.

20. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его фрагмент представляют собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

21. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент представляют собой полиспецифическое антитело IgG, например, необязательно при этом полиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой полиспецифическое антитело IgG1.

22. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело имеет функциональный Fc.

23. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело характеризуется тем, что оно:

a. вызывает снижение количества TCR на Vδ1 Т-клетках;

b. не проявляет CDC или ADCC; и

c. не истощает Vδ1 Т-клетки.

24. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что полиспецифическое антитело вызывает истощение менее около 30%, или менее около 20%, или менее около 10% жизнеспособной популяции Vδ1 Т+ клеток посредством ADCC и/или CDC.

25. Способ получения рекомбинантного полиспецифического антитела по любому из предшествующих пунктов, включающий стадии

a. выбора первого моноспецифического антитела, которое специфически связывается с первым целевым эпитопом, причем первый целевой эпитоп представляет собой эпитоп V-области вариабельного домена дельта-цепи 1 (Vδ1) γδ Т-клеточного рецептора (TCR);

b. объединения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента указанного первого антитела с антителом или его фрагментом, содержащим связывающий домен, нацеленный на второй эпитоп, с получением рекомбинантного полиспецифического антитела, необязательно при этом рекомбинантное полиспецифическое антитело представляет собой полиспецифическое антитело, как определено в любом один из пп. 1-24.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-24 и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

27. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта или способ модулирования иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту полиспецифического антитела или его фрагмента по любому из пп. 1-24, или фармацевтической композиции по п. 26.

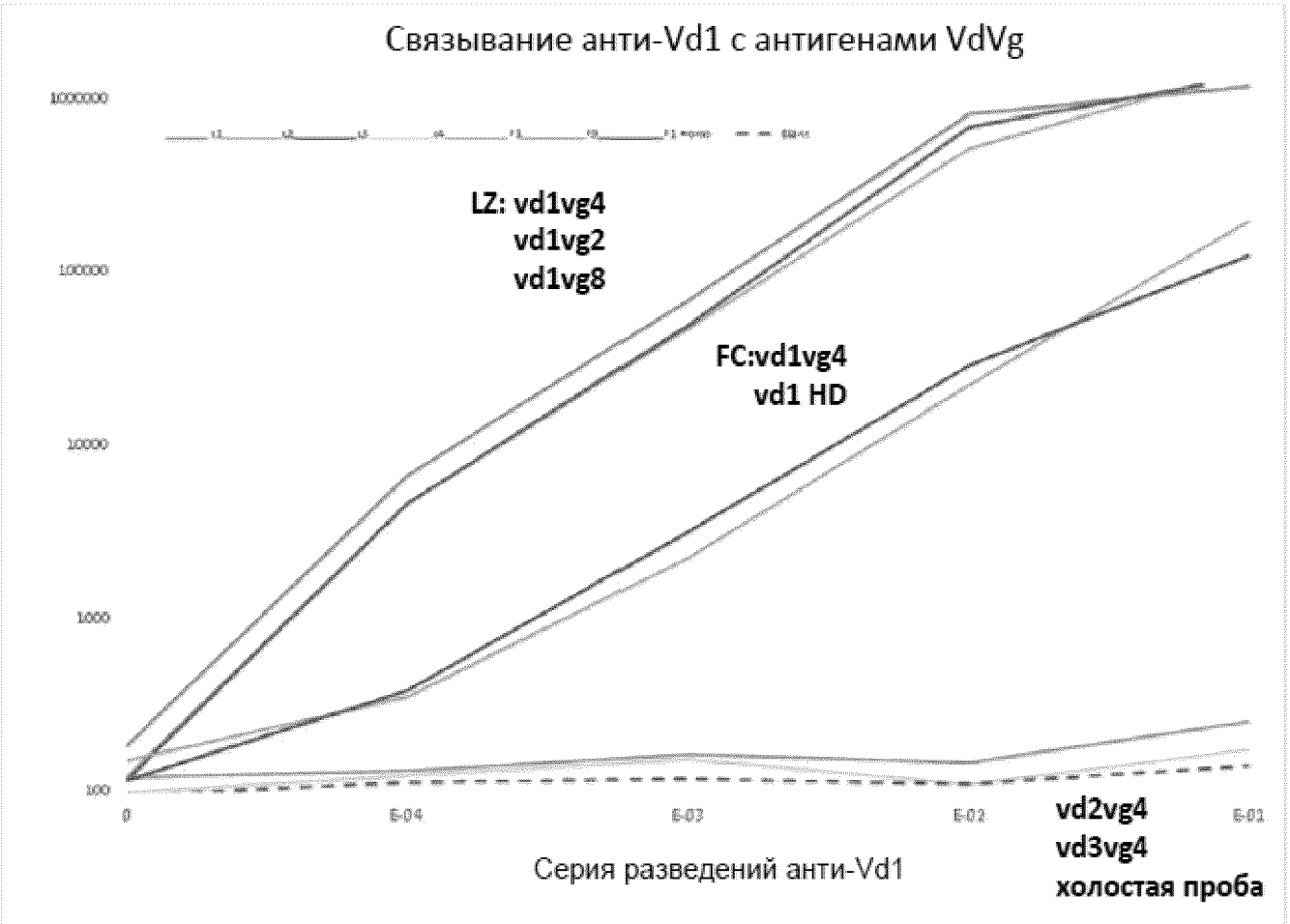
28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что заболевание или нарушение представляет собой злокачественное новообразование, инфекционное заболевание или воспалительное заболевание, или при этом субъект, у которого модулируется иммунный ответ, имеет злокачественное новообразование, инфекционное заболевание или воспалительное заболевание.

29. Способ по п. 27 или п. 28, отличающийся тем, что модулирование иммунного ответа у субъекта включает по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из активации γδ Т-клеток, инициирования или увеличения пролиферации γδ Т-клеток, инициирования или увеличения экспансии γδ Т-клеток, инициирования или увеличения дегрануляции γδ Т-клеток, инициирования или увеличения активности γδ Т-лимфоцитов, инициирования или увеличения цитотоксичности γδ Т, инициирования или увеличения мобилизации γδ Т-клеток, повышения выживаемости γδ Т-клеток и повышения устойчивости к истощению γδ Т-клеток.

30. Способ по любому из пп. 27-29, отличающийся тем, что пораженные клетки убивают, при этом сохраняют здоровые клетки.

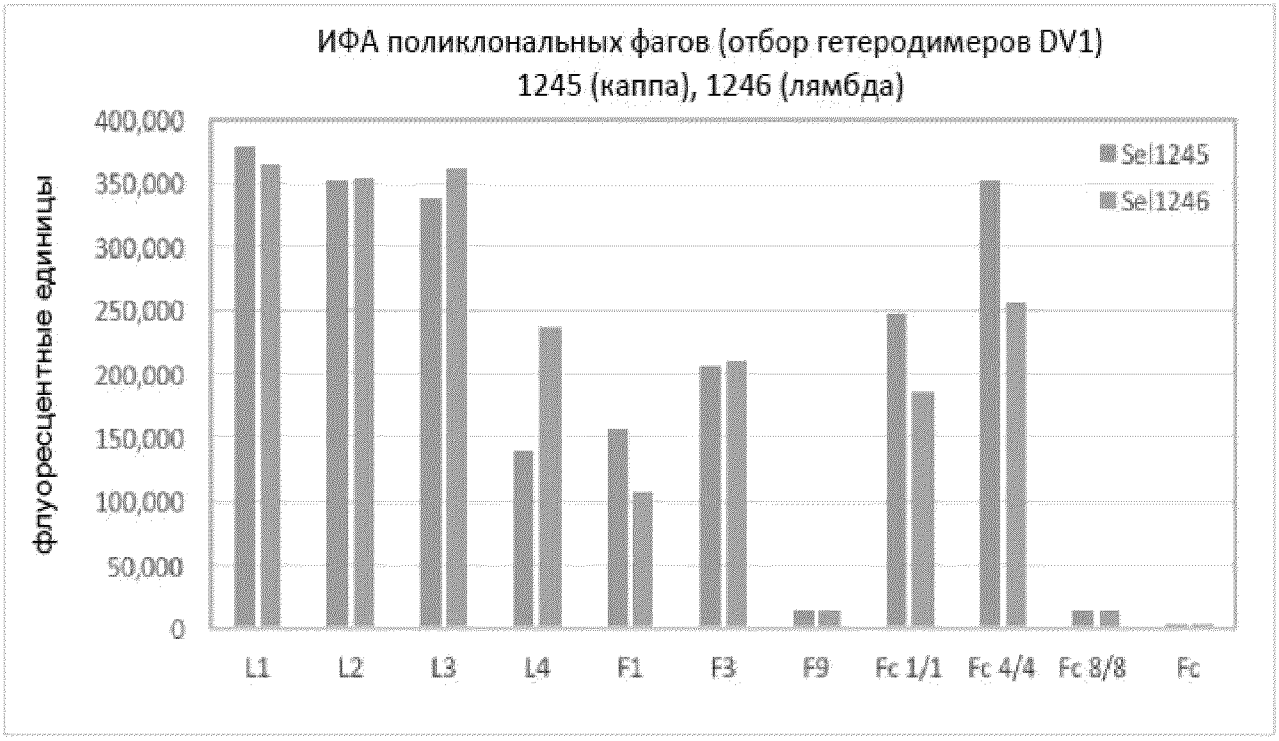
31. Полиспецифическое антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-24 или фармацевтическая композиция по п. 26 для применения при лечении злокачественнного новообразования, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.

По доверенности

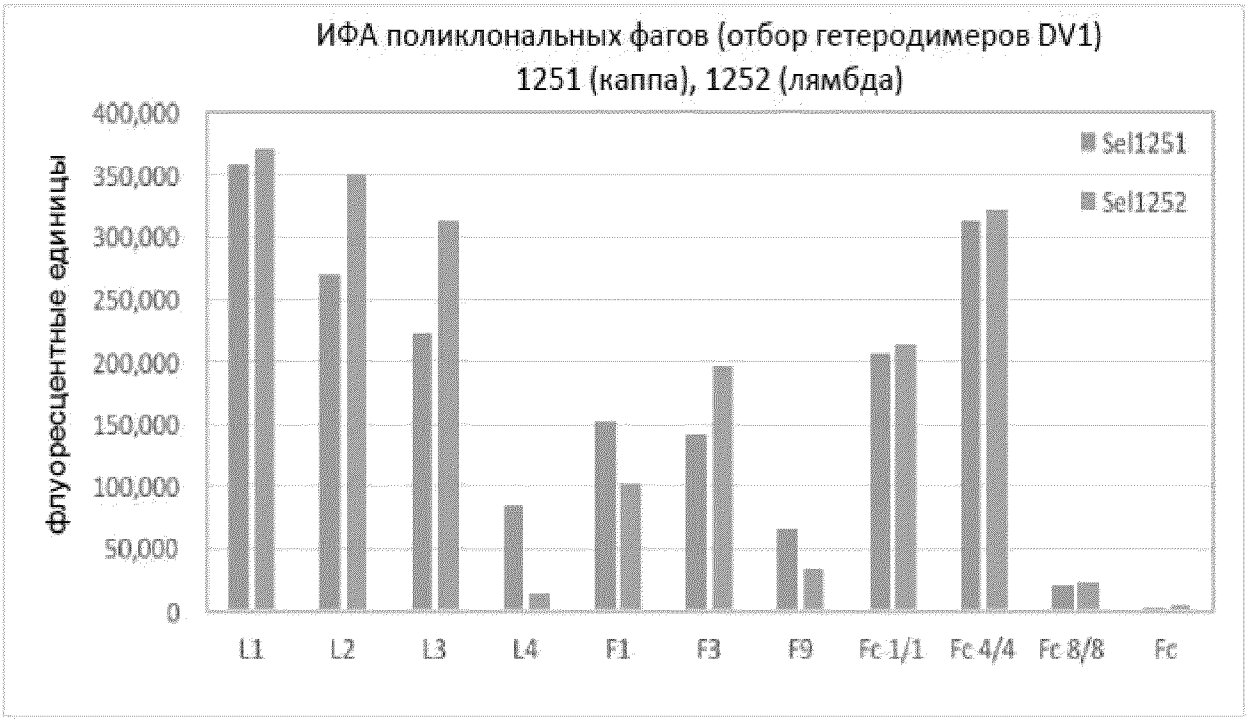

Связывание анти-Vd1 с антигенами VdVg
1000000
100000
10000
1000
100
0
E-04
E-03
E-02
E-01
LZ: vd1vg4
vd1vg2
vd1vg8
FC:vd1vg4
vd1 HD
vd2vg4
vd3vg4
холостая проба
Серия разведений анти-Vd1

Фиг. 1

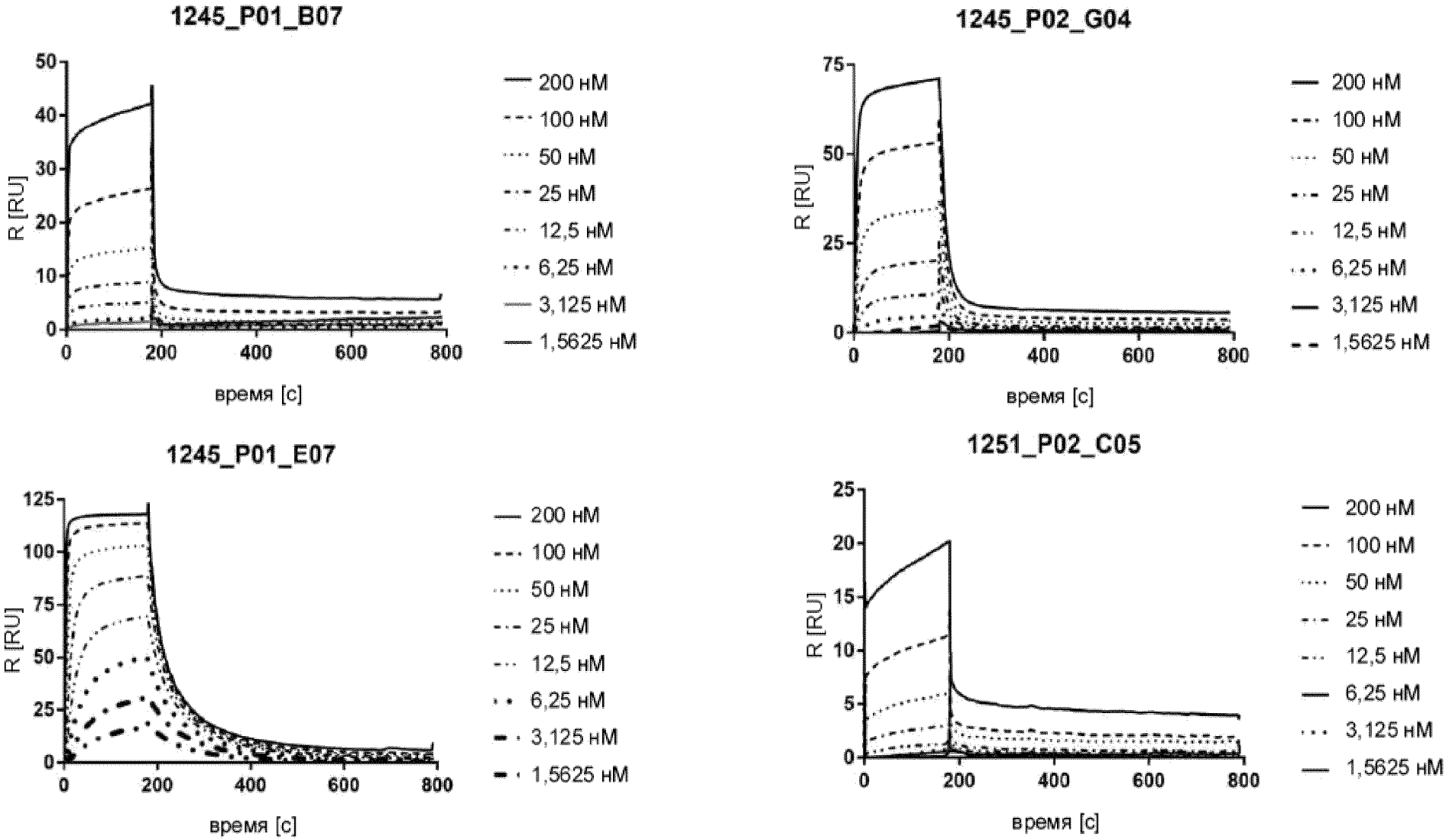
A


ИФА поликлональных фагов (отбор гетеродимеров DV1)
1245 (каппа), 1246 (лямбда)
флуоресцентные единицы
400,000
350,000
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
Sel1245
Sel1246
L1
L2
L3
L4
F1
F3
F9
Fc 1/1
Fc 4/4
Fc 8/8
Fc

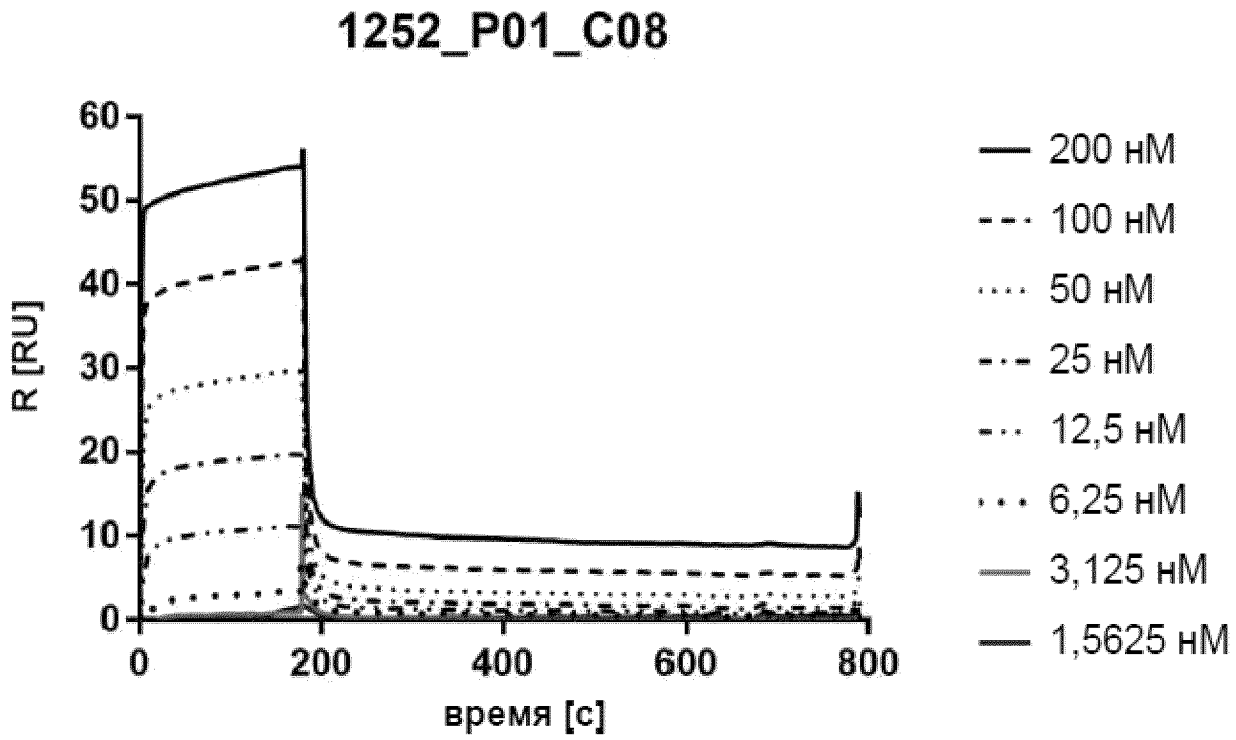
B

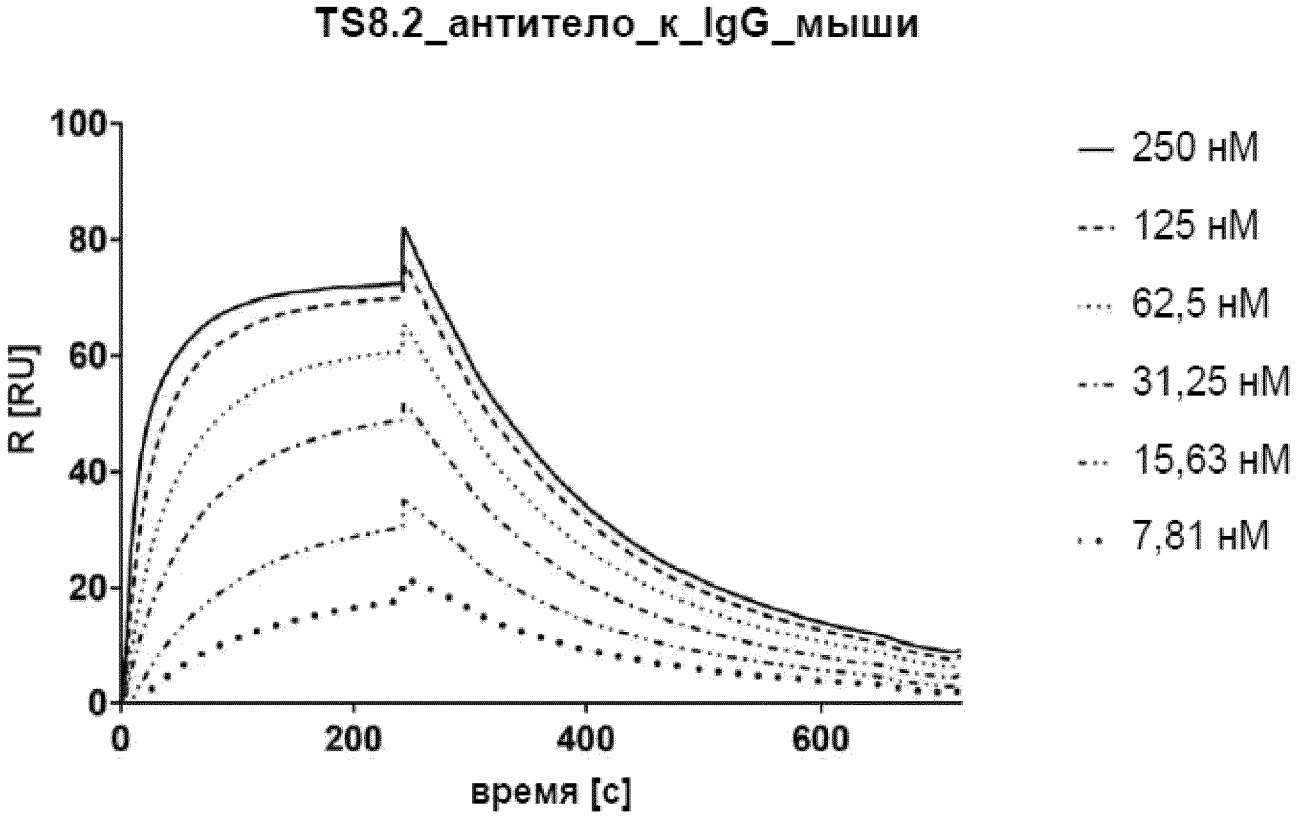

ИФА поликлональных фагов (отбор гетеродимеров DV1)
1251 (каппа), 1252 (лямбда)
флуоресцентные единицы
400,000
350,000
300,000
250,000
200,000
150,000
100,000
50,000
0
Sel1251
Sel1252
L1
L2
L3
L4
F1
F3
F9
Fc 1/1
Fc 4/4
Fc 8/8
Fc

Фиг. 2


1245_P01_B07
R [RU]
время [с]
200 нМ
100 нМ
50 нМ
25 нМ
12,5 нМ
6,25 нМ
3,125 нМ
1,5625 нМ
1245_P02_G04
R [RU]
время [с]
200 нМ
100 нМ
50 нМ
25 нМ
12,5 нМ
6,25 нМ
3,125 нМ
1,5625 нМ
1245_P01_E07
R [RU]
время [с]
200 нМ
100 нМ
50 нМ
25 нМ
12,5 нМ
6,25 нМ
3,125 нМ
1,5625 нМ
1251_P02_C05
R [RU]
время [с]
200 нМ
100 нМ
50 нМ
25 нМ
12,5 нМ
6,25 нМ
3,125 нМ
1,5625 нМ

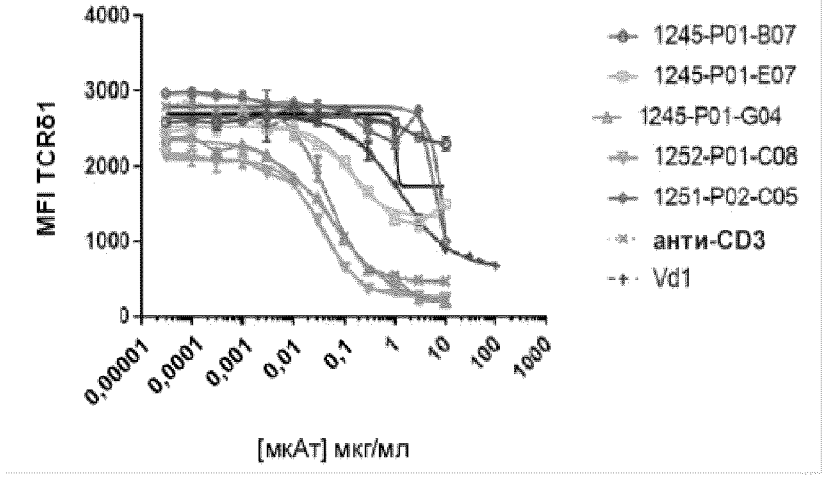
Фиг. 3



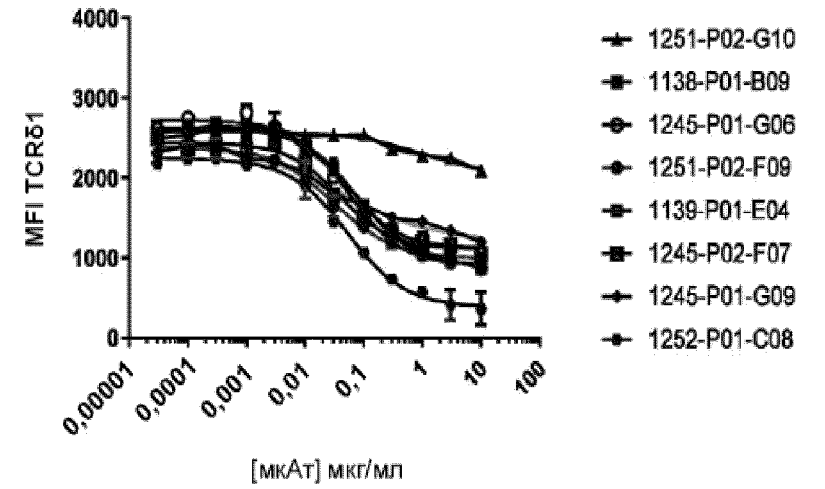


Фиг. 3 (продолжение)

A)

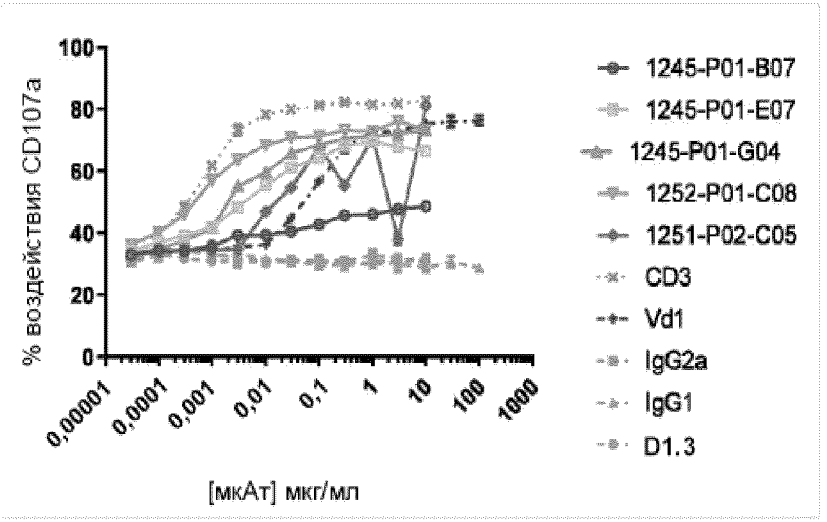


B)

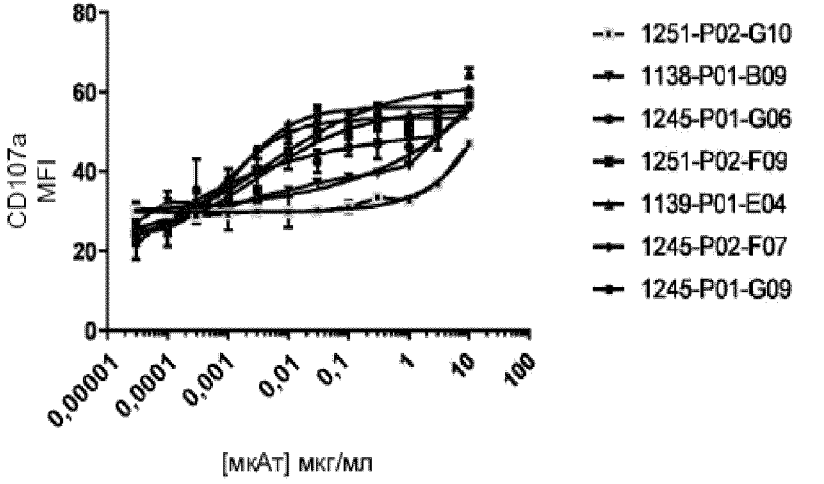


Фиг. 4

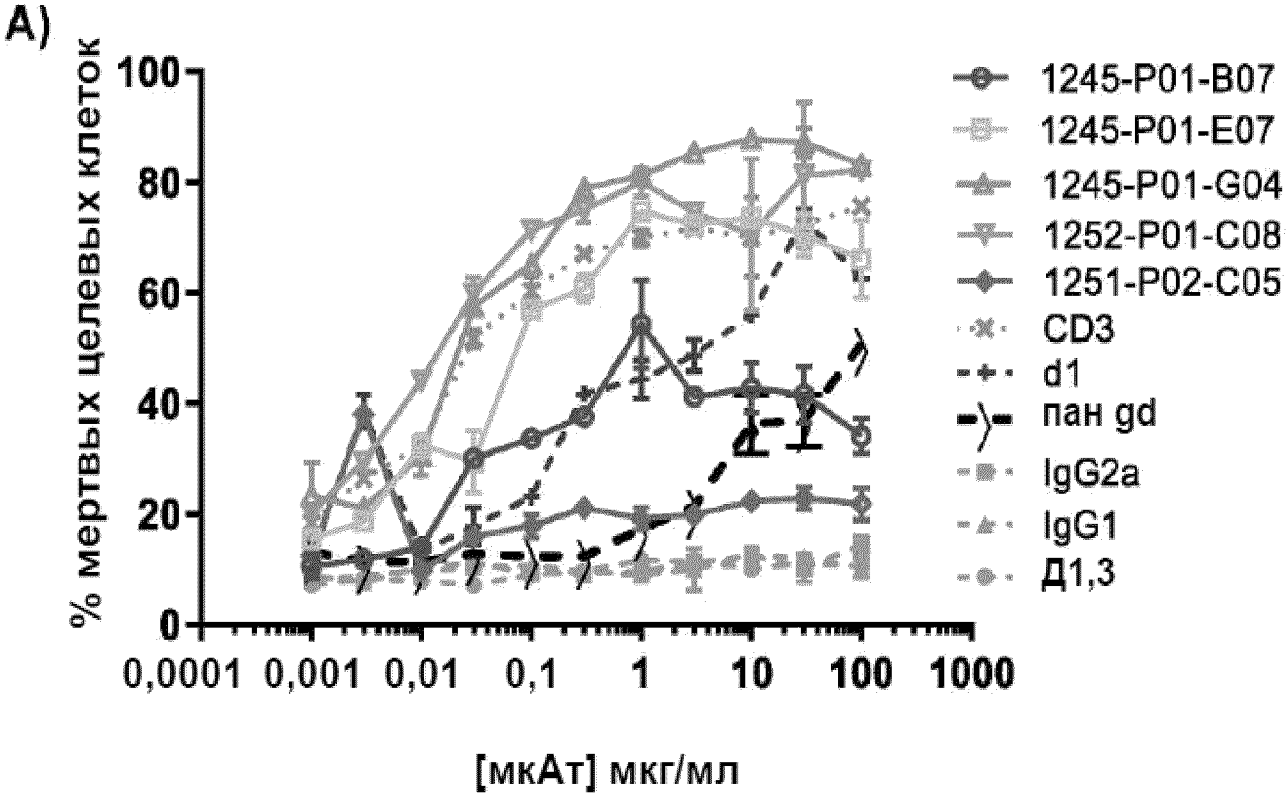
A)

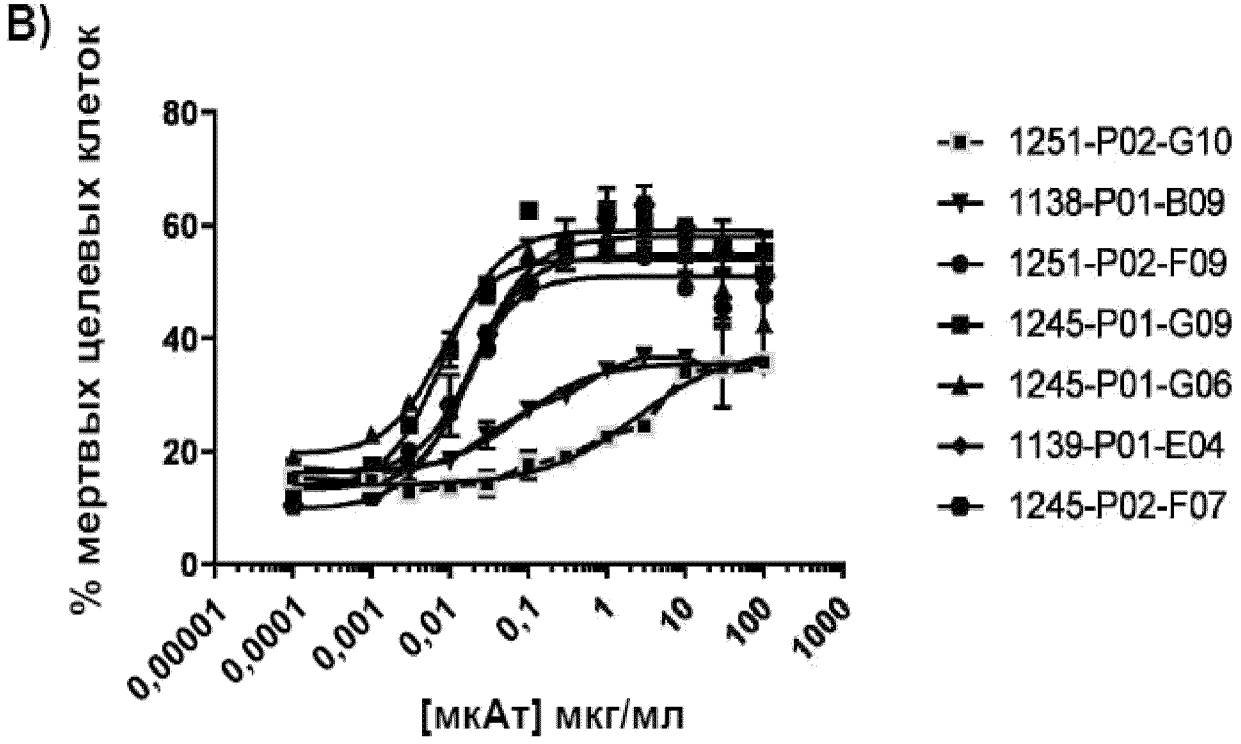


B)

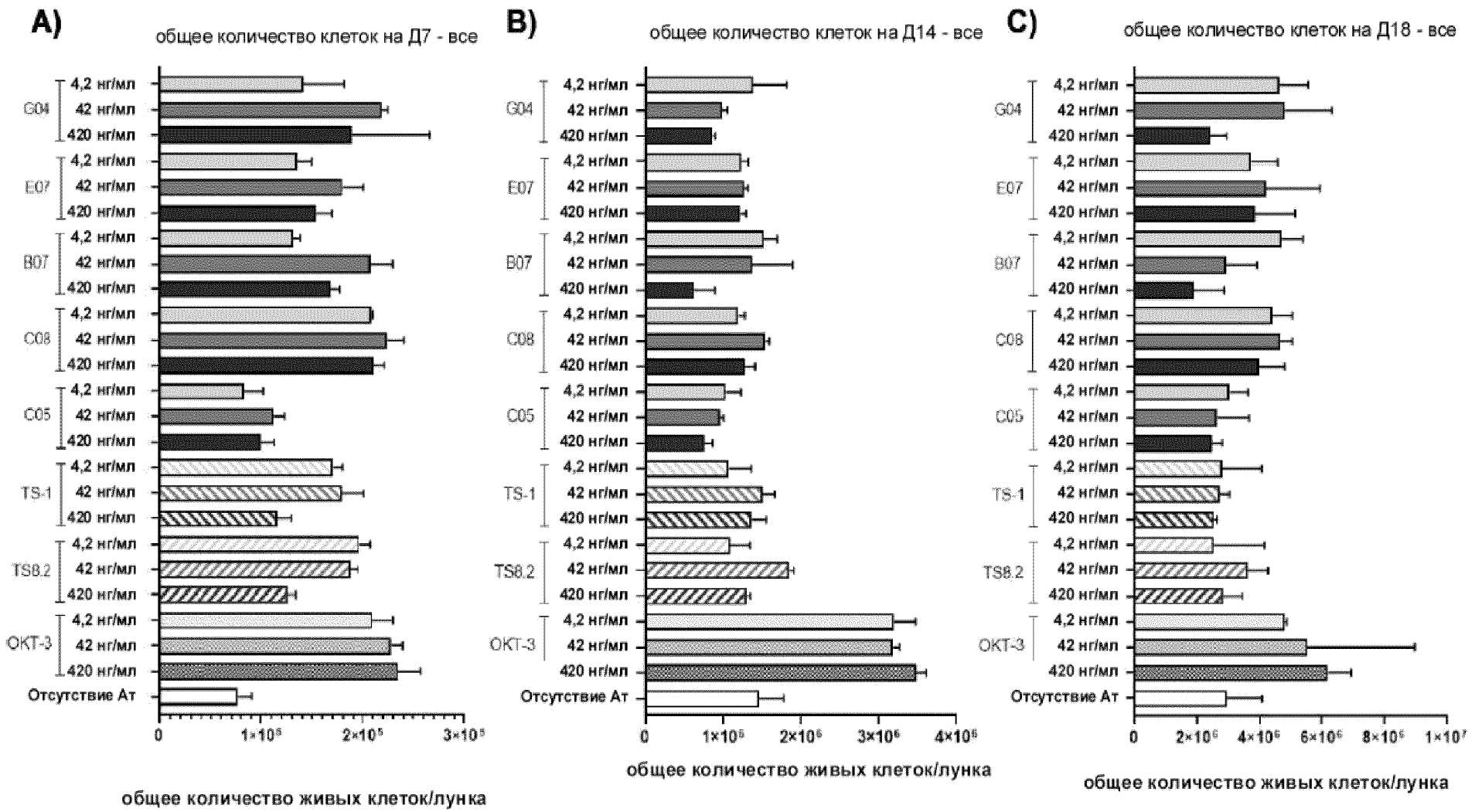


Фиг. 5

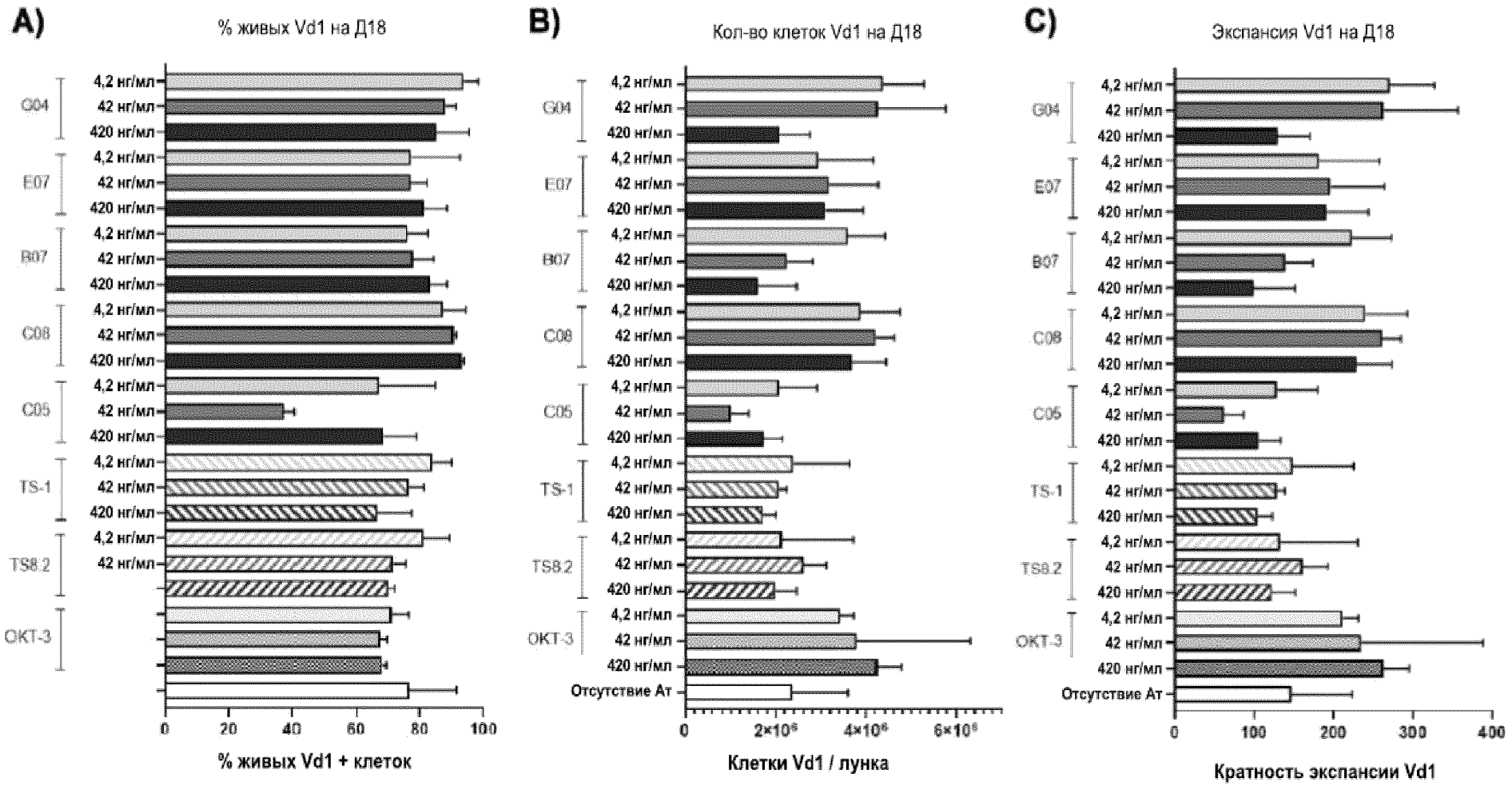

A)
% мертвых целевых клеток
100
80
60
40
20
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
[мкАт] мкг/мл
1245-P01-B07
1245-P01-E07
1245-P01-G04
1252-P01-C08
1251-P02-C05
CD3
d1
пан gd
IgG2a
IgG1
Д1,3


B)
% мертвых целевых клеток
80
60
40
20
0
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
[мкАт] мкг/мл
1251-P02-G10
1138-P01-B09
1251-P02-F09
1245-P01-G09
1245-P01-G06
1139-P01-E04
1245-P02-F07

Фиг. 6

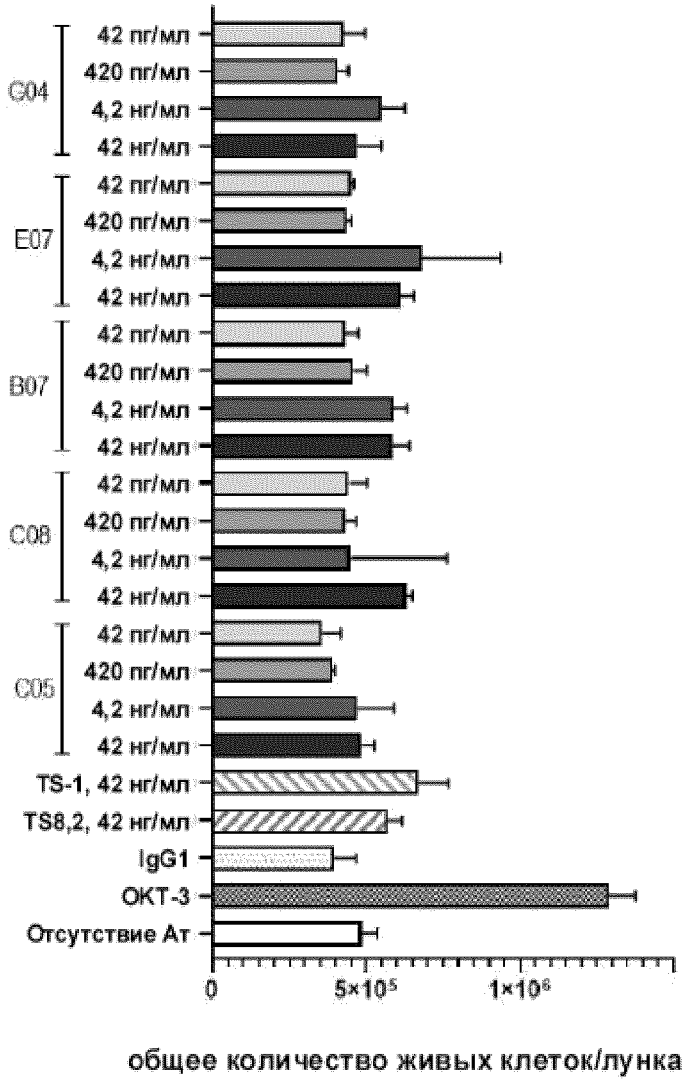

A)
общее количество клеток на Д7 - все
B)
общее количество клеток на Д14 - все
C)
общее количество клеток на Д18 - все
G04
E07
B07
C08
C05
TS-1
TS8.2
OKT-3
4,2 нг/мл
42 нг/мл
420 нг/мл
Отсутствие Ат
0
1×10⁵
2×10⁵
3×10⁵
4×10⁵
2×10⁶
4×10⁶
6×10⁶
8×10⁶
1×10⁷
общее количество живых клеток/лунка

Фиг. 7

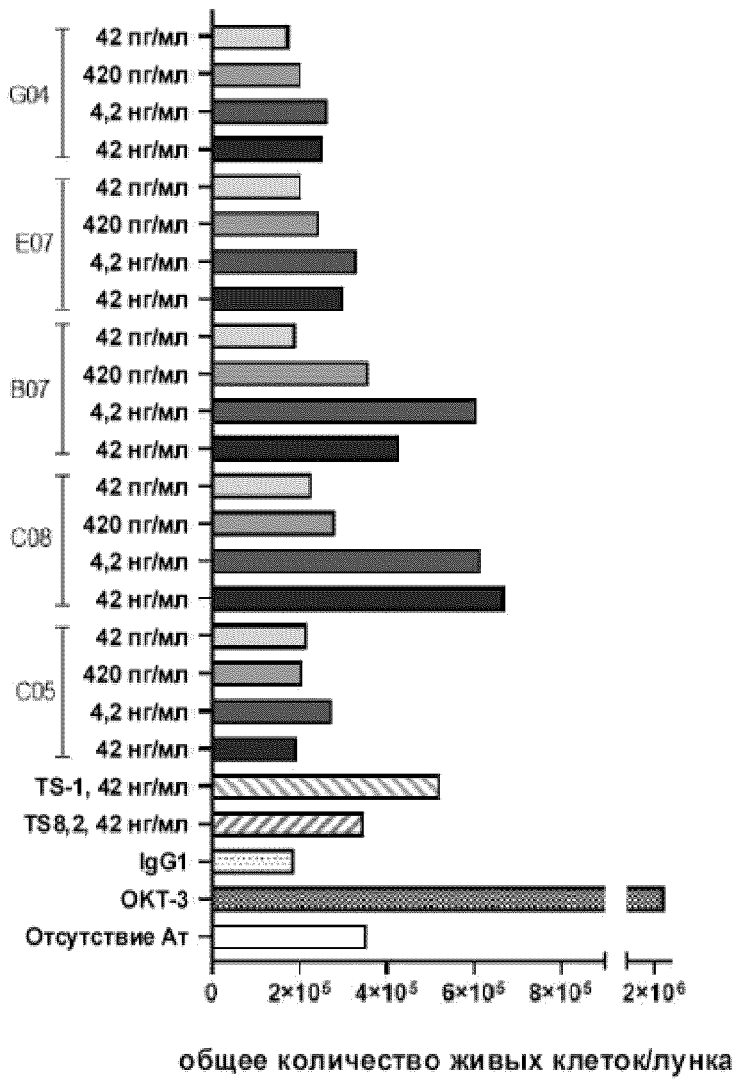

A)
% живых Vd1 на Д18
G04
E07
B07
C08
C05
TS-1
TS8.2
OKT-3
4,2 нг/мл
42 нг/мл
420 нг/мл
0
20
40
60
80
100
% живых Vd1 + клеток
B)
Кол-во клеток Vd1 на Д18
Отсутствие Ат
0
2×10⁶
4×10⁶
6×10⁶
Клетки Vd1 / лунка
C)
Экспансия Vd1 на Д18
0
100
200
300
400
Кратность экспансии Vd1

Фиг. 8

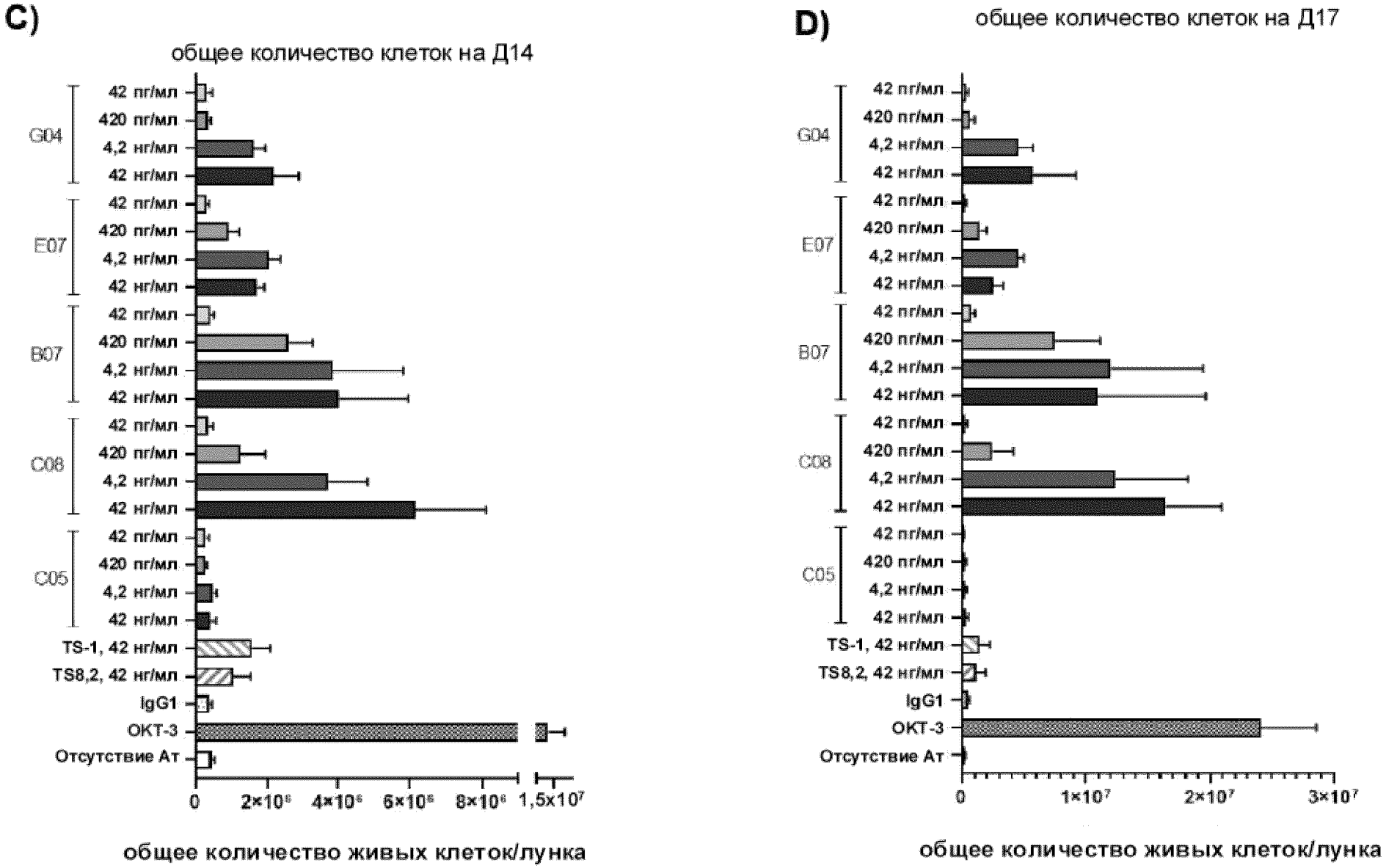
A)


общее количество клеток на Д7
C04
E07
B07
C08
C05
42 пг/мл
420 пг/мл
4,2 нг/мл
42 нг/мл
TS-1, 42 нг/мл
TS8,2, 42 нг/мл
IgG1
OKT-3
Отсутствие Ат
0
5×10⁵
1×10⁶
общее количество живых клеток/лунка

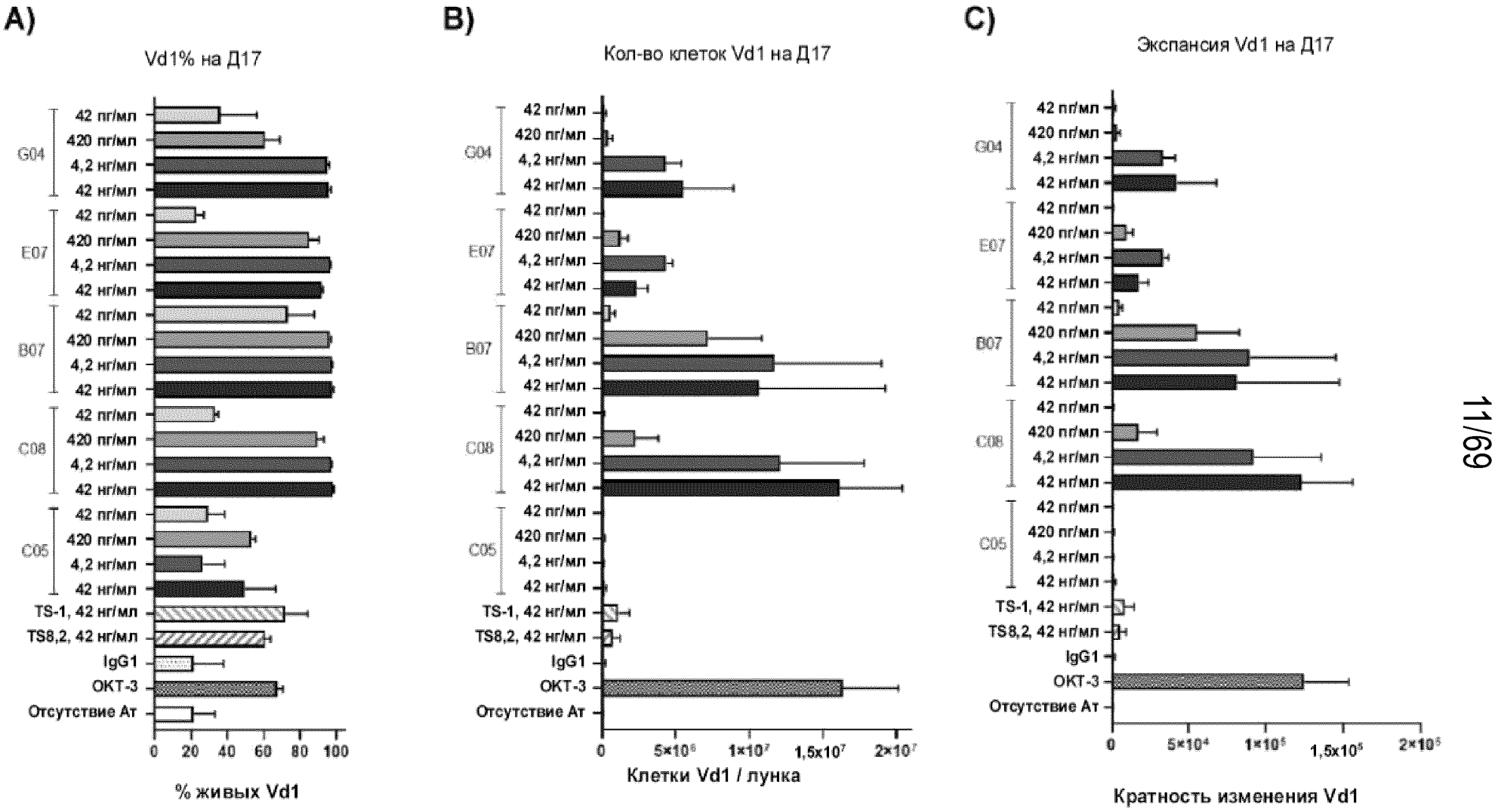
B)


общее количество клеток на Д11
G04
E07
B07
C08
C05
42 пг/мл
420 пг/мл
4,2 нг/мл
42 нг/мл
TS-1, 42 нг/мл
TS8,2, 42 нг/мл
IgG1
OKT-3
Отсутствие Ат
0
2×10⁵
4×10⁵
6×10⁵
8×10⁵
2×10⁶
общее количество живых клеток/лунка

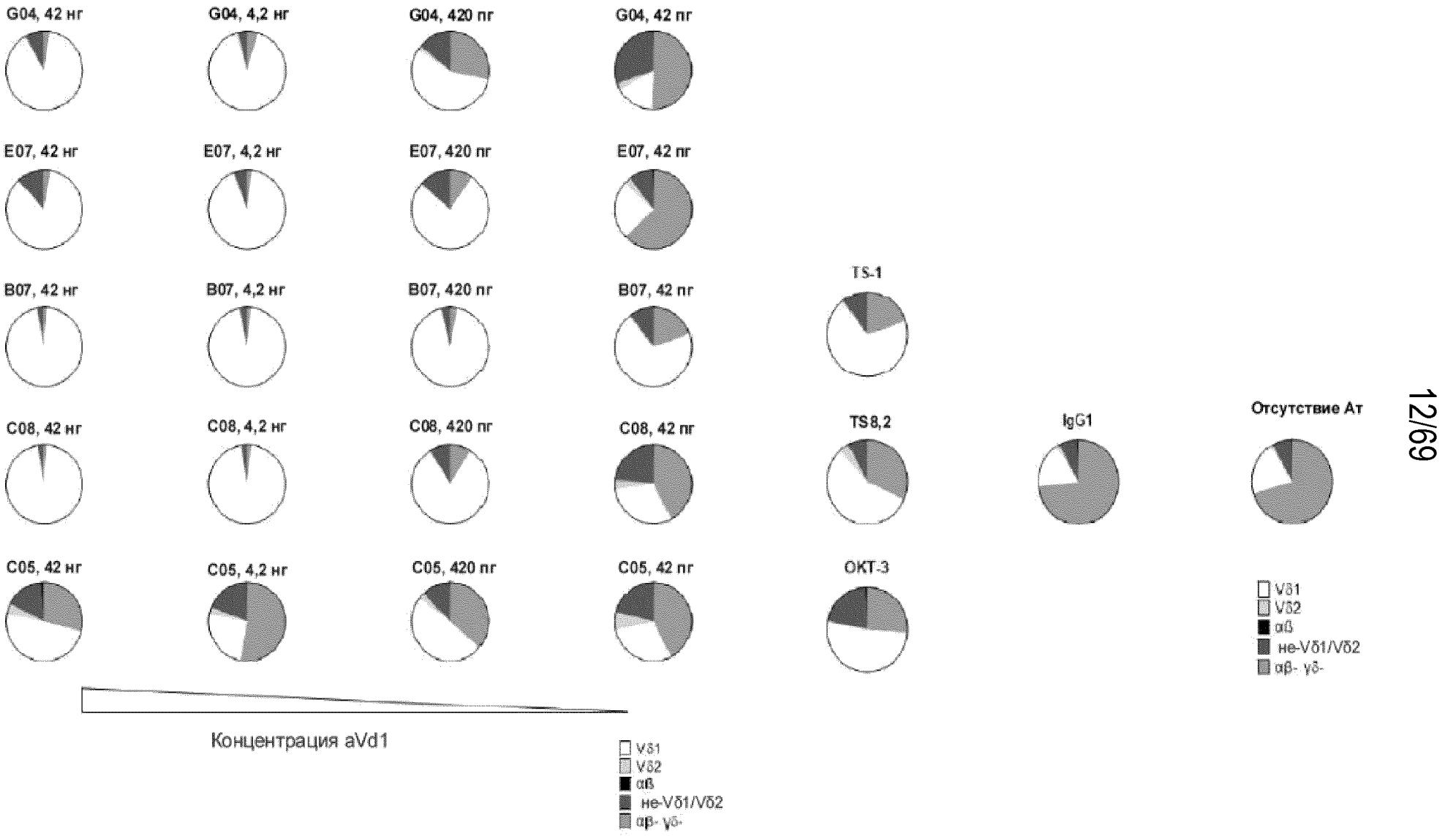
Фиг. 9



Фиг. 9 (продолжение)

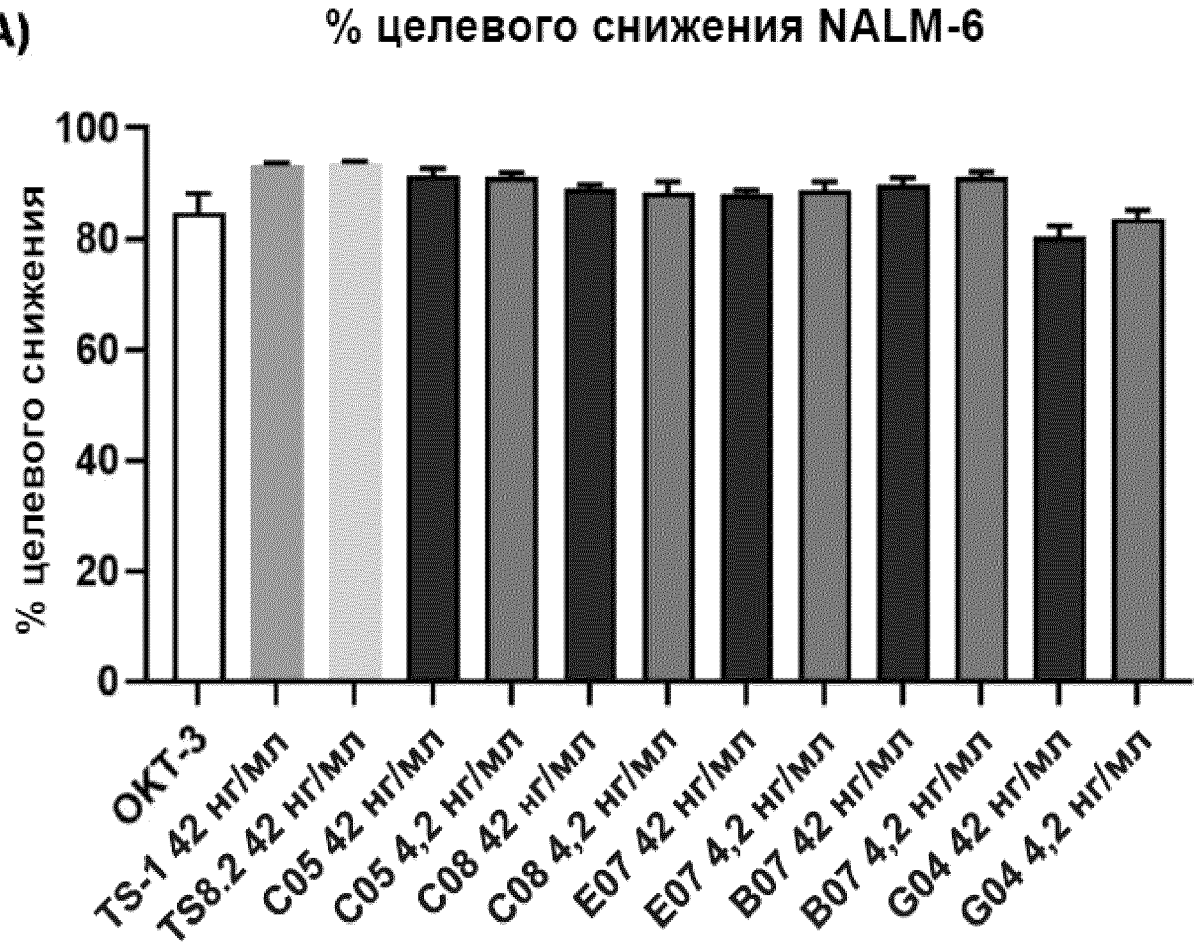

A)
Vd1% на Д17
G04
E07
B07
C08
C05
42 пг/мл
420 пг/мл
4,2 нг/мл
42 нг/мл
TS-1, 42 нг/мл
TS8,2, 42 нг/мл
IgG1
OKT-3
Отсутствие Ат
0
20
40
60
80
100
% живых Vd1
B)
Кол-во клеток Vd1 на Д17
0
5×10⁶
1×10⁷
1,5x10⁷
2×10⁷
Клетки Vd1 / лунка
C)
Экспансия Vd1 на Д17
0
5×10⁴
1×10⁵
1,5x10⁵
2×10⁵
Кратность изменения Vd1

Фиг. 10

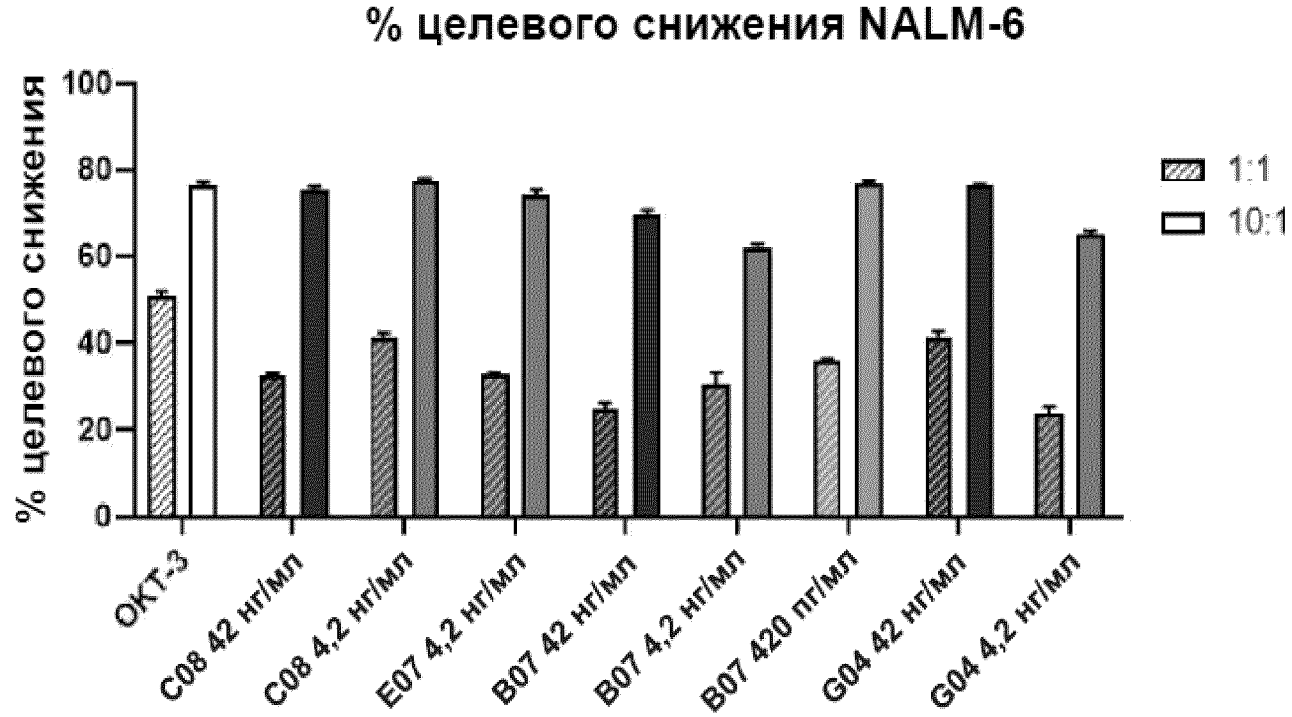

G04, 42 нг
G04, 4,2 нг
G04, 420 пг
G04, 42 пг
E07, 42 нг
E07, 4,2 нг
E07, 420 пг
E07, 42 пг
B07, 42 нг
B07, 4,2 нг
B07, 420 пг
B07, 42 пг
TS-1
C08, 42 нг
C08, 4,2 нг
C08, 420 пг
C08, 42 пг
TS8,2
IgG1
Отсутствие Ат
C05, 42 нг
C05, 4,2 нг
C05, 420 пг
C05, 42 пг
OKT-3
Концентрация aVd1
Vδ1
Vδ2
αß
не-Vδ1/Vδ2
αβ- γδ-
Vδ1
Vδ2
αß
не-Vδ1/Vδ2
αβ- γδ-

Фиг. 11

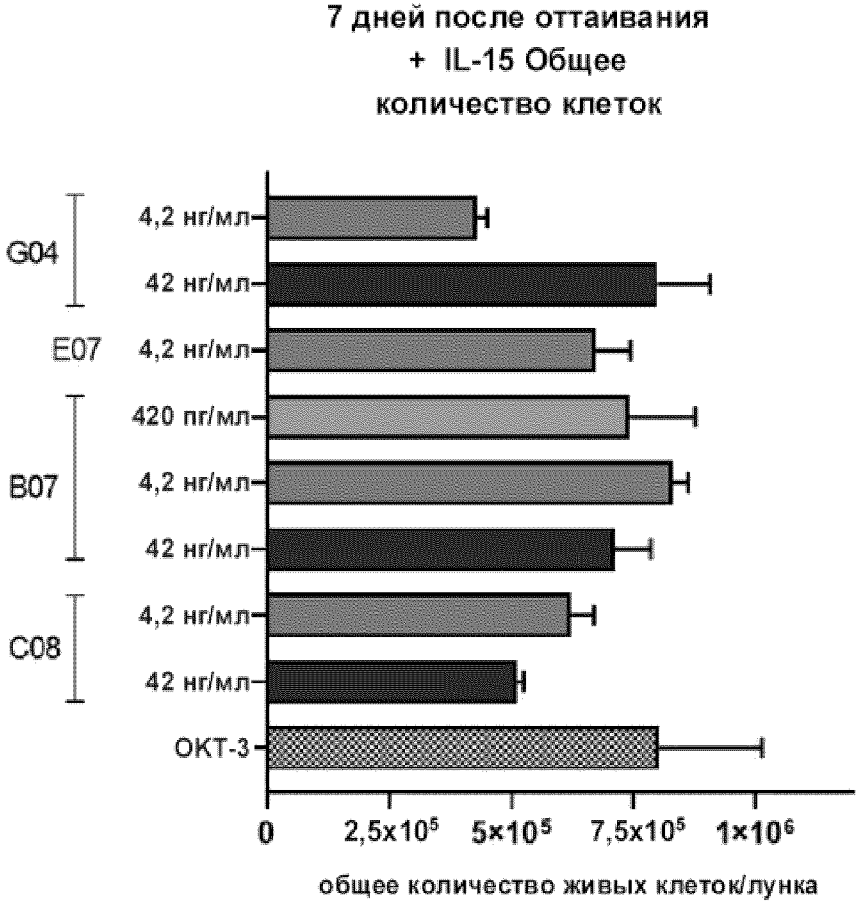
A)


% целевого снижения NALM-6
% целевого снижения
100
80
60
40
20
0
OKT-3
TS-1 42 нг/мл
TS8.2 42 нг/мл
C05 42 нг/мл
C05 4,2 нг/мл
C08 42 нг/мл
C08 4,2 нг/мл
E07 42 нг/мл
E07 4,2 нг/мл
B07 42 нг/мл
B07 4,2 нг/мл
G04 42 нг/мл
G04 4,2 нг/мл

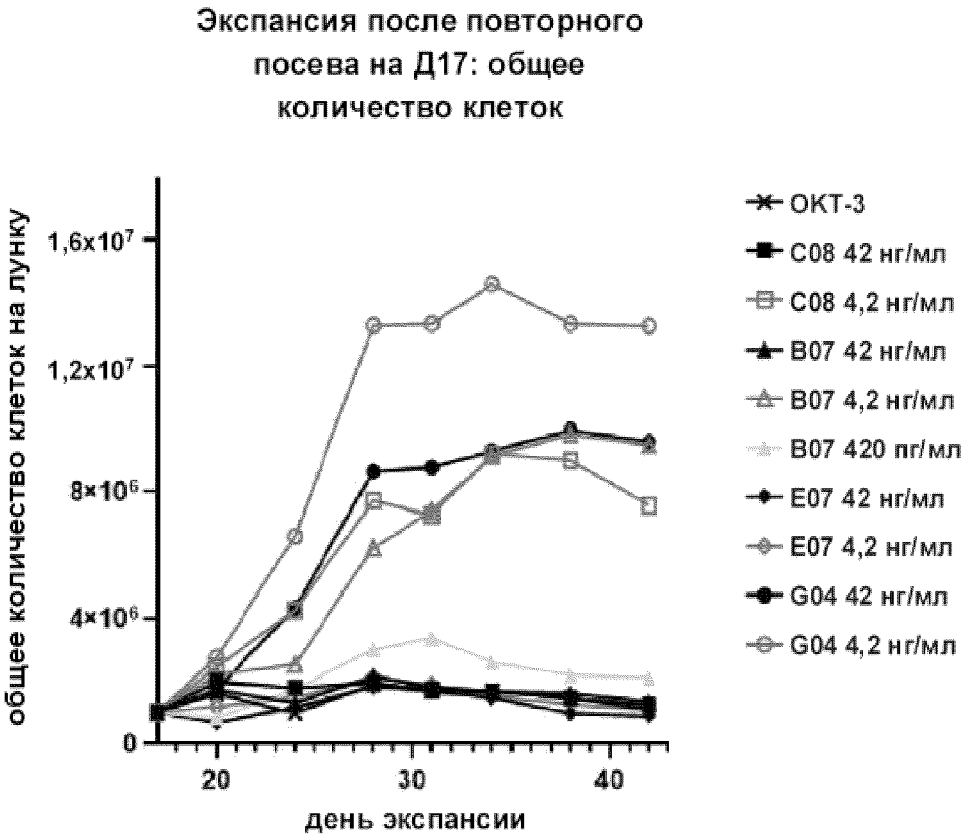
B)


% целевого снижения NALM-6
% целевого снижения
100
80
60
40
20
0
1:1
10:1
OKT-3
C08 42 нг/мл
C08 4,2 нг/мл
E07 4,2 нг/мл
B07 42 нг/мл
B07 4,2 нг/мл
B07 420 пг/мл
G04 42 нг/мл
G04 4,2 нг/мл

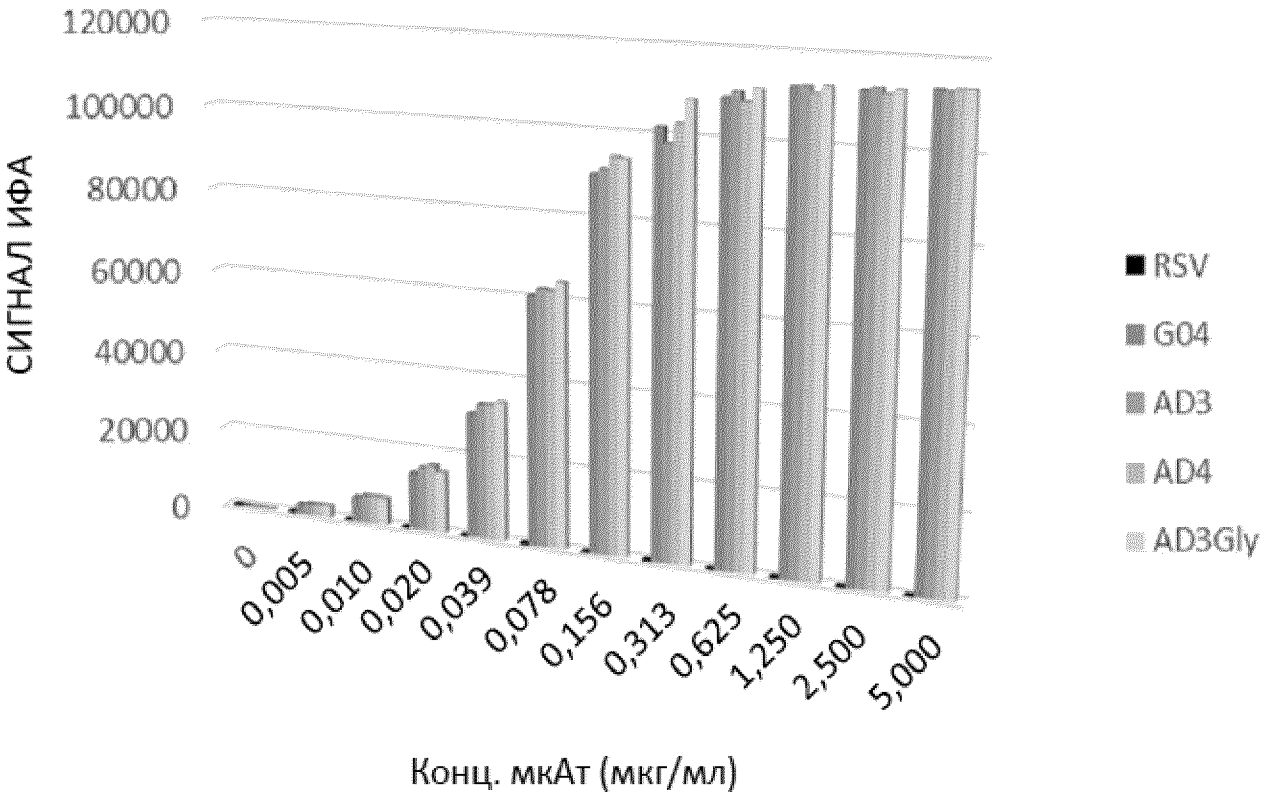
Фиг. 12


7 дней после оттаивания
+ IL-15 Общее
количество клеток
G04
E07
B07
C08
4,2 нг/мл
42 нг/мл
4,2 нг/мл
420 пг/мл
4,2 нг/мл
42 нг/мл
4,2 нг/мл
42 нг/мл
OKT-3
0
2,5x10^5
5x10^5
7,5x10^5
1x10^6
общее количество живых клеток/лунка

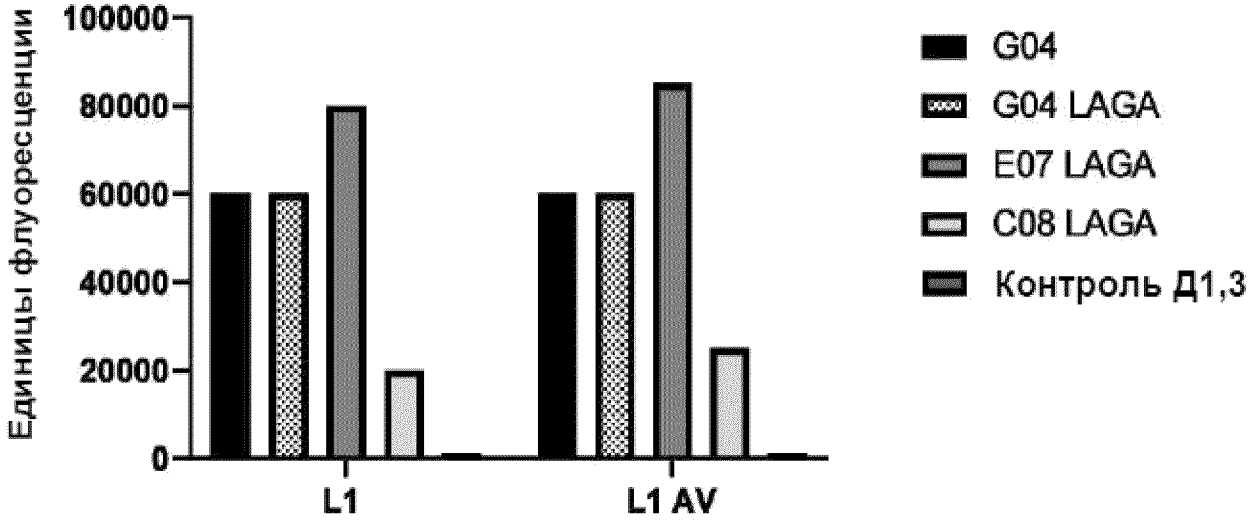
Фиг. 13


Экспансия после повторного
посева на Д17: общее
количество клеток
общее количество клеток на лунку
1,6x10^7
1,2x10^7
8x10^6
4x10^6
0
20
30
40
день экспансии
OKT-3
C08 42 нг/мл
C08 4,2 нг/мл
B07 42 нг/мл
B07 4,2 нг/мл
B07 420 пг/мл
E07 42 нг/мл
E07 4,2 нг/мл
G04 42 нг/мл
G04 4,2 нг/мл

Фиг. 14

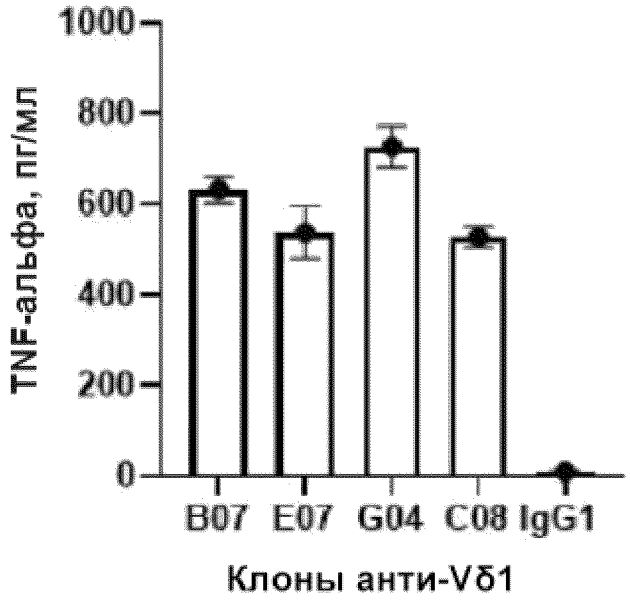

120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
СИГНАЛ ИФА
0
0,005
0,010
0,020
0,039
0,078
0,156
0,313
0,625
1,250
2,500
5,000
Конц. мкАт (мкг/мл)
RSV
G04
AD3
AD4
AD3Gly

Фиг. 15


Единицы флуоресценции
100000
80000
60000
40000
20000
0
L1
L1 AV
G04
G04 LAGA
E07 LAGA
C08 LAGA
Контроль Д1,3

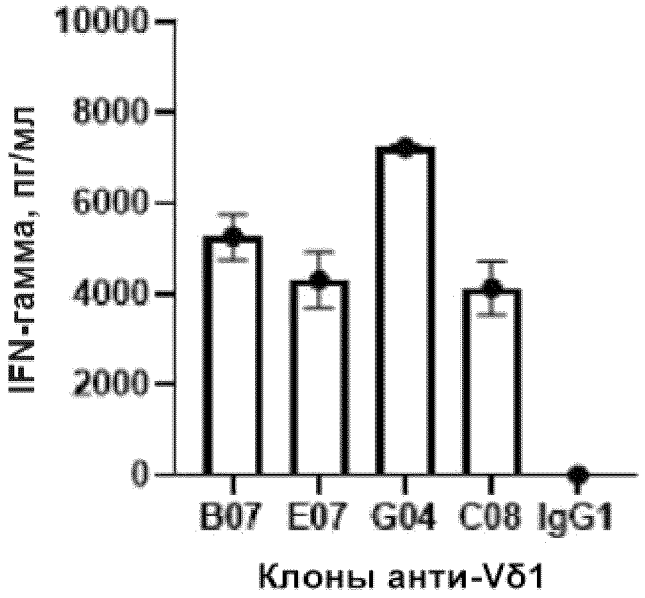
Фиг. 16

A)



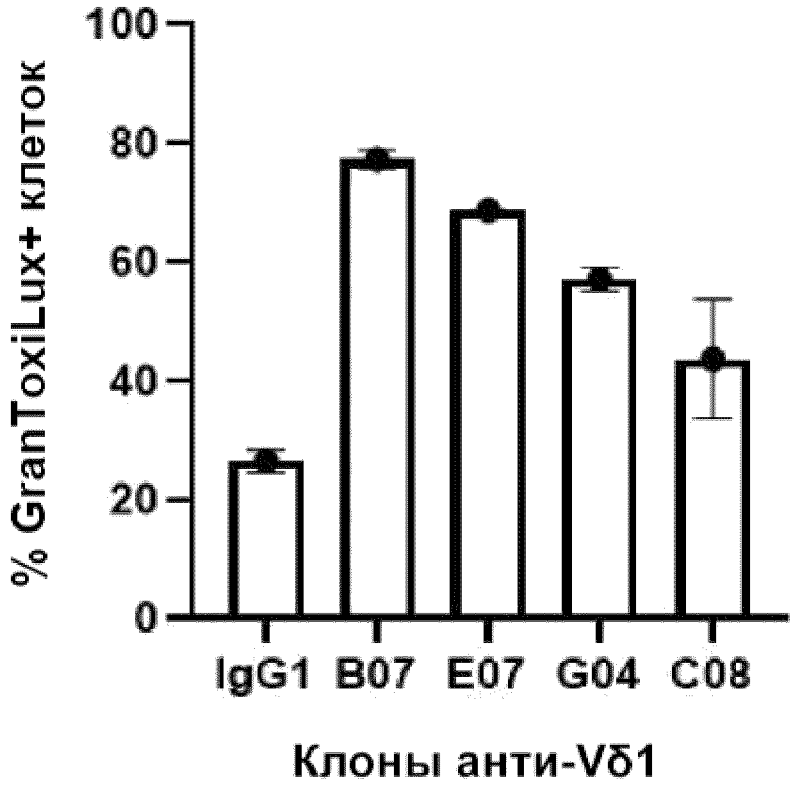
Уровни TNF-альфа в супернатанте (пг/мл)				
клон	Донор1	Донор2	Среднее значение	СТАНД. ОТ КЛОН
B07	612,369	652,9294	632,6492	28,68055
E07	579,6175	497,477	538,5472	58,08211
G04	760,3178	695,8256	728,0717	45,60288
C08	512,5485	545,4042	528,9763	23,23252
IgG1 (контроль)	< ПКО	< ПКО	< ПКО	< ПКО

B)



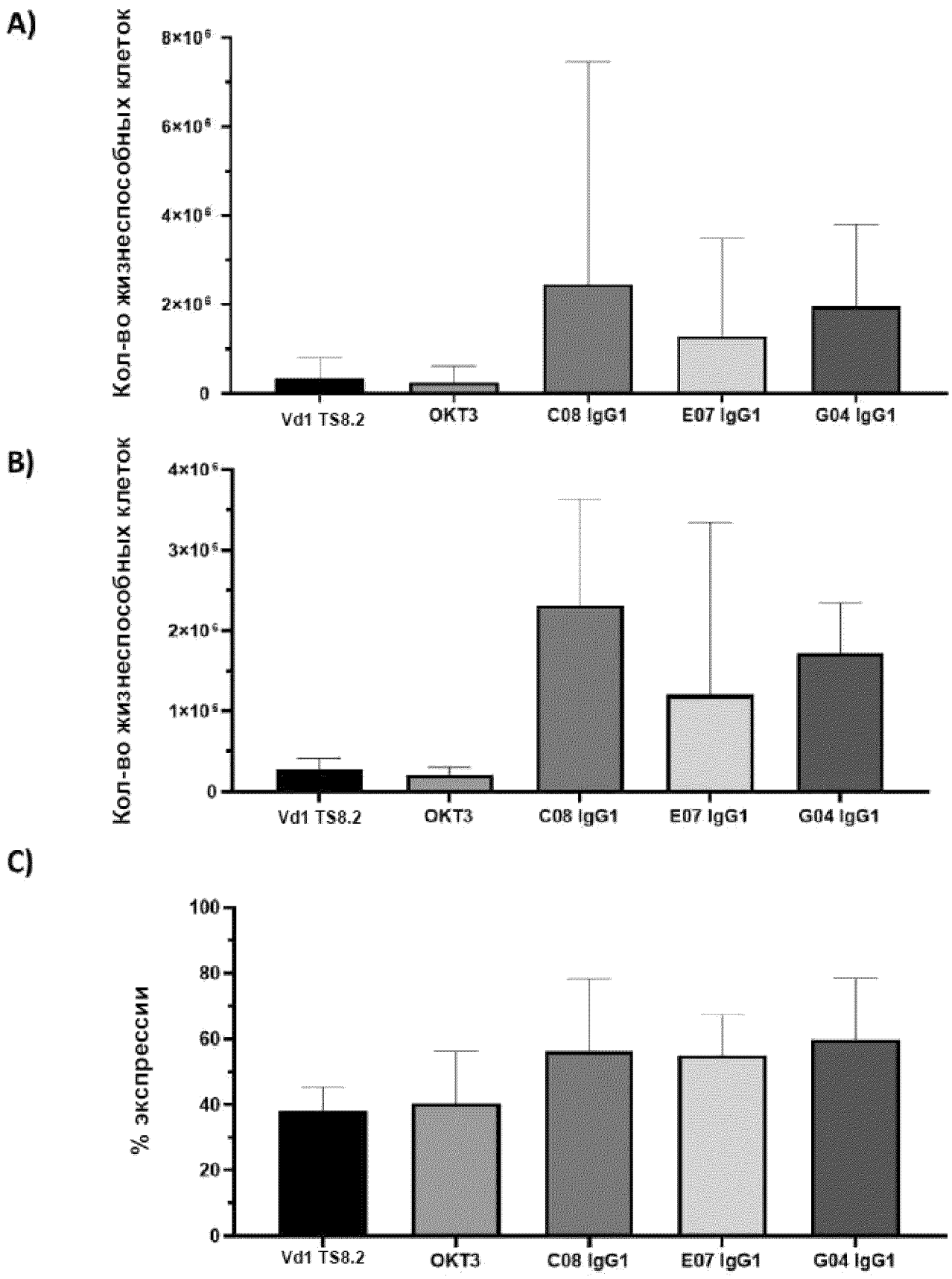
Уровни IFN-гамма в супернатанте (пг/мл)				
клон	Донор1	Донор2	Среднее значение	СТАНД. ОТКЛОН
B07	4916,846	5616,726	5266,786	494,89
E07	4753,625	3875,864	4314,744	620,671
G04	7279,766	7189,028	7234,397	64,16168
C08	3713,296	4561,834	4137,565	600,0066
IgG1 (контроль)	469,6334	549,9306	509,782	56,77863

Фиг. 17

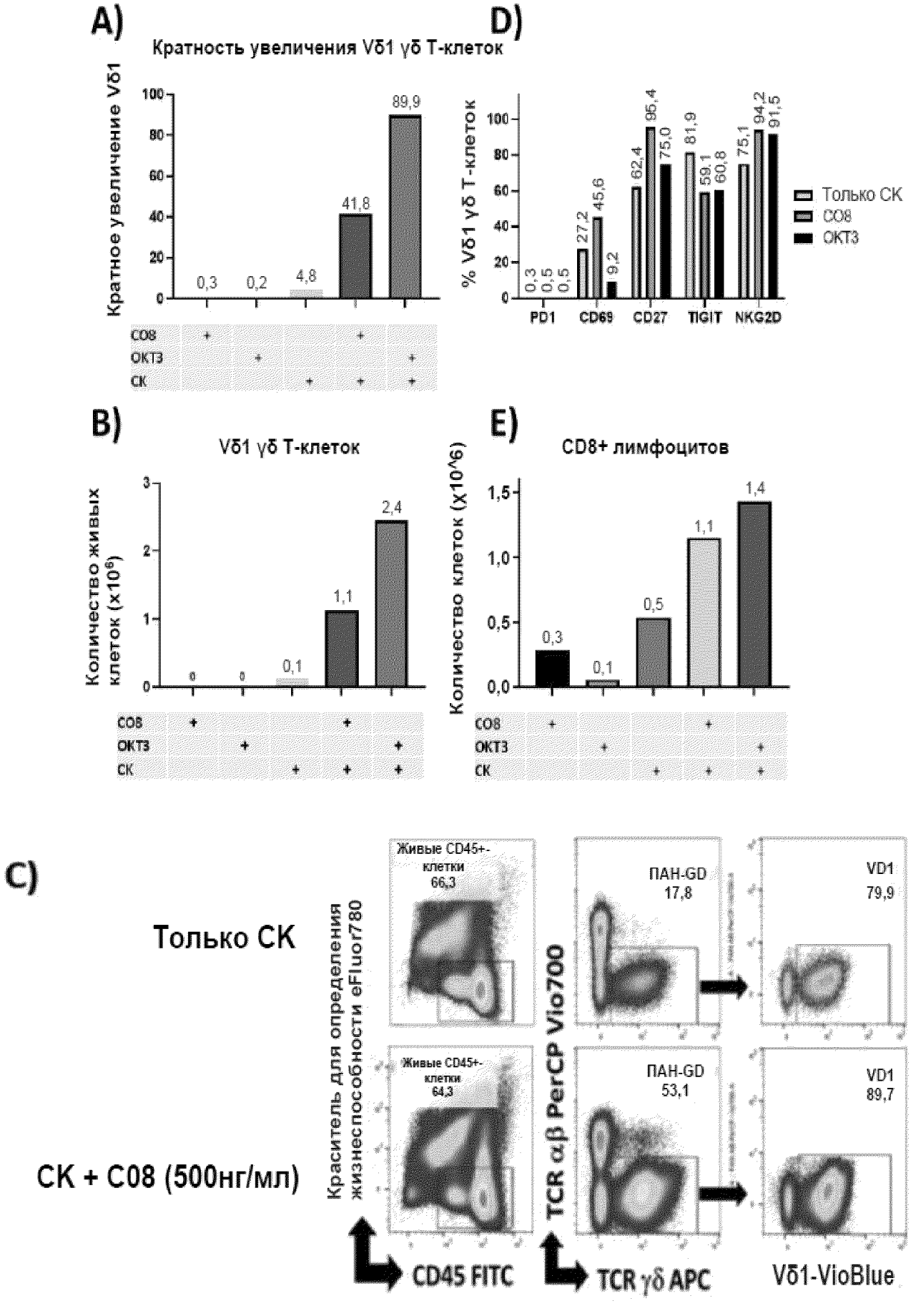


% GranToxiLux+ клеток				
			Среднее значение	СТАНД. ОТКЛ
IgG1	25,1	27,8	26,45	1,909188
B07	78,4	76,2	77,3	1,555635
E07	68,6	68,7	68,65	0,070711
G04	55,6	58,4	57	1,979899
C08	50,7	36,6	43,65	9,970206

Фиг. 18

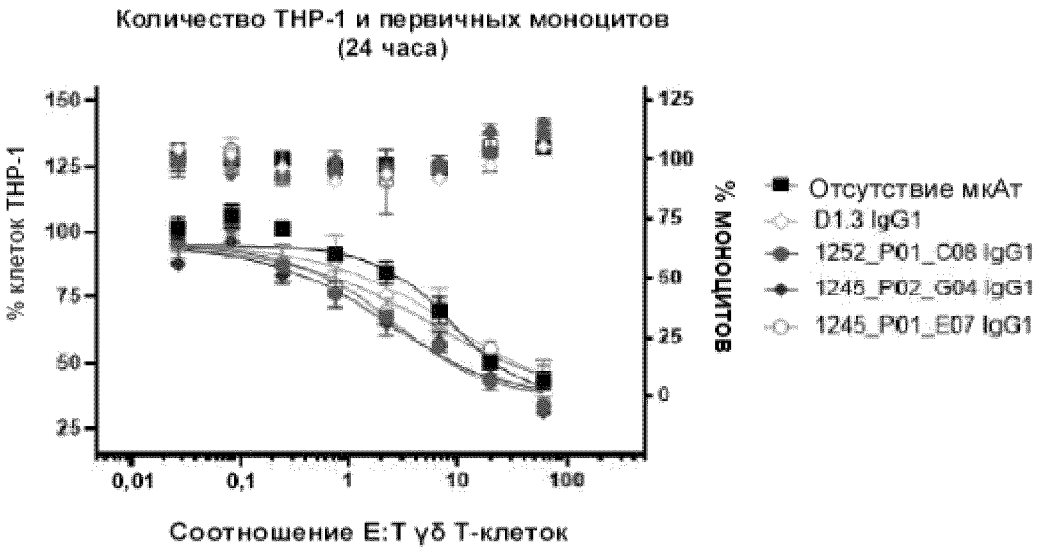

A)
Кол-во жизнеспособных клеток
8×10⁶
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
Vd1 TS8.2
OKT3
C08 IgG1
E07 IgG1
G04 IgG1
B)
Кол-во жизнеспособных клеток
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
Vd1 TS8.2
OKT3
C08 IgG1
E07 IgG1
G04 IgG1
C)
% экспрессии
100
80
60
40
20
0
Vd1 TS8.2
OKT3
C08 IgG1
E07 IgG1
G04 IgG1

Фиг. 19

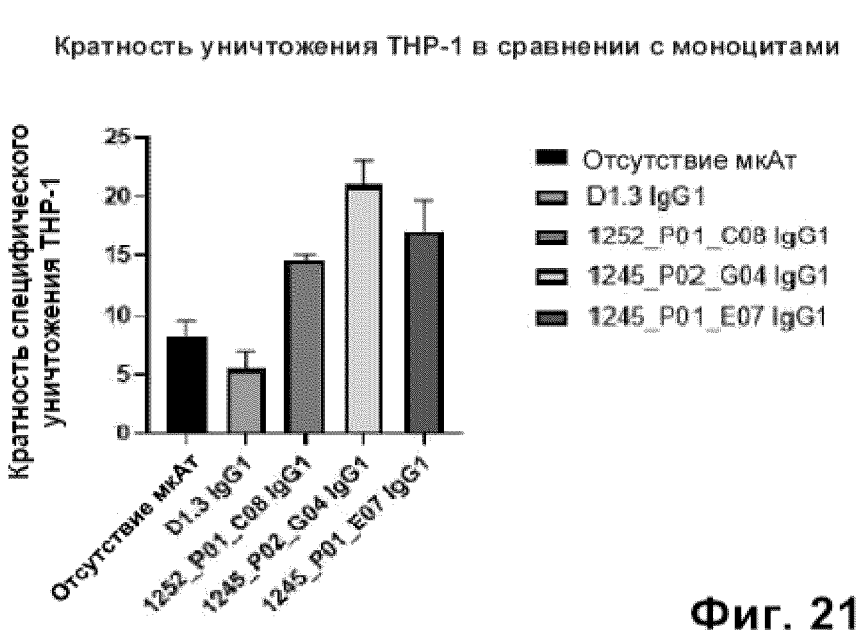

A)
Кратность увеличения Vδ1 γδ Т-клеток
Кратное увеличение Vδ1
100
80
60
40
20
0
0,3
0,2
4,8
41,8
89,9
CO8
OKT3
CK
D)
% Vδ1 γδ Т-клеток
0,3
0,5
0,5
27,2
45,6
9,2
62,4
95,4
75,0
81,9
59,1
60,8
75,1
94,2
91,5
PD1
CD69
CD27
TIGIT
NKG2D
Только CK
CO8
OKT3
B)
Vδ1 γδ Т-клеток
Количество живых клеток (x10⁶)
3
2
1
0
0
0
0,1
1,1
2,4
E)
CD8+ лимфоцитов
Количество клеток (x10^6)
1,5
1,0
0,5
0,0
0,3
0,1
0,5
1,1
1,4
C)
Только CK
CK + C08 (500нг/мл)
Живые CD45+-клетки 66,3
Живые CD45+-клетки 64,3
Краситель для определения жизнеспособности eFluor780
CD45 FITC
ПАН-GD 17,8
ПАН-GD 53,1
TCR αβ PerCP Vio700
TCR γδ APC
VD1 79,9
VD1 89,7
Vδ1-VioBlue

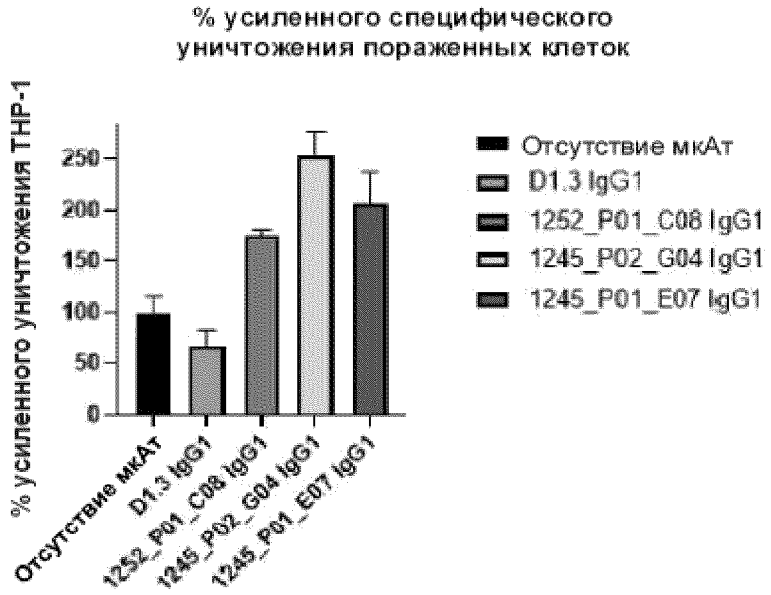
Фиг. 20

A)


Количество THP-1 и первичных моноцитов
(24 часа)
% клеток THP-1
% моноцитов
Соотношение E:T γδ T-клеток
0,01
0,1
1
10
100
Отсутствие мкАт
D1.3 IgG1
1252_P01_C08 IgG1
1245_P02_G04 IgG1
1245_P01_E07 IgG1

B)


Кратность уничтожения THP-1 в сравнении с моноцитами
Кратность специфического уничтожения THP-1
Отсутствие мкАт
D1.3 IgG1
1252_P01_C08 IgG1
1245_P02_G04 IgG1
1245_P01_E07 IgG1


% усиленного специфического уничтожения пораженных клеток
% усиленного уничтожения THP-1
Отсутствие мкАт
D1.3 IgG1
1252_P01_C08 IgG1
1245_P02_G04 IgG1
1245_P01_E07 IgG1

Фиг. 21

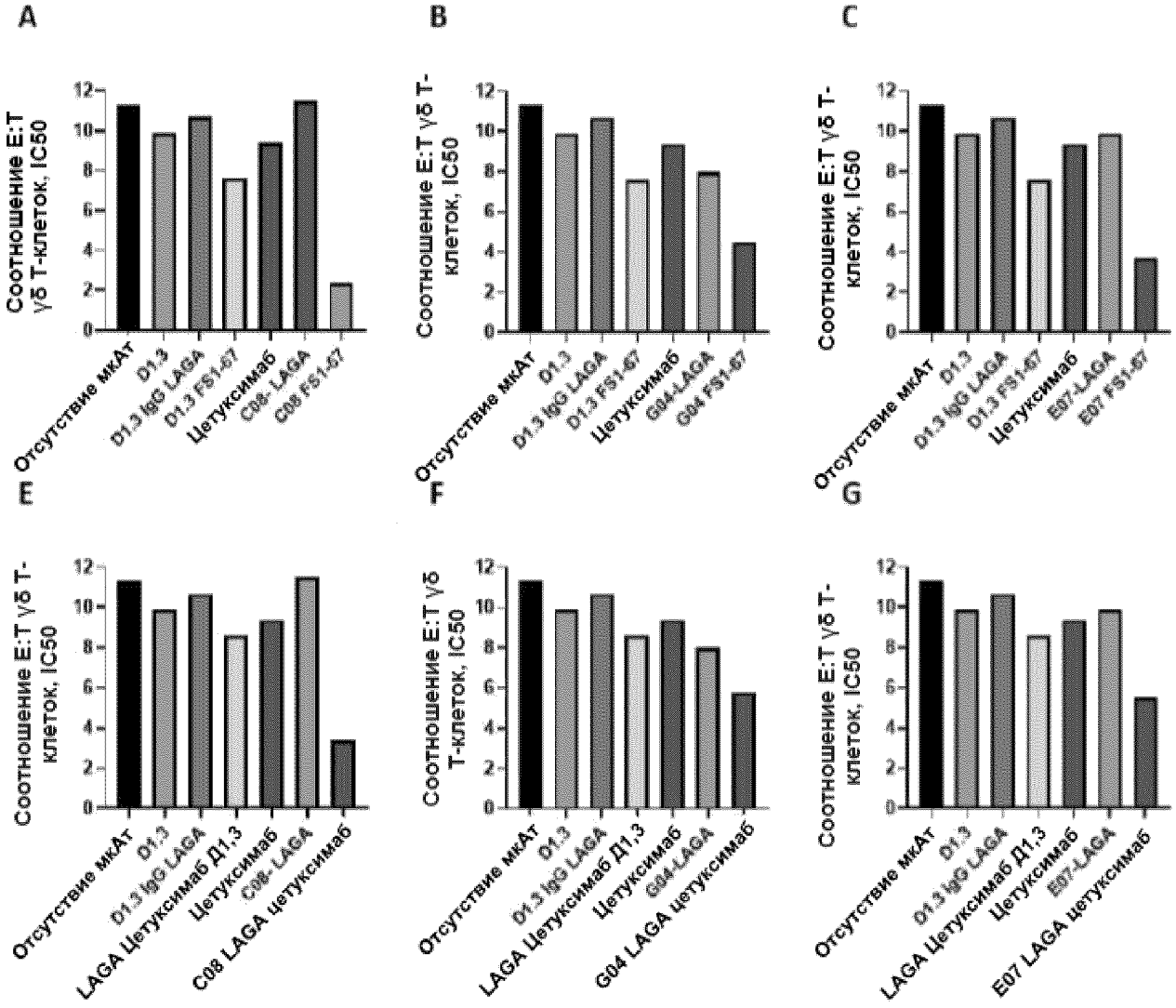
C)

	% улучшения EC50
Отсутствие мкАт	100%
D1.3 IgG1	109%
1252_P01_C08 IgG1	337%
1245_P02_G04 IgG	383%
1245_P01_E07 IgG	159%

D)

	EC50	
	γδT-клетка	Соотношение T:E
Отсутствие мкАт	8729	0,11
D1.3 IgG1	8019	0,12
1252_P01_C08 IgG1	2594	0,39
1245_P02_G04 IgG	2278	0,44
1245_P01_E07 IgG	5485	0,18

Фиг. 21 (продолжение)



	5 ч	12 ч	24 ч
Отсутствие мкАт	100%	100%	100%
Д1,3	114%	99%	112%
IgG LAGA Д1,3	106%	96%	113%
FS1-67 Д1,3	149%	143%	147%
Цетуксимаб	121%	110%	126%
C08- LAGA	99%	84%	101%
E07-LAGA	115%	117%	127%
G04-LAGA	141%	128%	163%
C08 FS1-67	467%	424%	371%
E07 FS1-67	303%	292%	259%
G04 FS1-67	254%	232%	212%

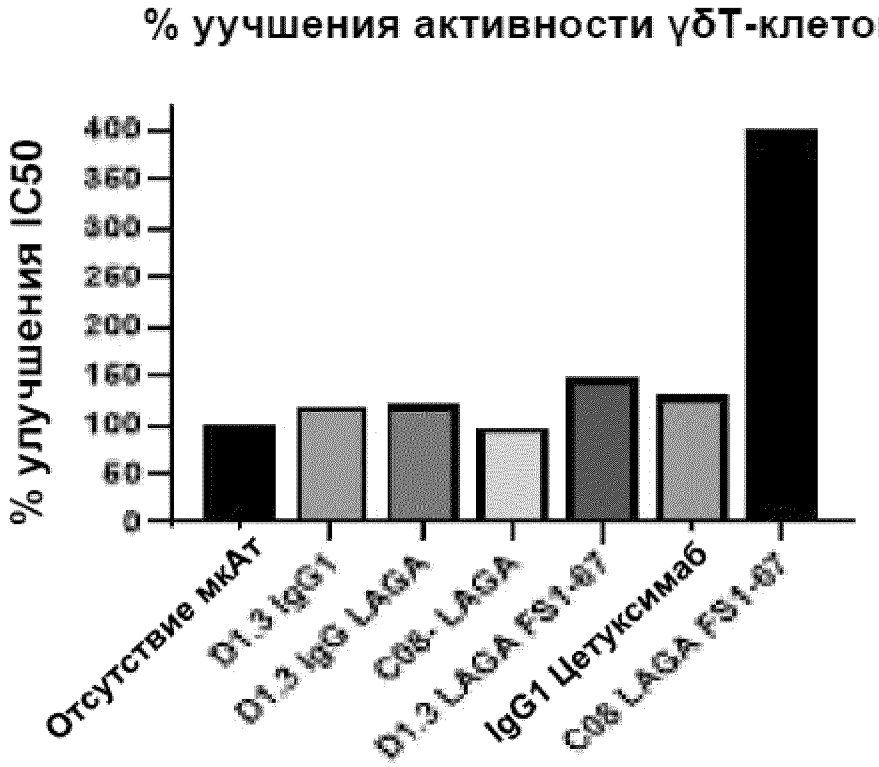
	5 ч	12 ч	24 ч
Отсутствие мкАт	100%	100%	100%
Д1,3	114%	99%	112%
IgG LAGA Д1,3	106%	96%	113%
D1,3 LAGA цетуксимаб	132%	123%	118%
Цетуксимаб	121%	110%	126%
C08- LAGA	99%	84%	101%
E07-LAGA	115%	117%	127%
G04-LAGA	141%	128%	163%
C08 LAGA цетуксимаб	334%	313%	245%
E07 LAGA цетуксимаб	208%	216%	187%
G04 LAGA цетуксимаб	197%	210%	158%

Фиг. 22

I

	EC50		
	γδT-клетка	Соотношение T:E	% улучшения
Отсутствие мкАт	4102	0,24	100%
IgG1 Д1,3	3651	0,27	112%
IgG LAGA Д1,3	3640	0,27	113%
E07-LAGA	3229	0,31	127%
FS1-67 Д1,3	2794	0,36	147%
Цетуксимаб	3246	0,31	126%
E07 FS1-67	1581	0,63	259%

J

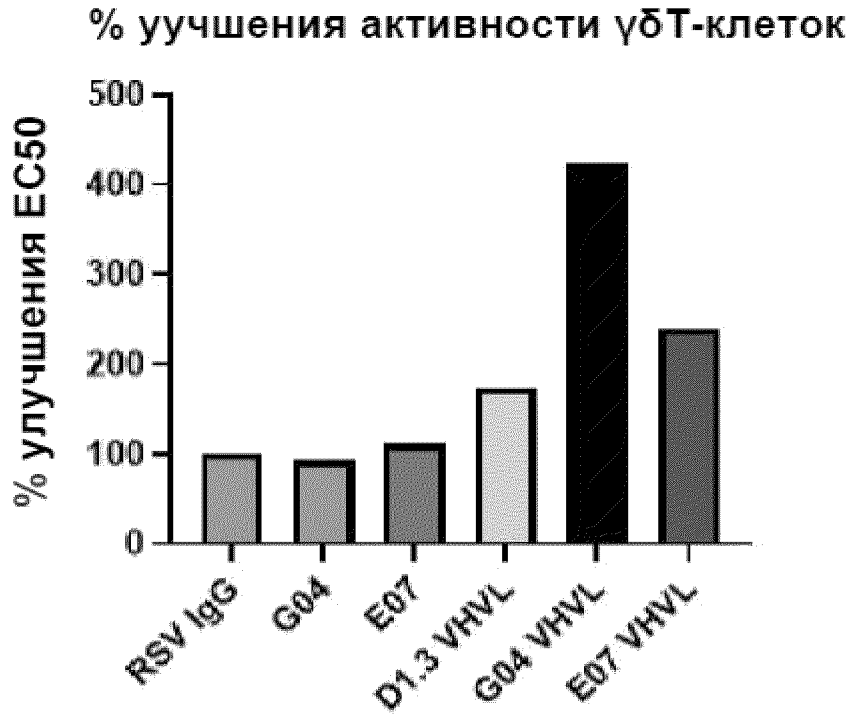


Фиг. 22 (продолжение)

A)

	γδT-клетка	EC50 Соотношение T:E	% улучшения
RSV IgG	1988	1,99	100%
G04	2128	2,13	93%
E07	1775	1,78	112%
VHVL Д1,3	1143	1,14	174%
G04 VHVL	470	0,47	423%
E07 VHVL	828	0,83	240%

B)



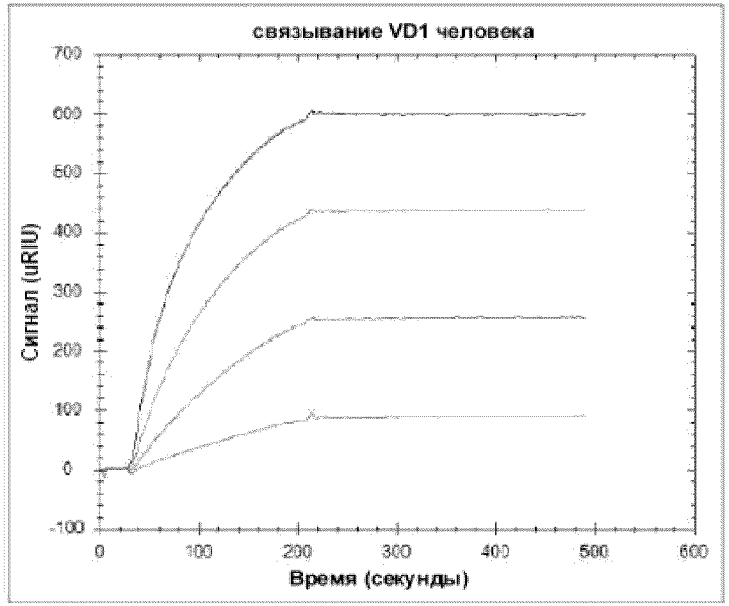
Фиг. 23

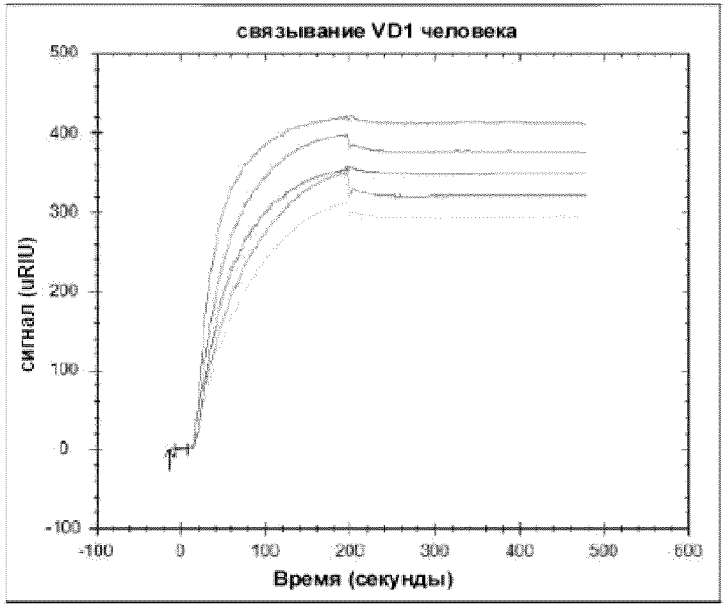
Фиг. 24

мкАт к Vδ1

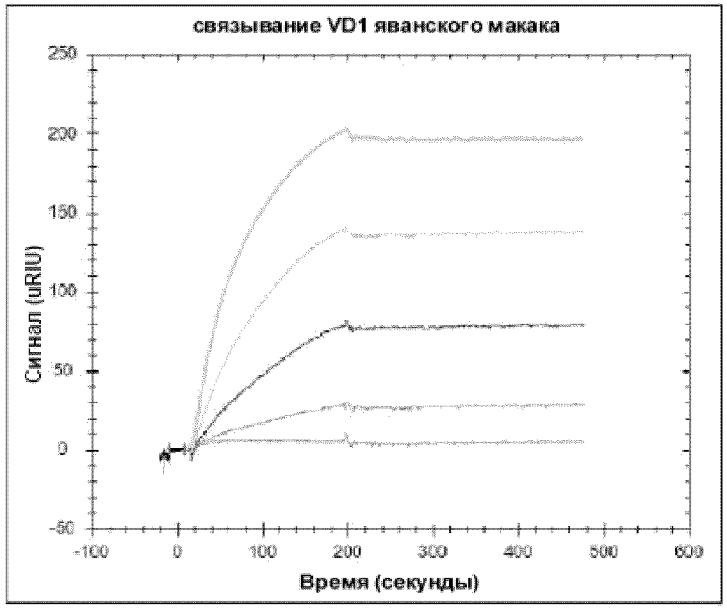
BiTE к Vδ1/ CD19

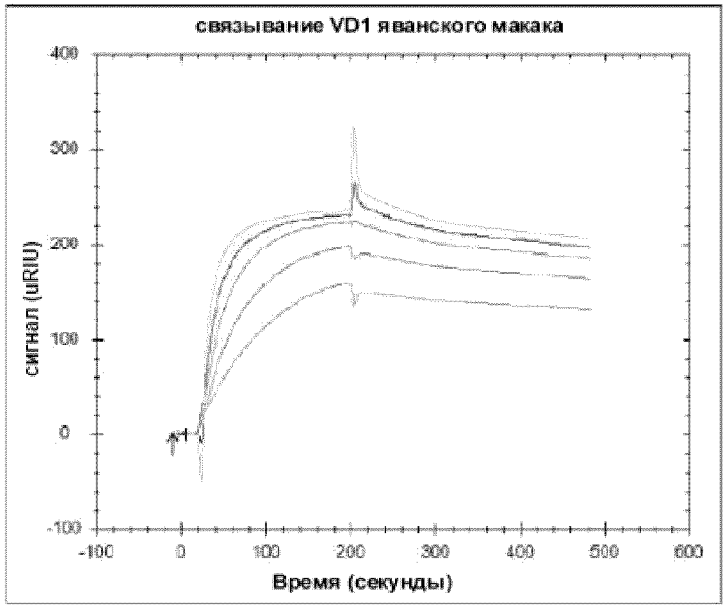
Vδ1 человека





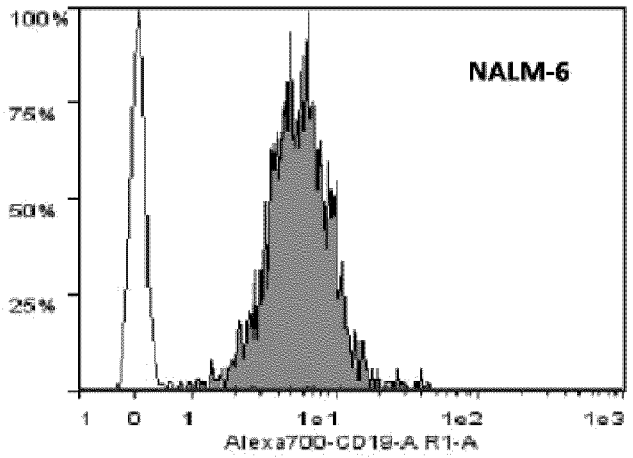
Vδ1 яванского макака





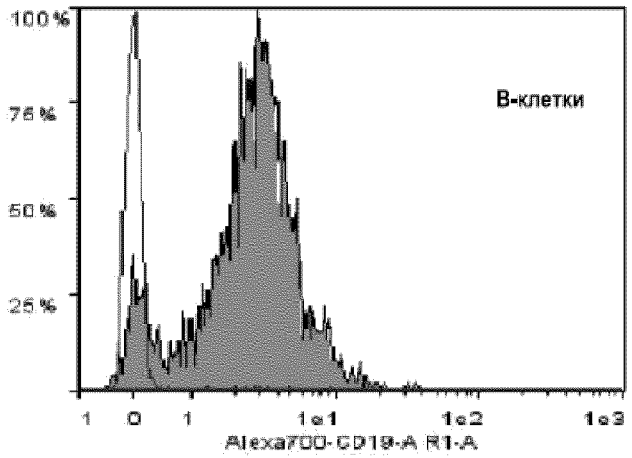
Фиг. 25A

Экспрессия CD19 NALM-6



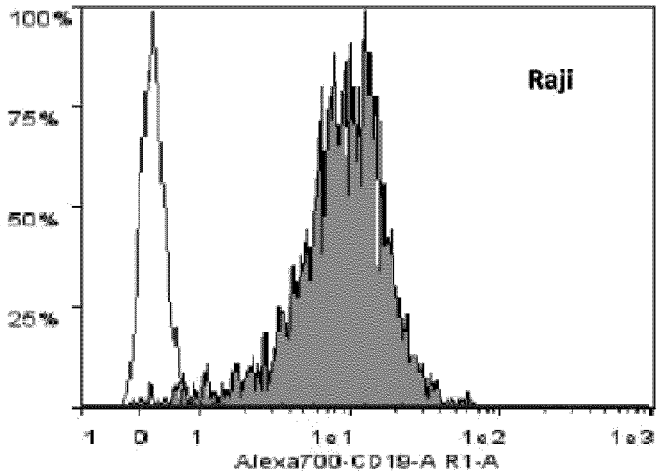
Цвет	Популяция	Событие	Общий %	Медиана
	Общий MFI CD19 [CD19 NALM-6]	1042	77,47	5,72
	Общий MFI CD19 [неокрашенные NALM-6]	2342	87,00	0,06

Экспрессия CD19 B-клетками



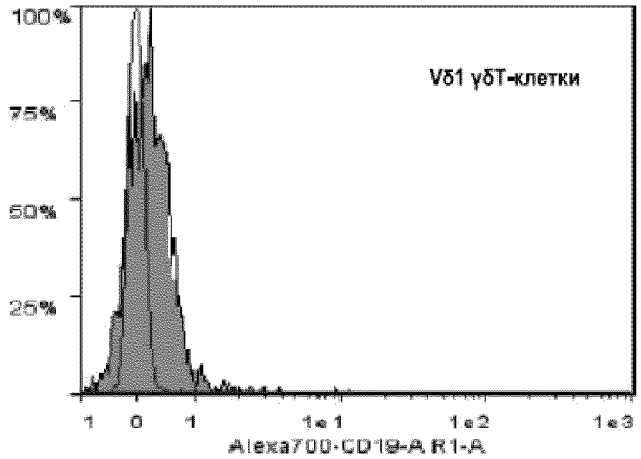
Цвет	Популяция	Явление	Общий %	Медиана
	Общий MFI CD19 [CD19 B-клеток]	1949	87,56	2,75
	Общий MFI CD19 [Неокрашенные B-клетки]	2874	94,20	-0,03

Экспрессия CD19 Raji



Цвет	Популяция	Явление	Общий %	Медиана
	Общий MFI CD19 [Экспрессия CD19 Raji]	1657	47,37	9,29
	Общий MFI CD19 [неокрашенные Raji)	2125	51,77	0,21

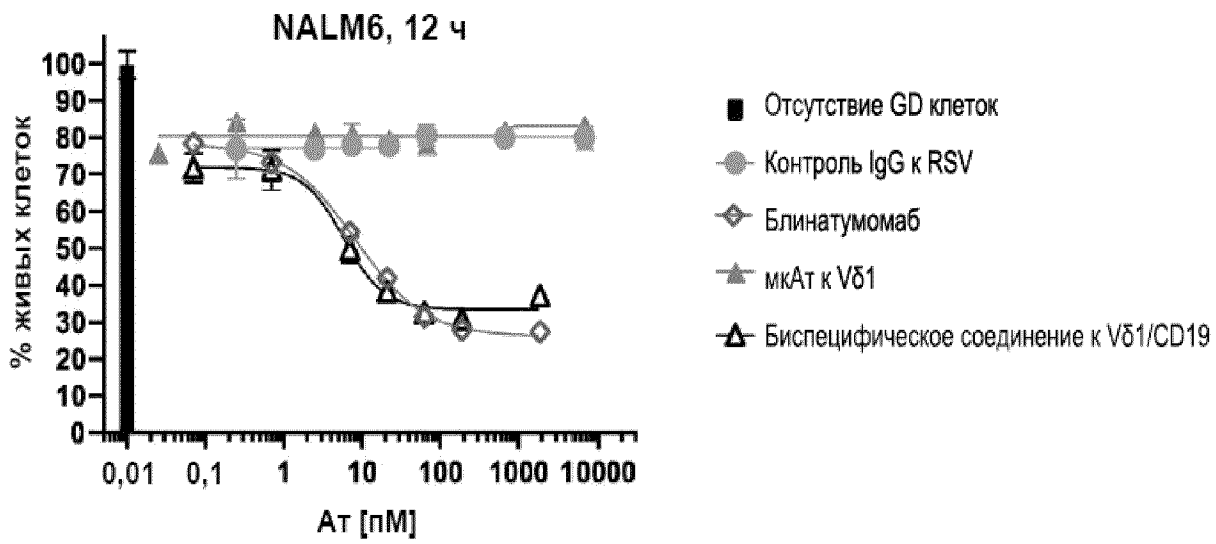
Экспрессия CD19 VD1 GD T-клеток



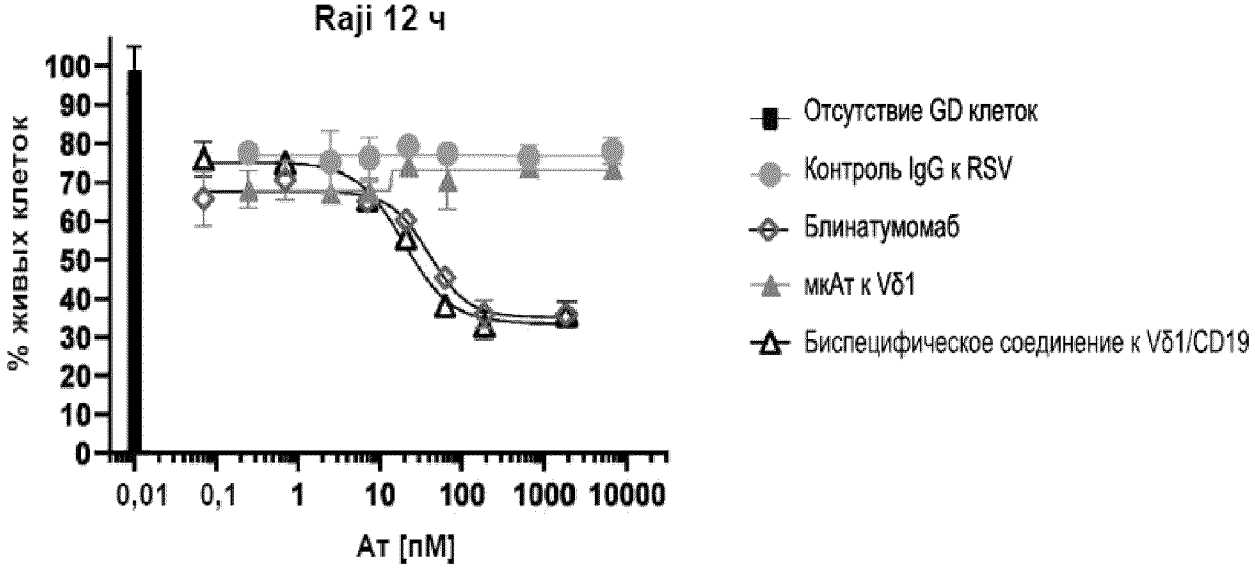
Цвет	Популяция	Явление	Общий %	Медиана
	Общий MFI CD19 [Экспрессия CD19 VD1]	1301	49,24	0,20
	Общий MFI CD19 [неокрашенные VD1 GD T-клетки]	1232	47,75	-0,03

Фиг. 25, продолжение

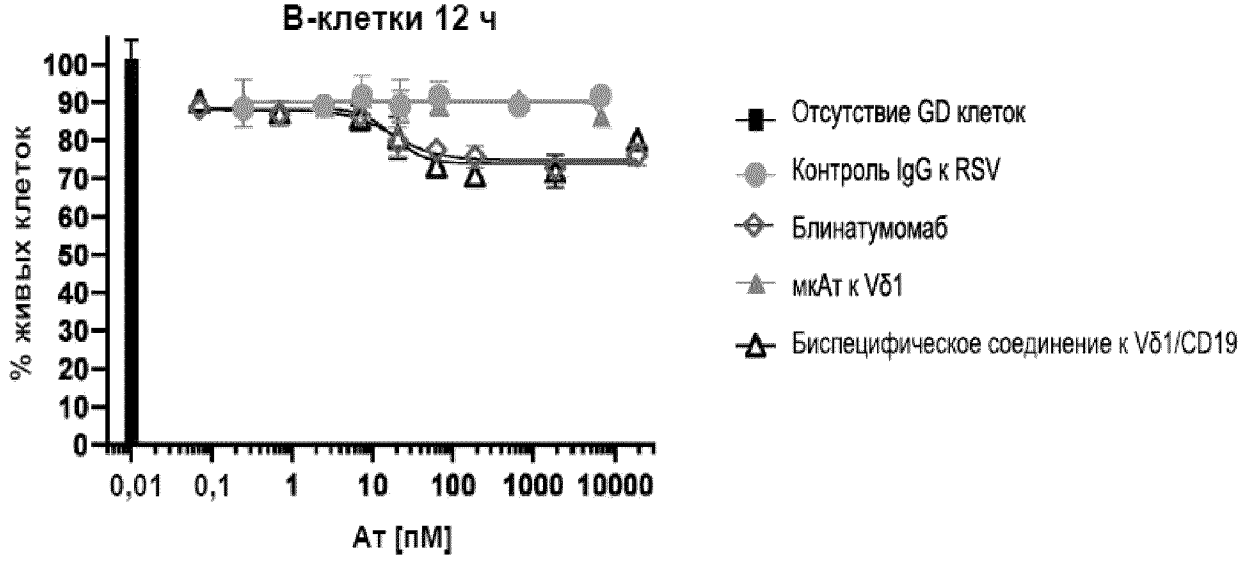
B



C

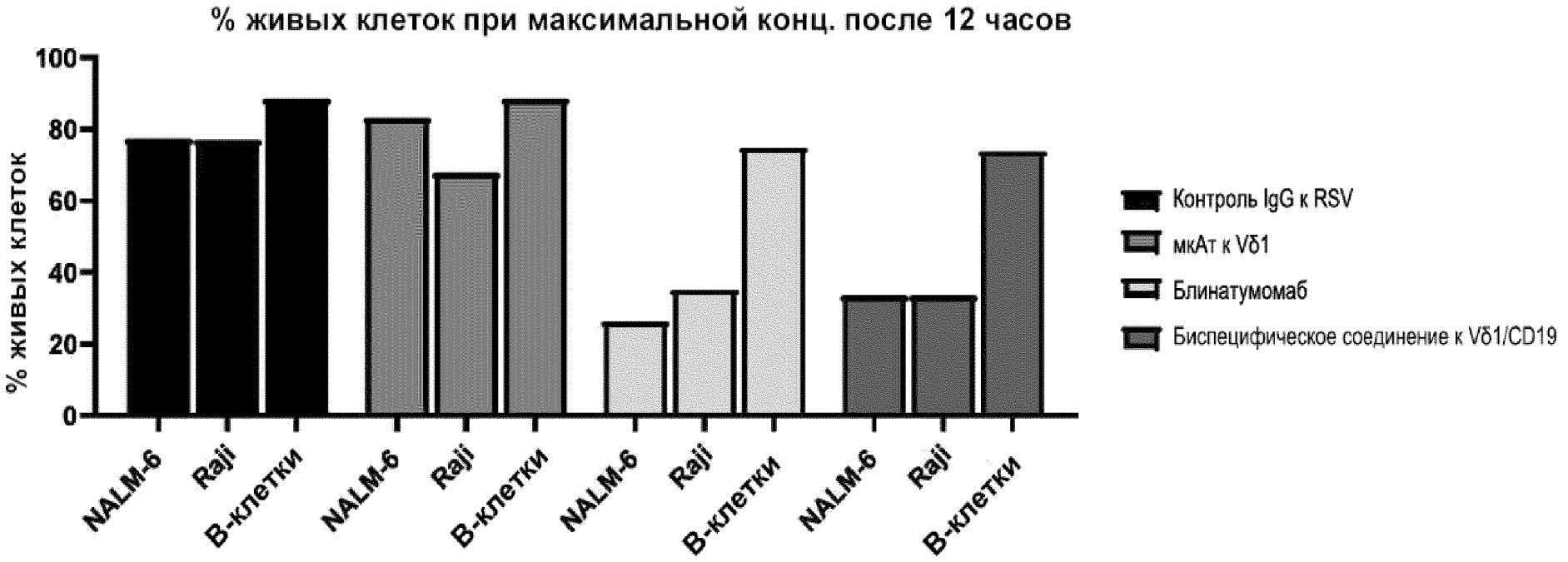


D



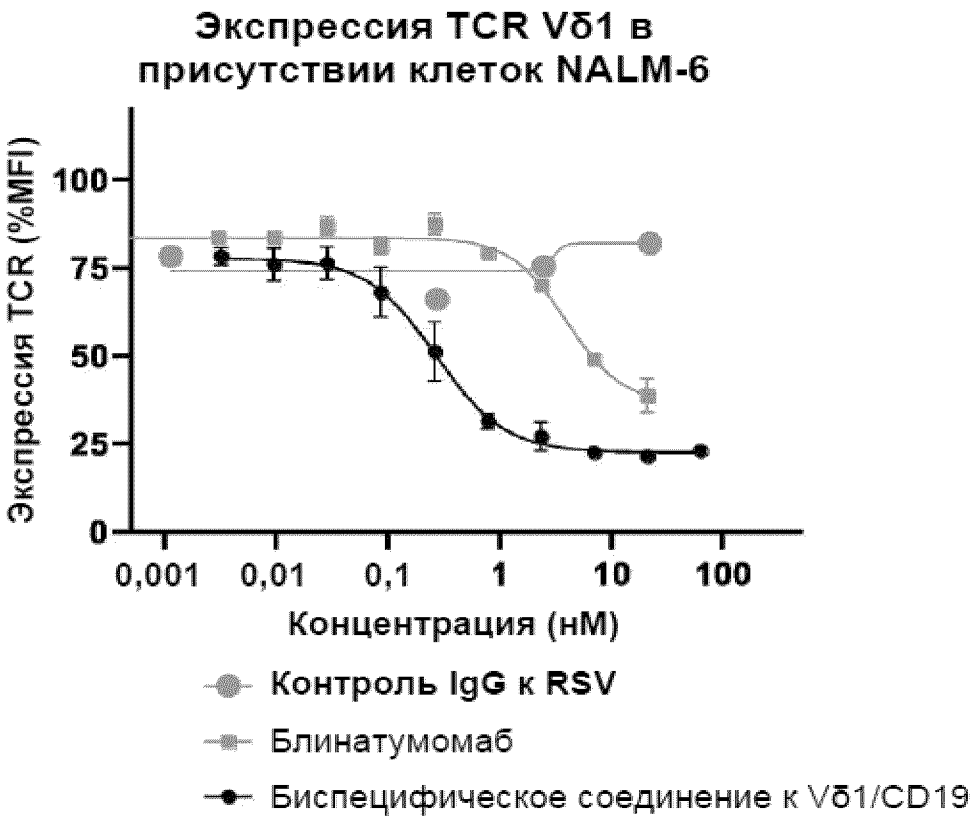
Фиг. 25, продолжение

E

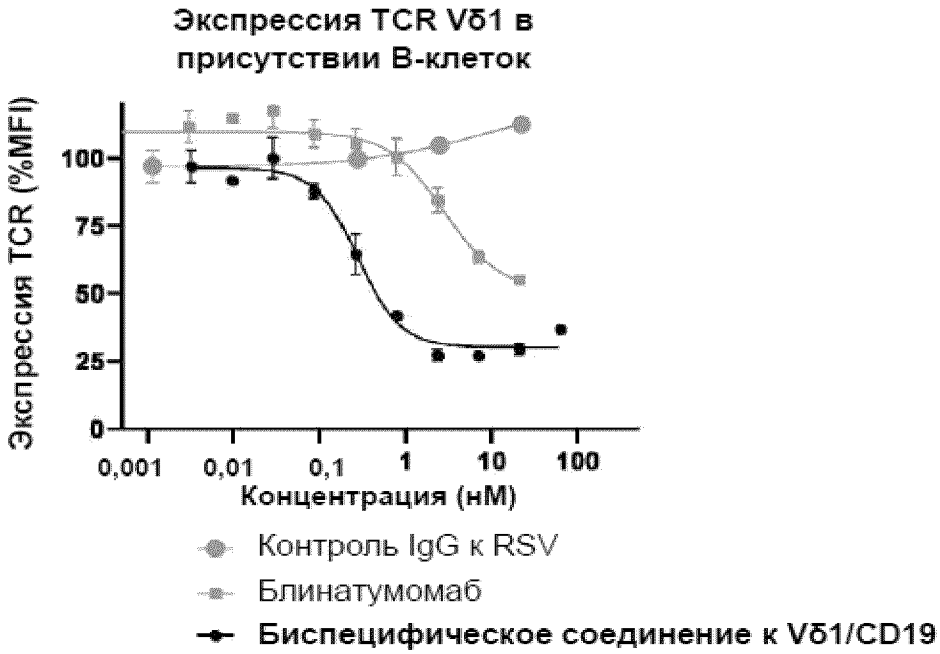


Фиг. 25, продолжение

F

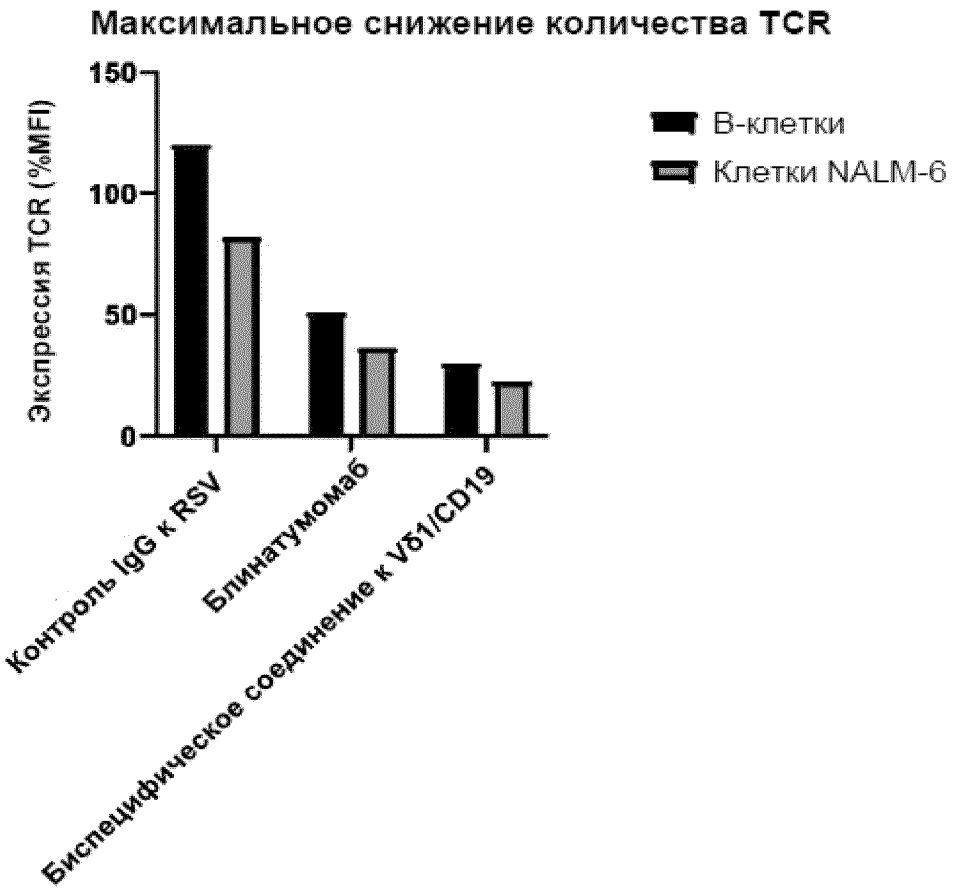


G

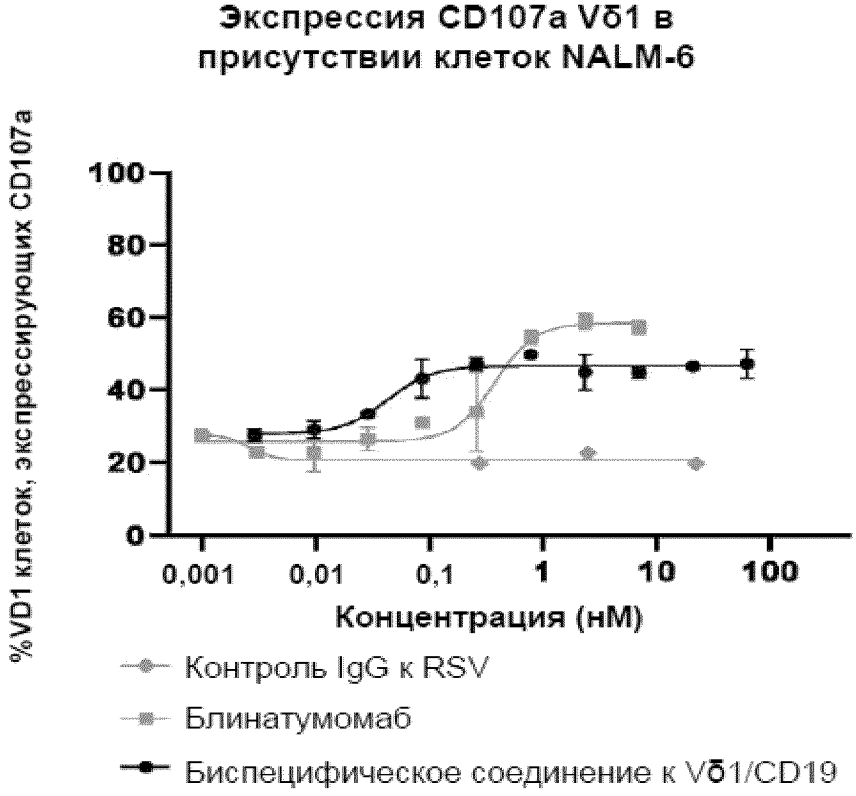


Фиг. 25, продолжение

H

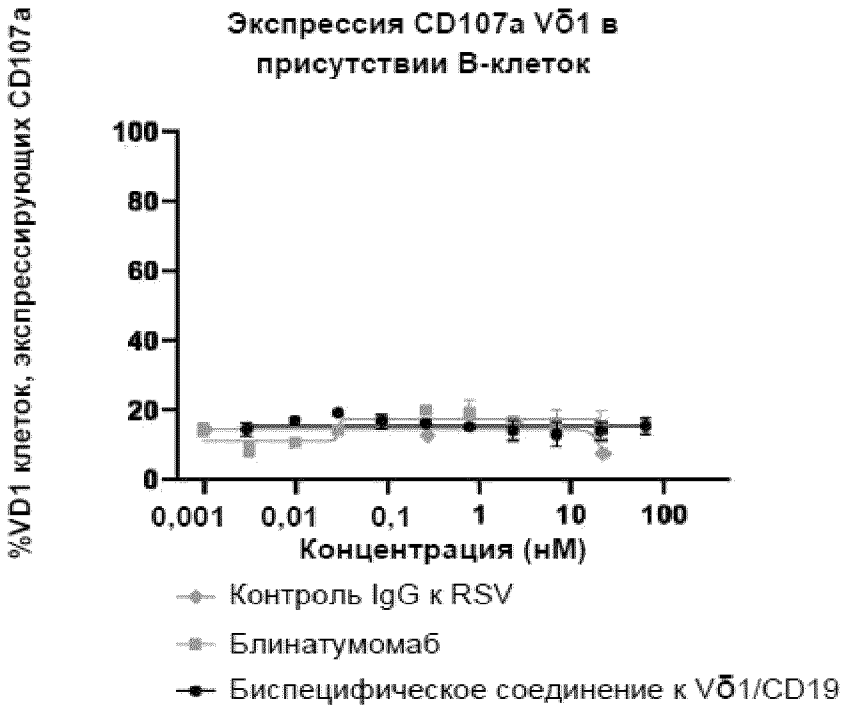


I

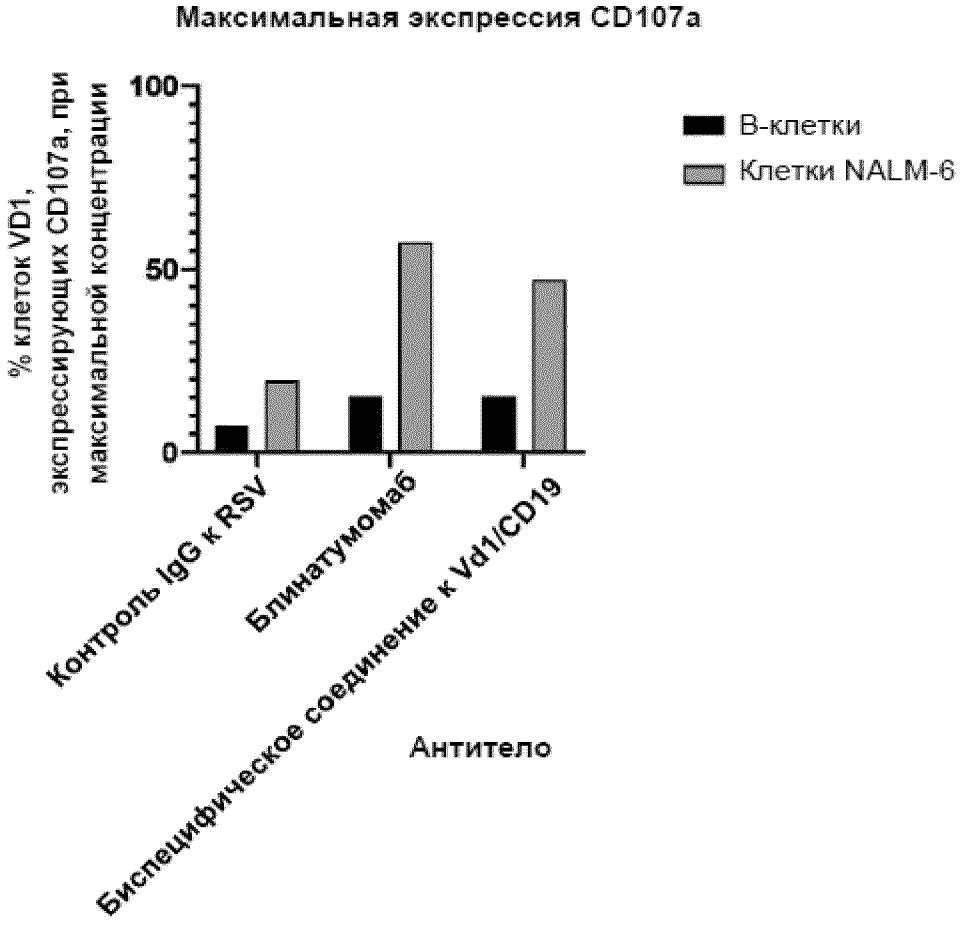


Фиг. 25, продолжение

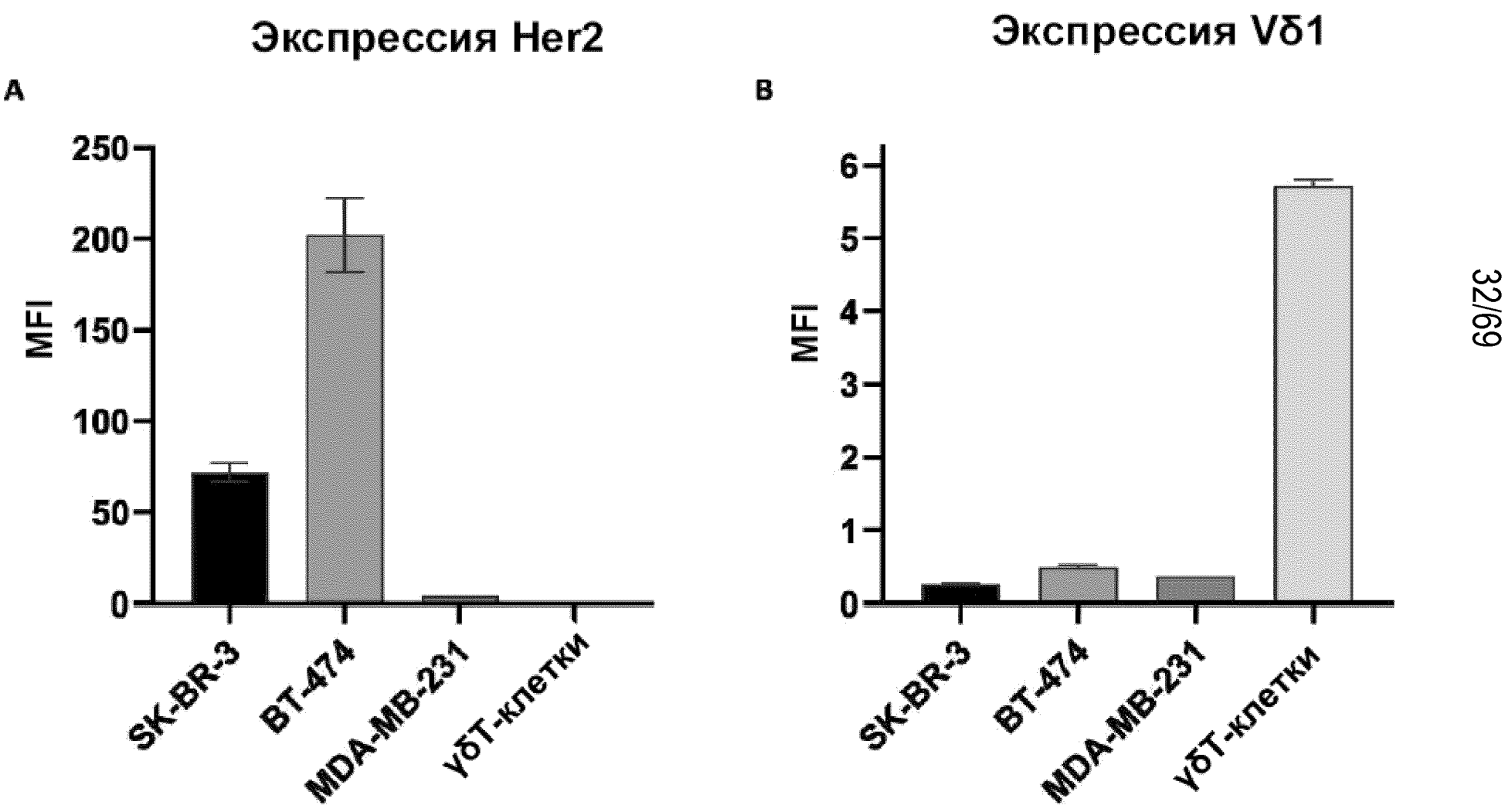
J



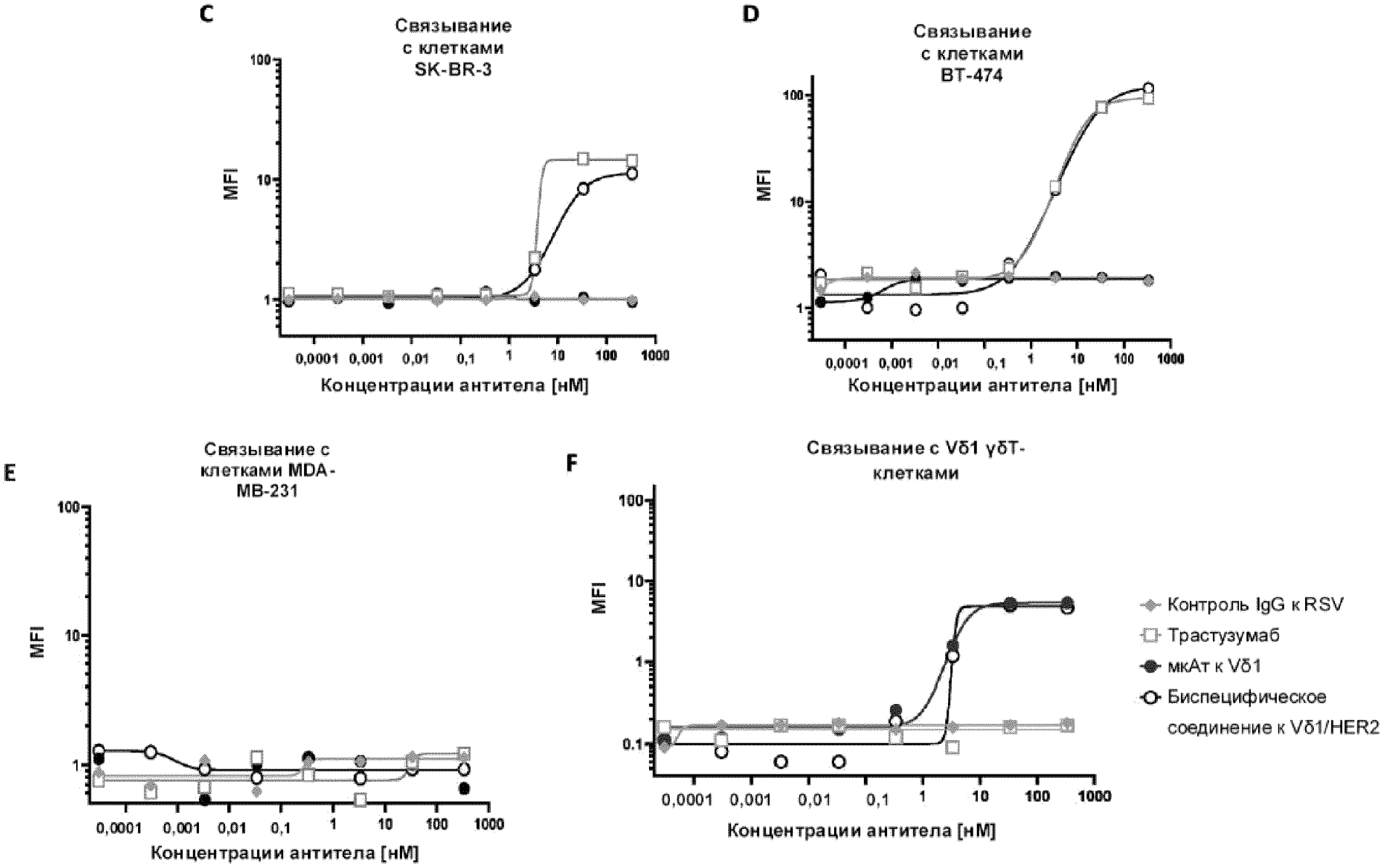
K



Фиг. 26

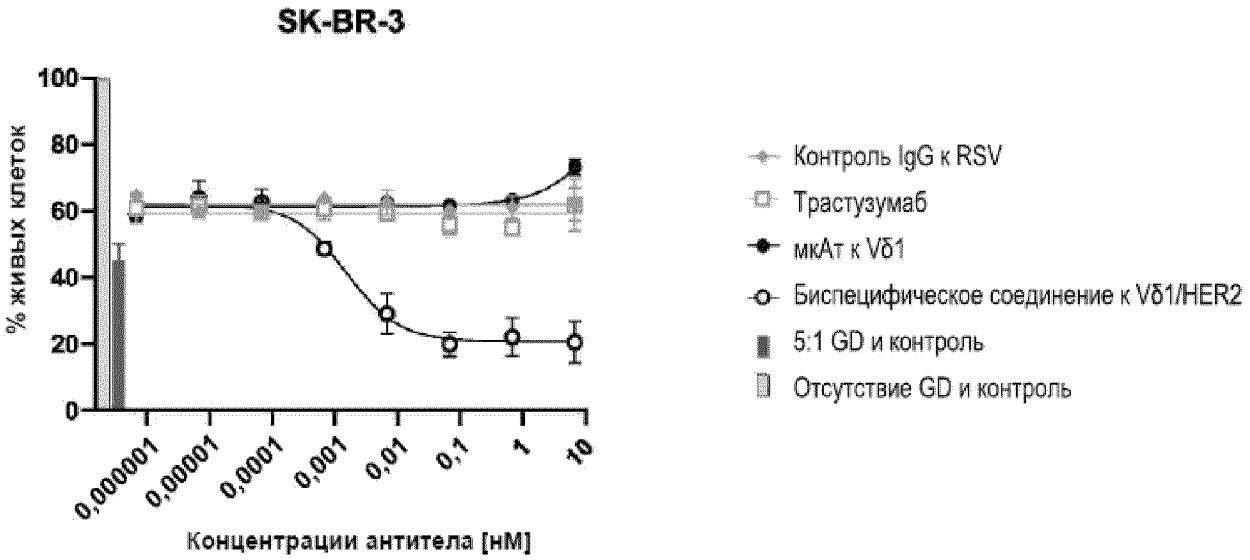

Экспрессия Her2
A
MFI
250
200
150
100
50
0
SK-BR-3
BT-474
MDA-MB-231
γδT-клетки
Экспрессия Vδ1
B
MFI
6
5
4
3
2
1
0
SK-BR-3
BT-474
MDA-MB-231
γδT-клетки

Фиг. 26, продолжение

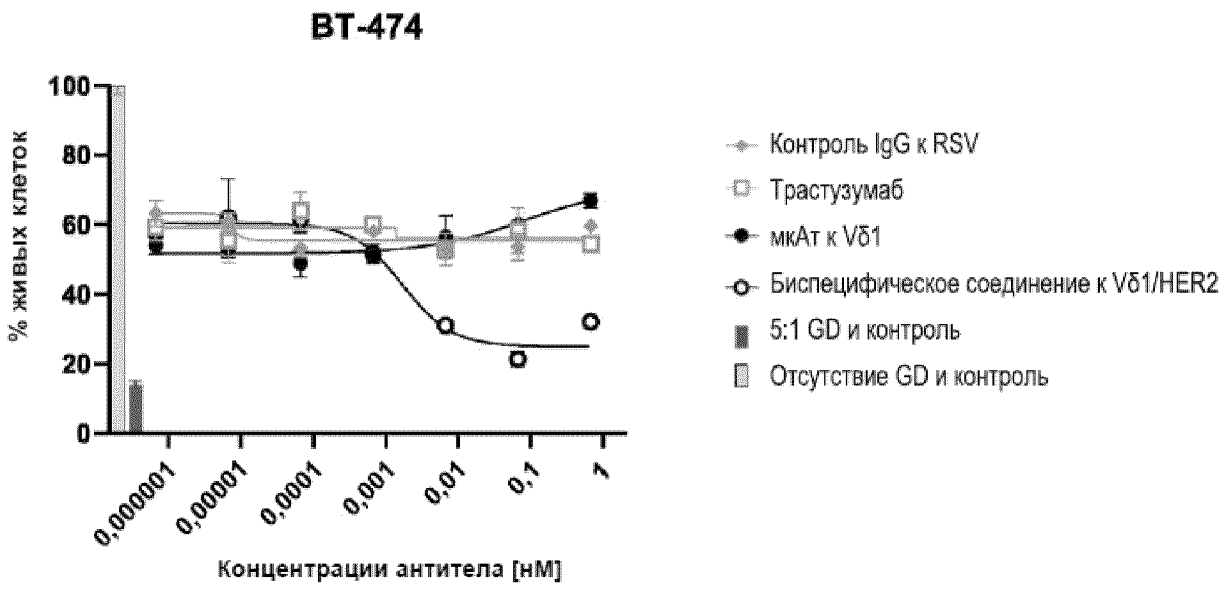


Фиг. 26, продолжение

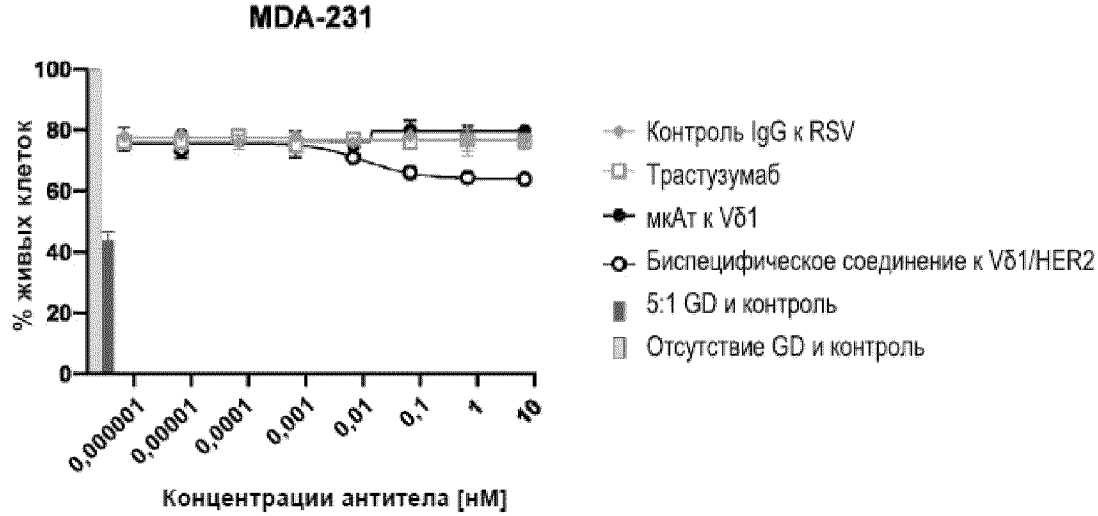
G



H

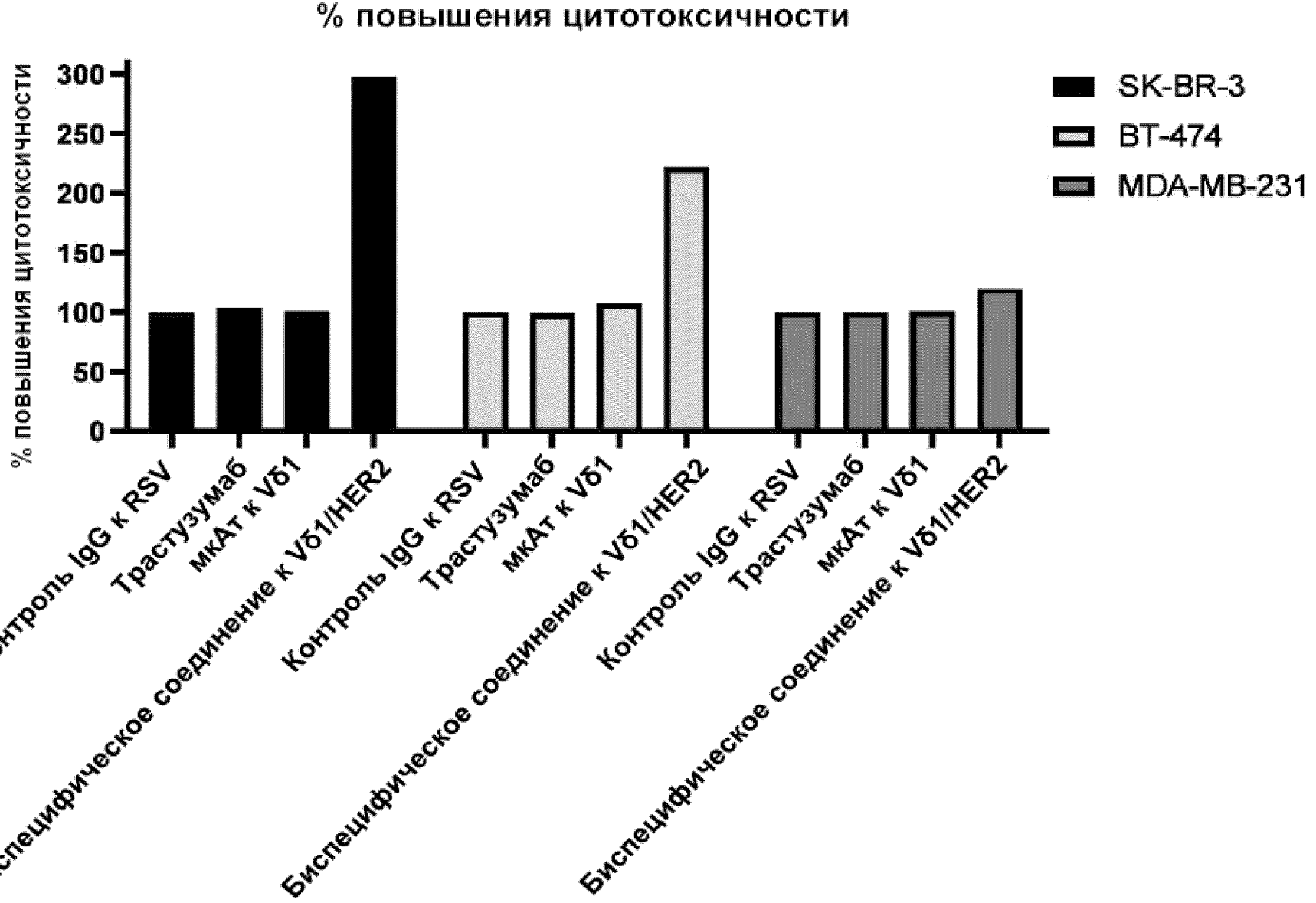


I



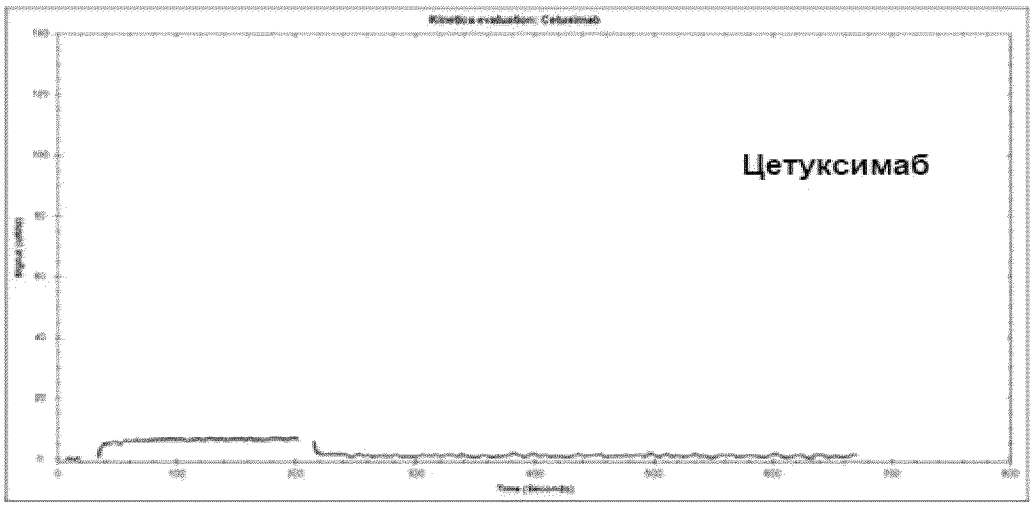
Фиг. 26, продолжение

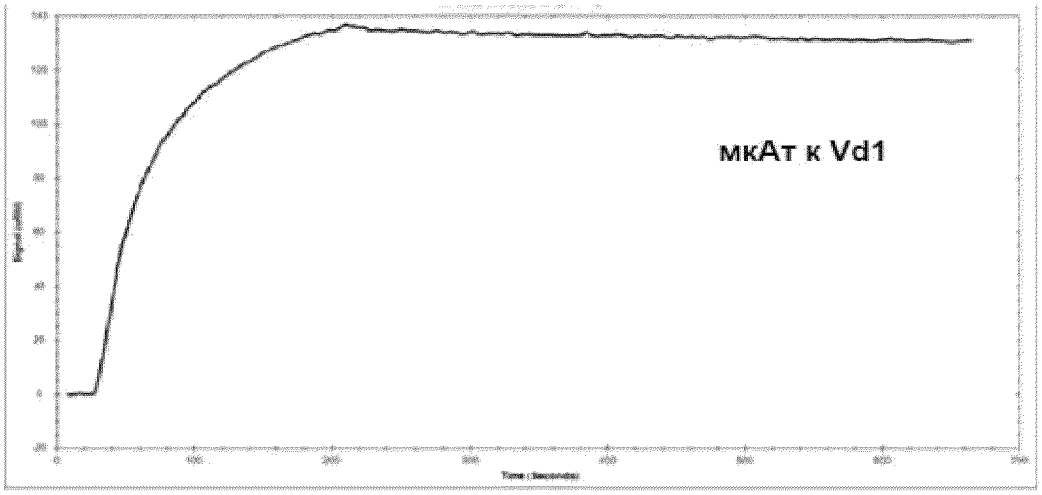
J

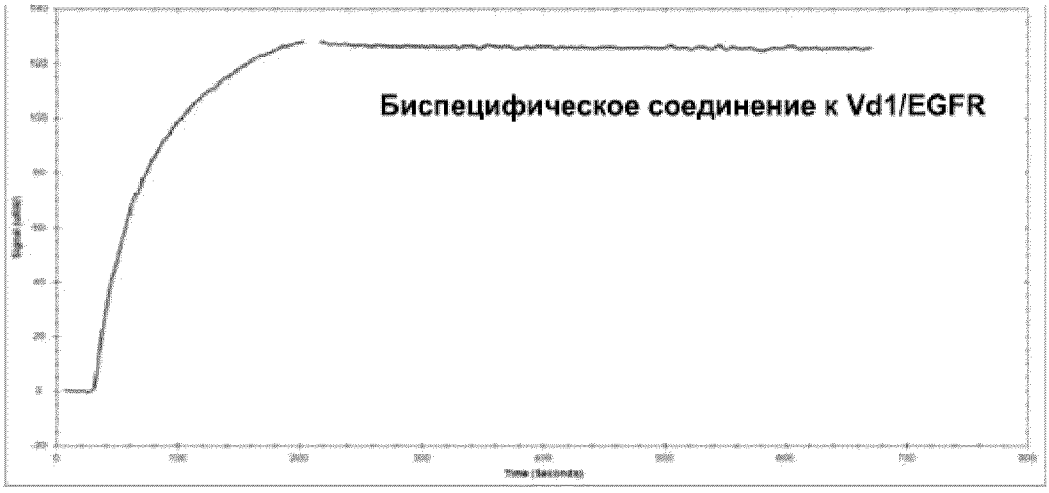


Фиг. 27A

связывание с Vd1 человека

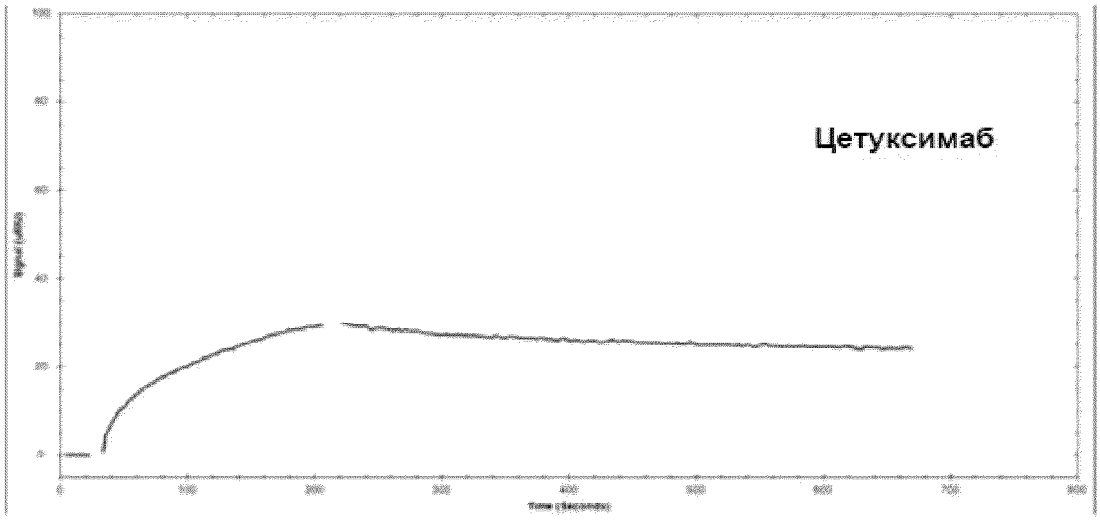


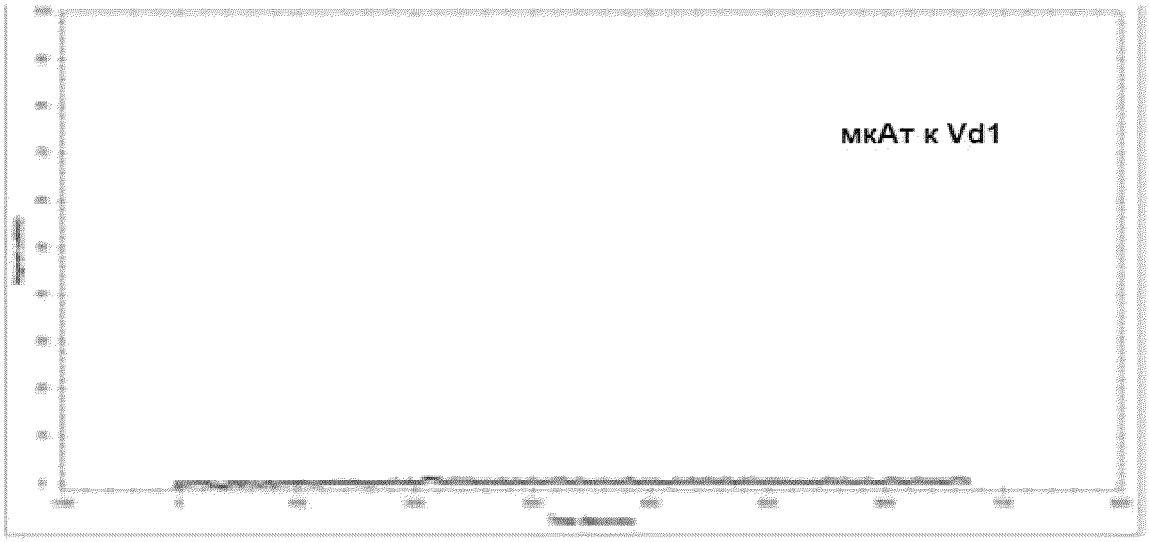


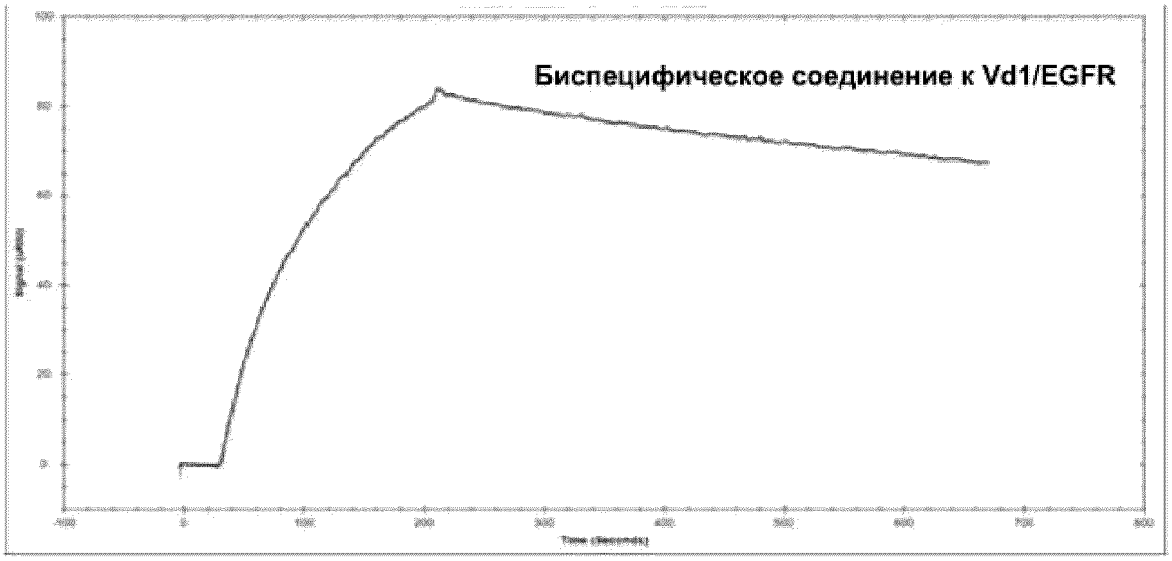


Фиг. 27B

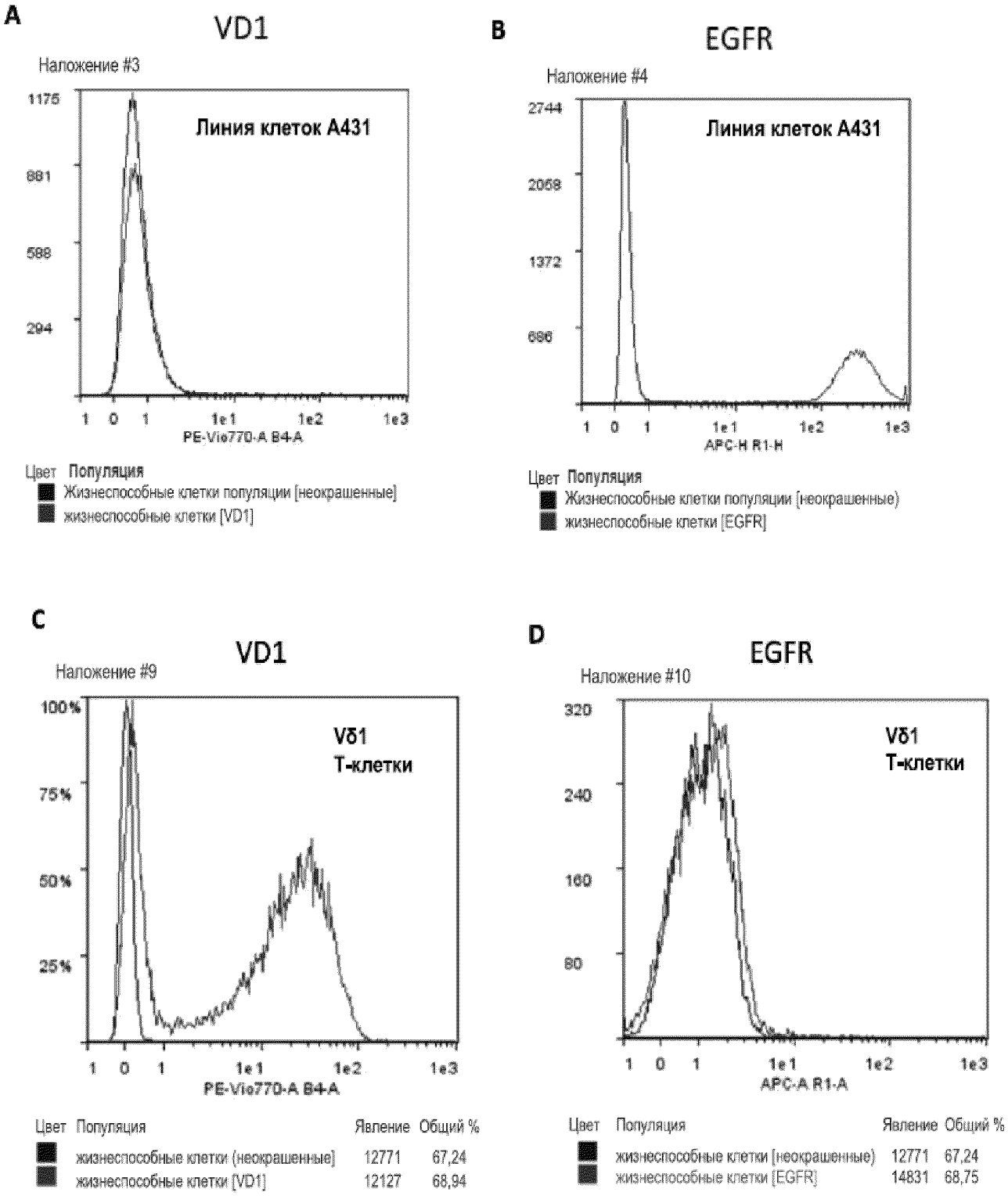
Связывание с EGFR человека



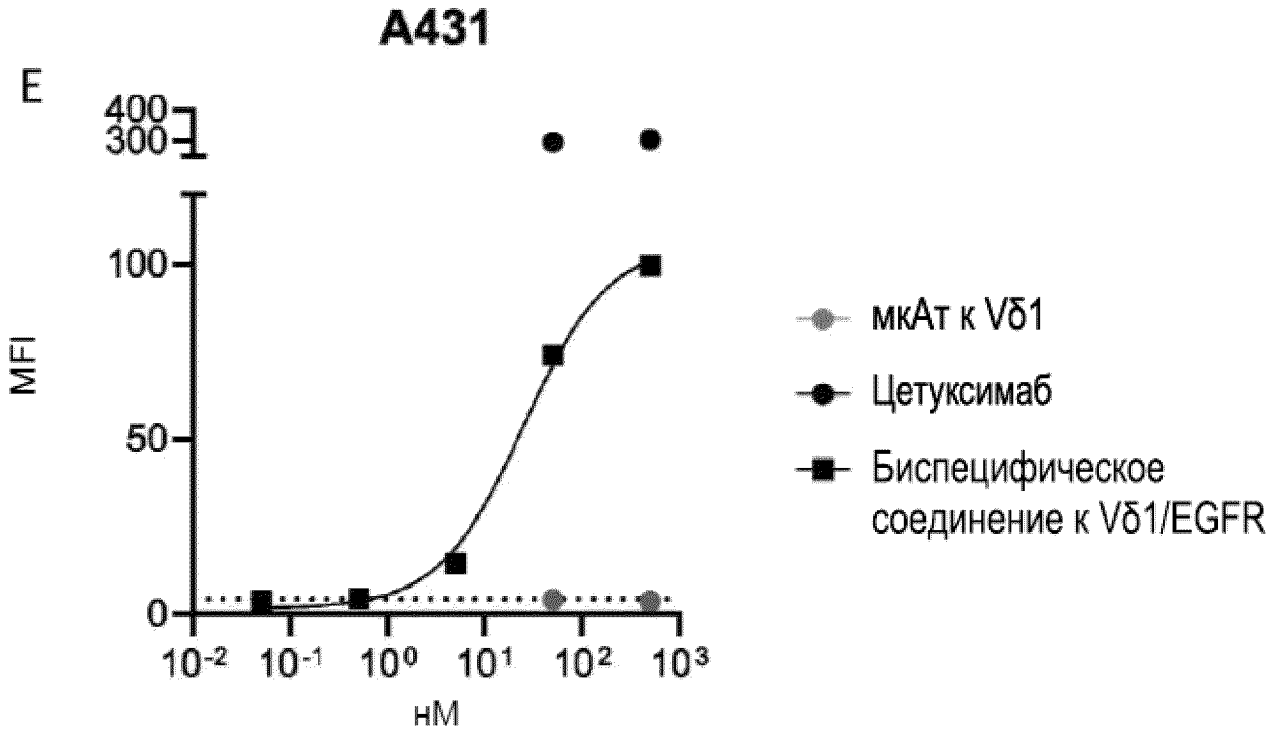


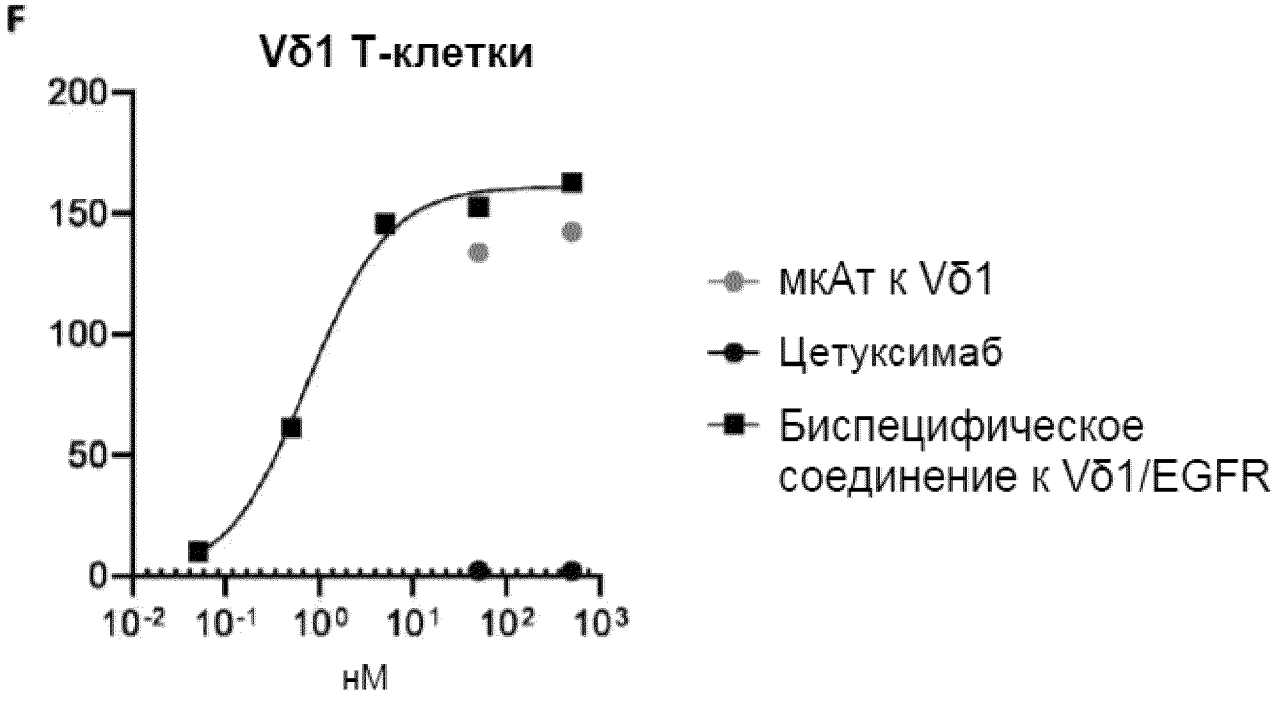


Фиг. 28

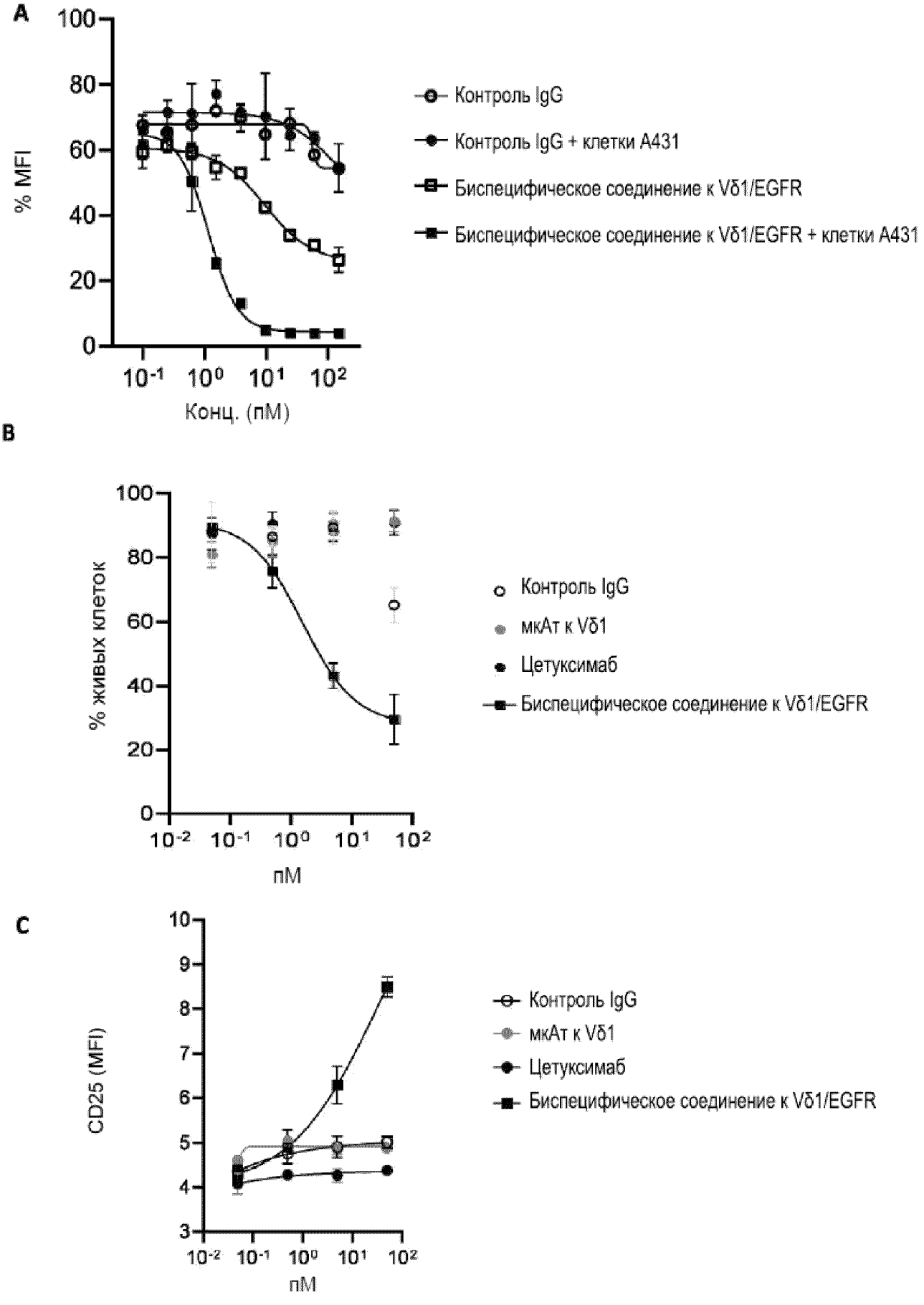

A
VD1
Наложение #3
1175
881
588
294
Линия клеток A431
1 0 1 1e1 1e2 1e3
PE-Vio770-A B4-A
Цвет Популяция
Жизнеспособные клетки популяции [неокрашенные]
жизнеспособные клетки [VD1]
B
EGFR
Наложение #4
2744
2058
1372
686
Линия клеток A431
1 0 1 1e1 1e2 1e3
APC-H R1-H
Цвет Популяция
Жизнеспособные клетки популяции [неокрашенные]
жизнеспособные клетки [EGFR]
C
VD1
Наложение #9
100%
75%
50%
25%
Vδ1
Т-клетки
1 0 1 1e1 1e2 1e3
PE-Vio770-A B4-A
Цвет Популяция Явление Общий %
жизнеспособные клетки (неокрашенные) 12771 67,24
жизнеспособные клетки [VD1] 12127 68,94
D
EGFR
Наложение #10
320
240
160
80
Vδ1
Т-клетки
1 0 1 1e1 1e2 1e3
APC-A R1-A
Цвет Популяция Явление Общий %
жизнеспособные клетки [неокрашенные] 12771 67,24
жизнеспособные клетки [EGFR] 14831 68,75

Фиг. 28, продолжение

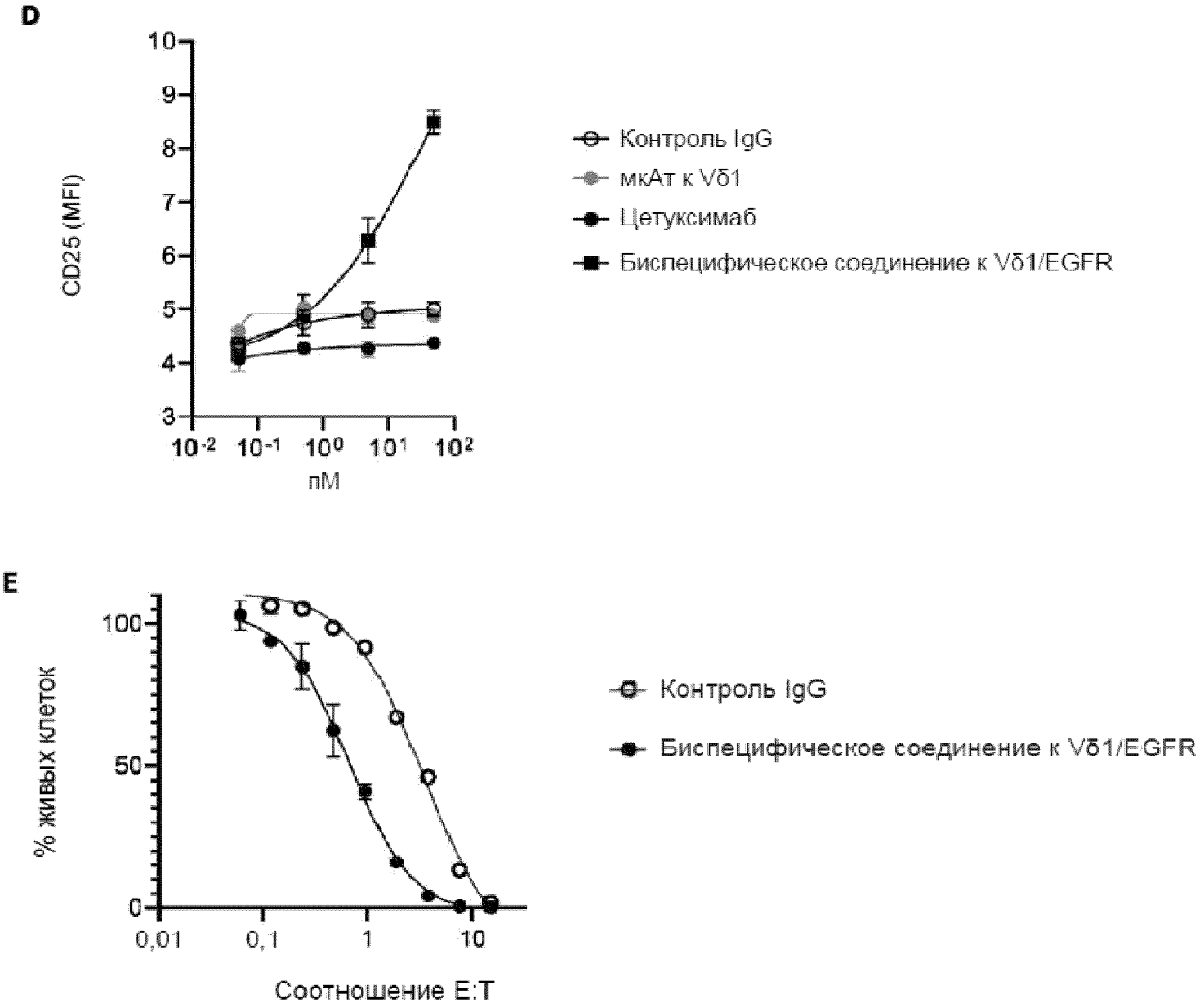




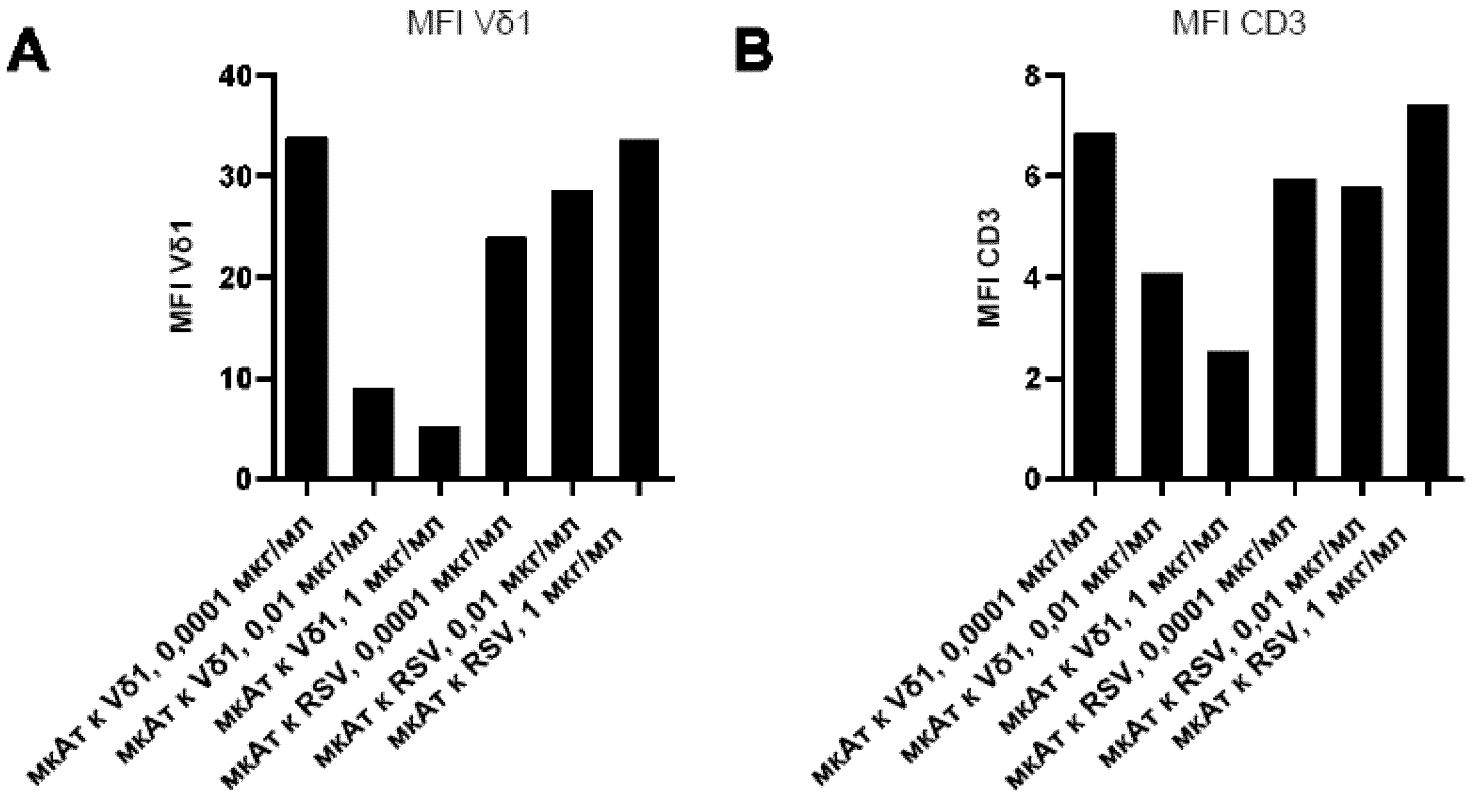
Фиг. 29


A
100
80
60
40
20
0
% MFI
10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2}
Конц. (пМ)
Контроль IgG
Контроль IgG + клетки A431
Биспецифическое соединение к Vδ1/EGFR
Биспецифическое соединение к Vδ1/EGFR + клетки A431
B
100
80
60
40
20
0
% живых клеток
10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2}
пМ
Контроль IgG
мкАт к Vδ1
Цетуксимаб
Биспецифическое соединение к Vδ1/EGFR
C
10
9
8
7
6
5
4
3
CD25 (MFI)
10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2}
пМ
Контроль IgG
мкАт к Vδ1
Цетуксимаб
Биспецифическое соединение к Vδ1/EGFR

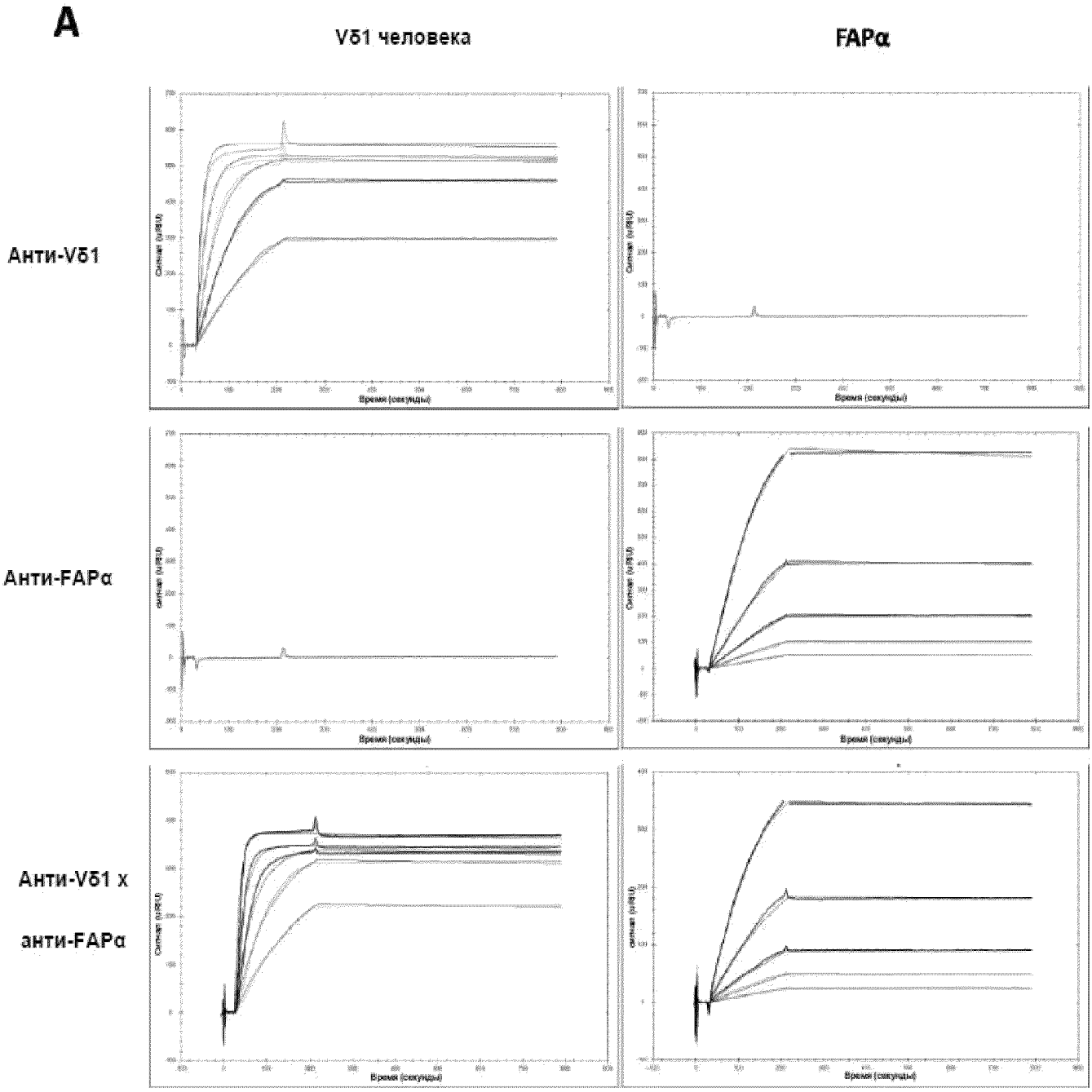
Фиг. 29, продолжение



Фиг. 30

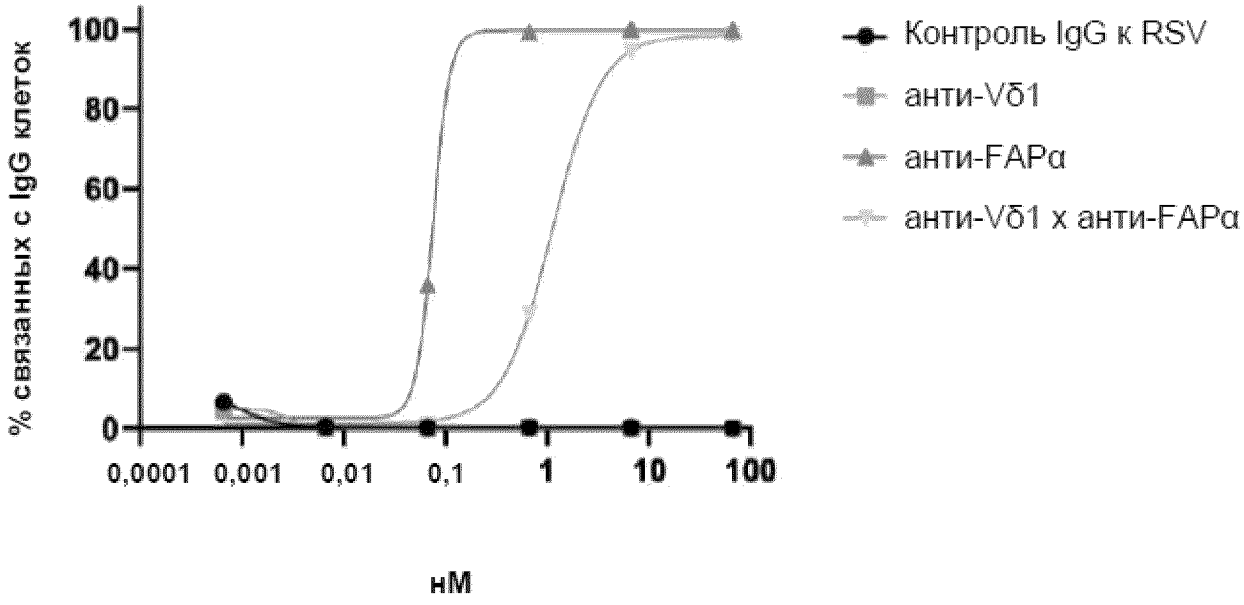

A
MFI Vδ1
MFI Vδ1
40
30
20
10
0
мкАт к Vδ1, 0,0001 мкг/мл
мкАт к Vδ1, 0,01 мкг/мл
мкАт к Vδ1, 1 мкг/мл
мкАт к RSV, 0,0001 мкг/мл
мкАт к RSV, 0,01 мкг/мл
мкАт к RSV, 1 мкг/мл
B
MFI CD3
MFI CD3
8
6
4
2
0
мкАт к Vδ1, 0,0001 мкг/мл
мкАт к Vδ1, 0,01 мкг/мл
мкАт к Vδ1, 1 мкг/мл
мкАт к RSV, 0,0001 мкг/мл
мкАт к RSV, 0,01 мкг/мл
мкАт к RSV, 1 мкг/мл

Фиг. 31

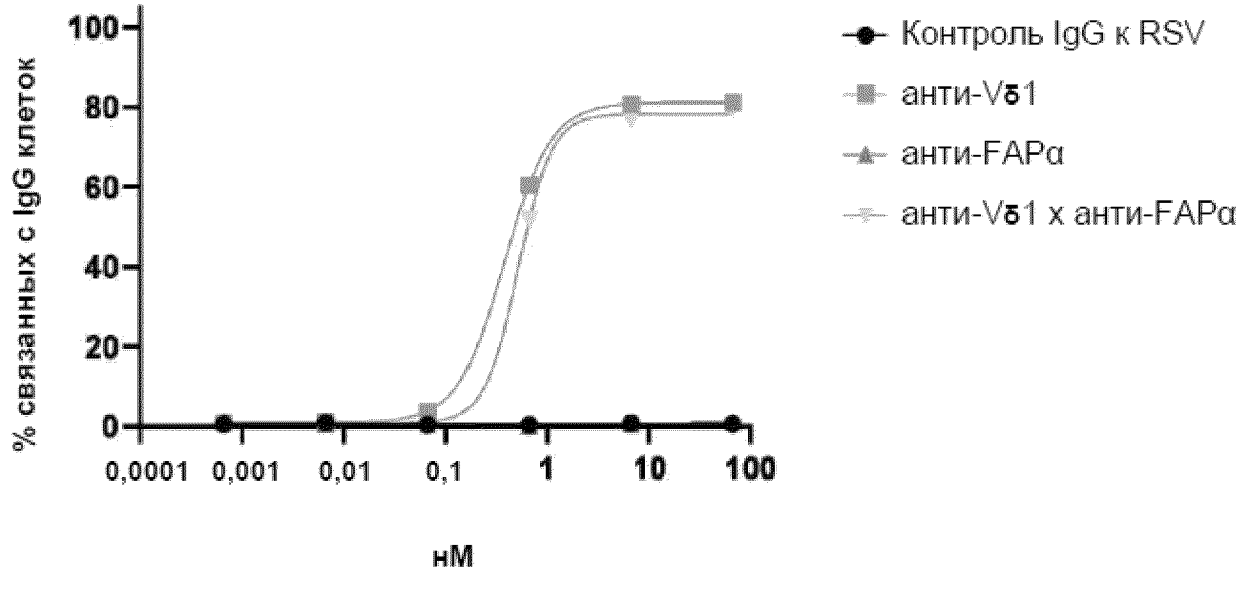

A
Vδ1 человека
FAPα
Анти-Vδ1
Анти-FAPα
Анти-Vδ1 x
анти-FAPα
Время (секунды)

Фиг. 31, продолжение

B

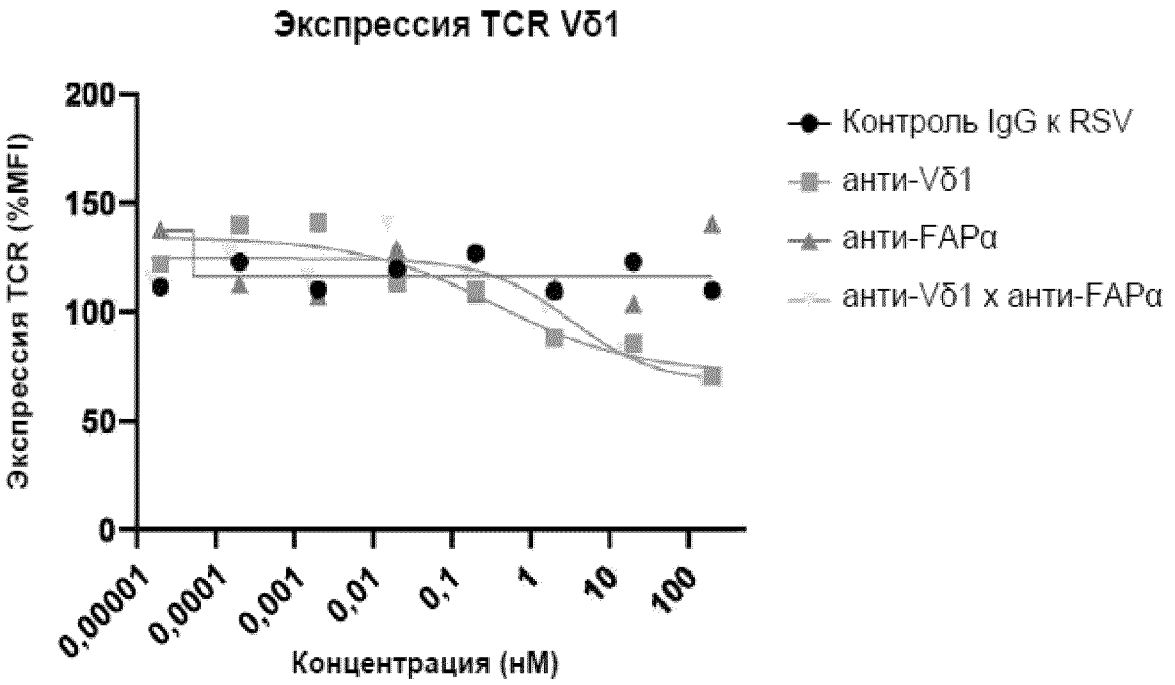


C

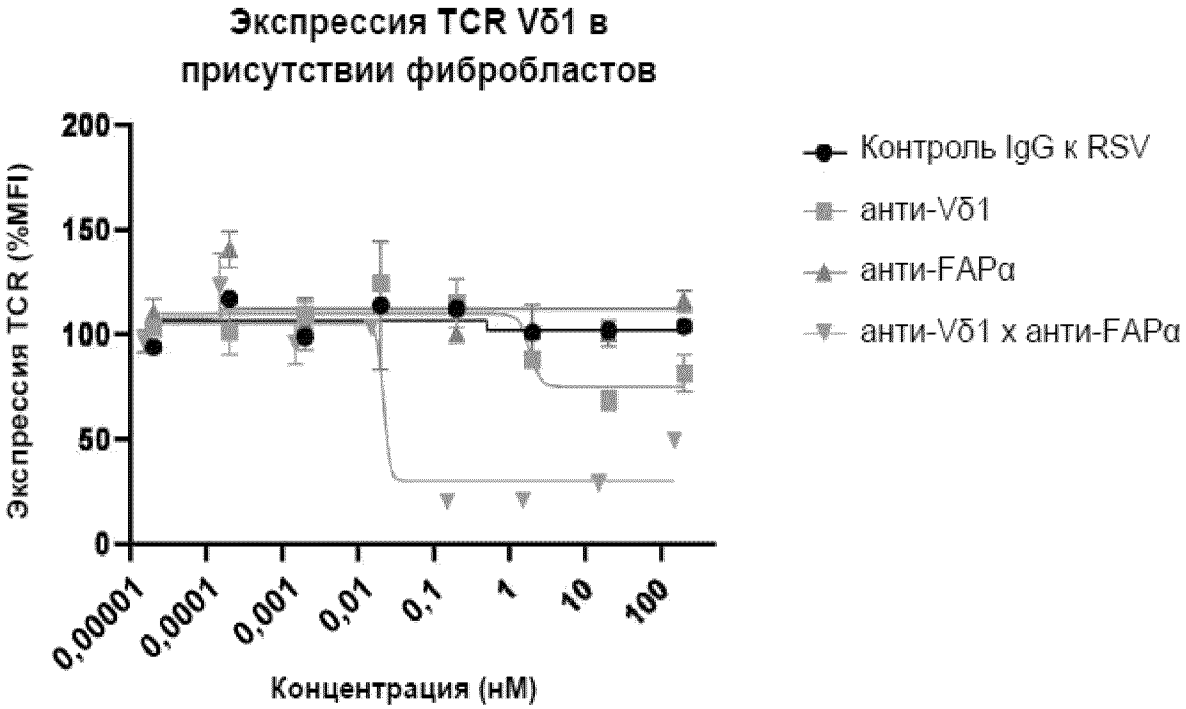


Фиг. 31, продолжение

D

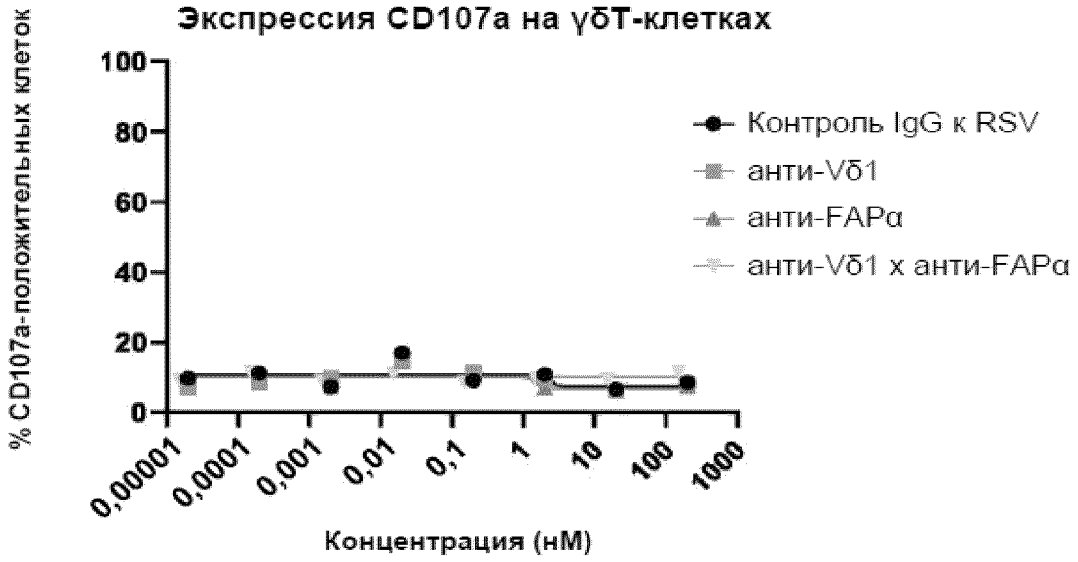


E

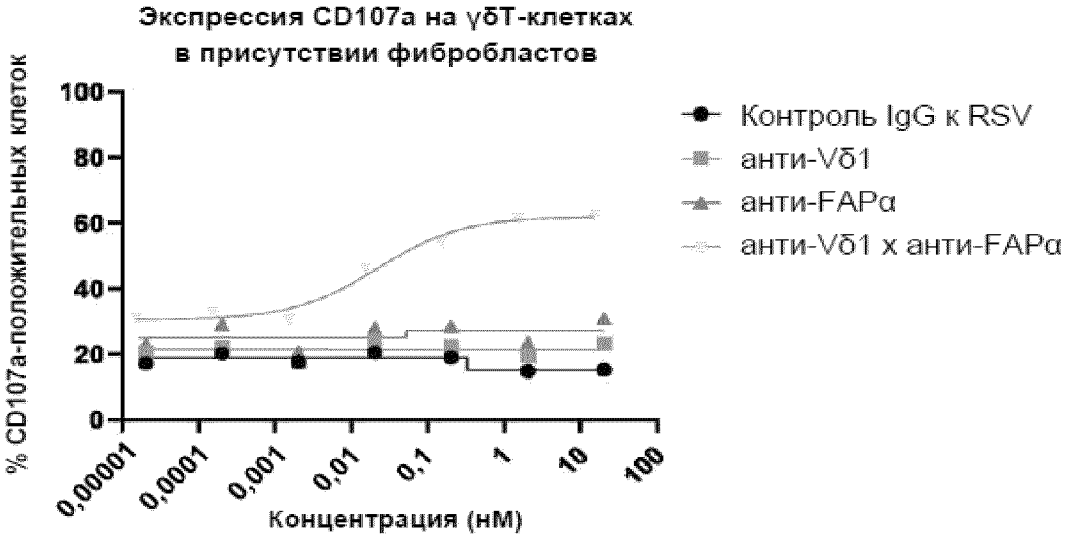


Фиг. 31, продолжение

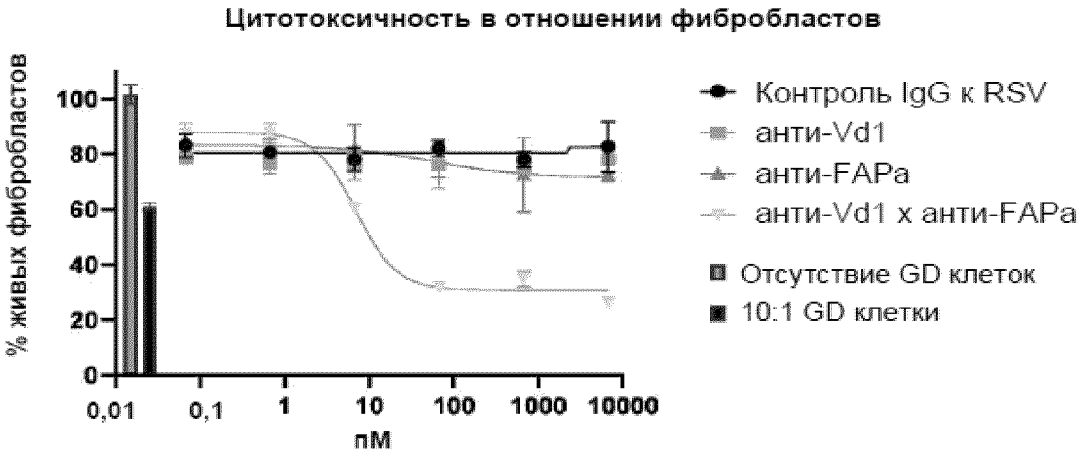
F



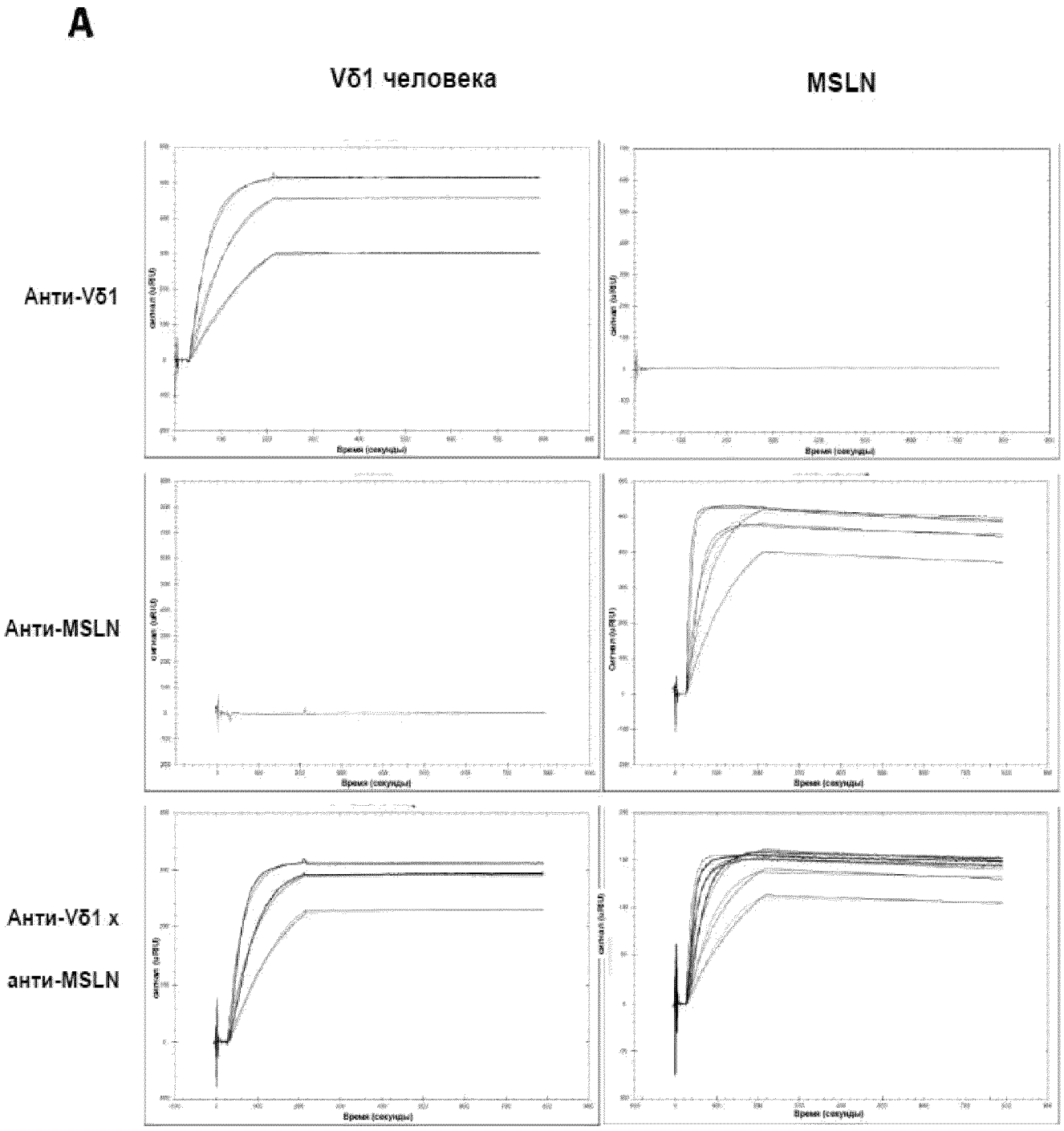
G



H

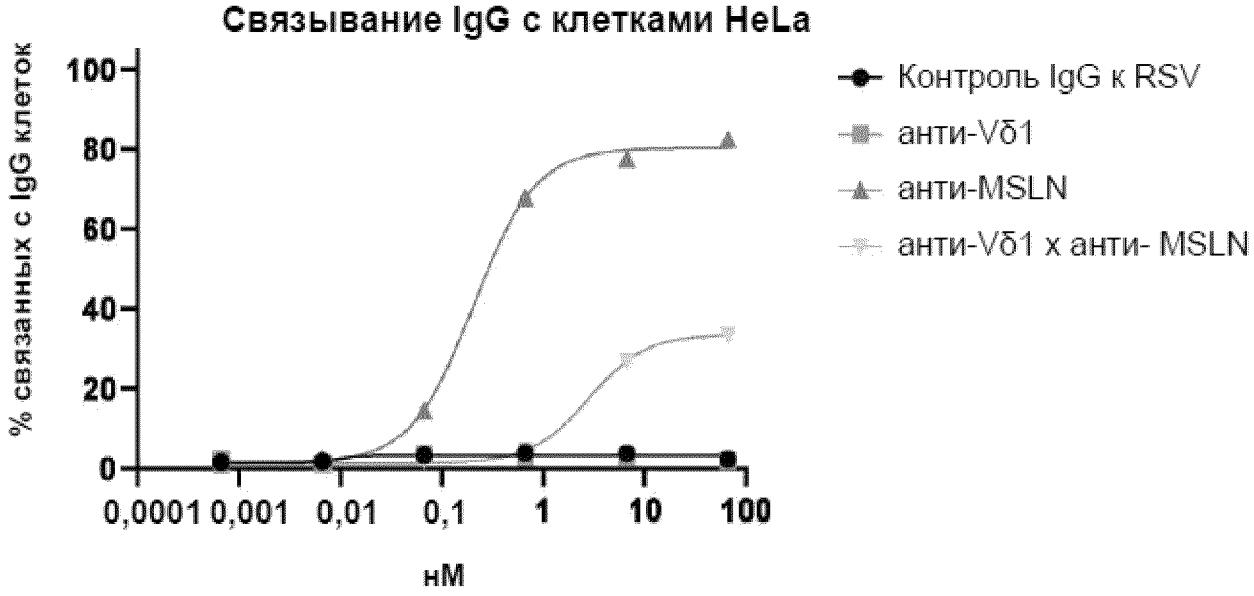


Фиг. 32

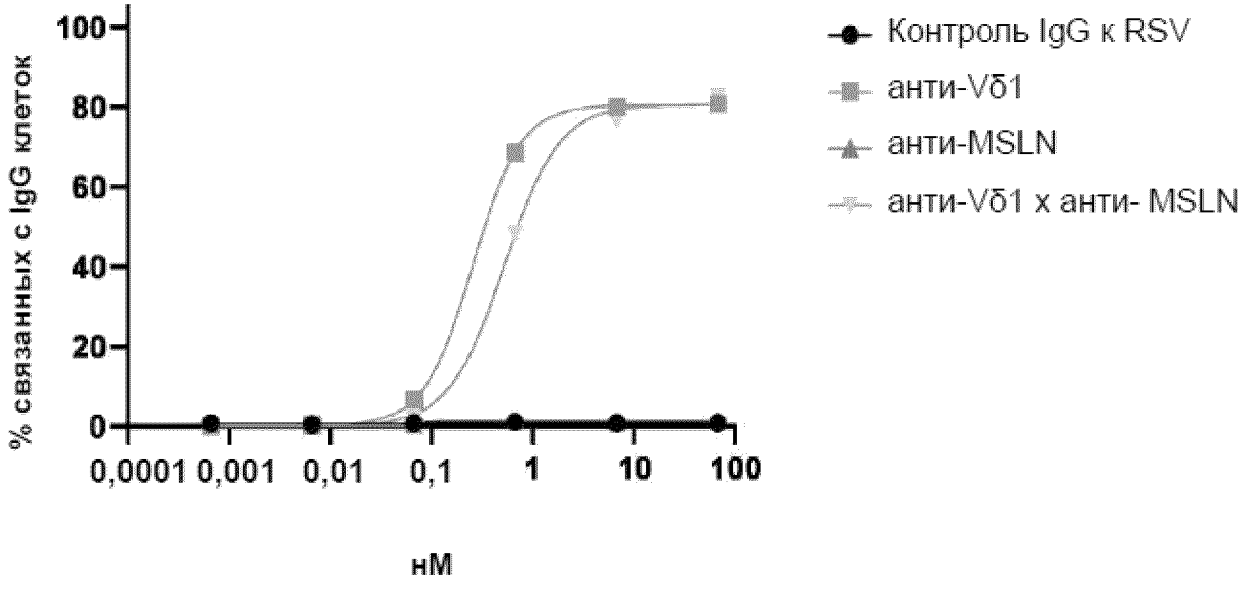

A
Vδ1 человека
MSLN
Анти-Vδ1
Анти-MSLN
Анти-Vδ1 x
анти-MSLN
Время (секунды)

Фиг. 32, продолжение

B

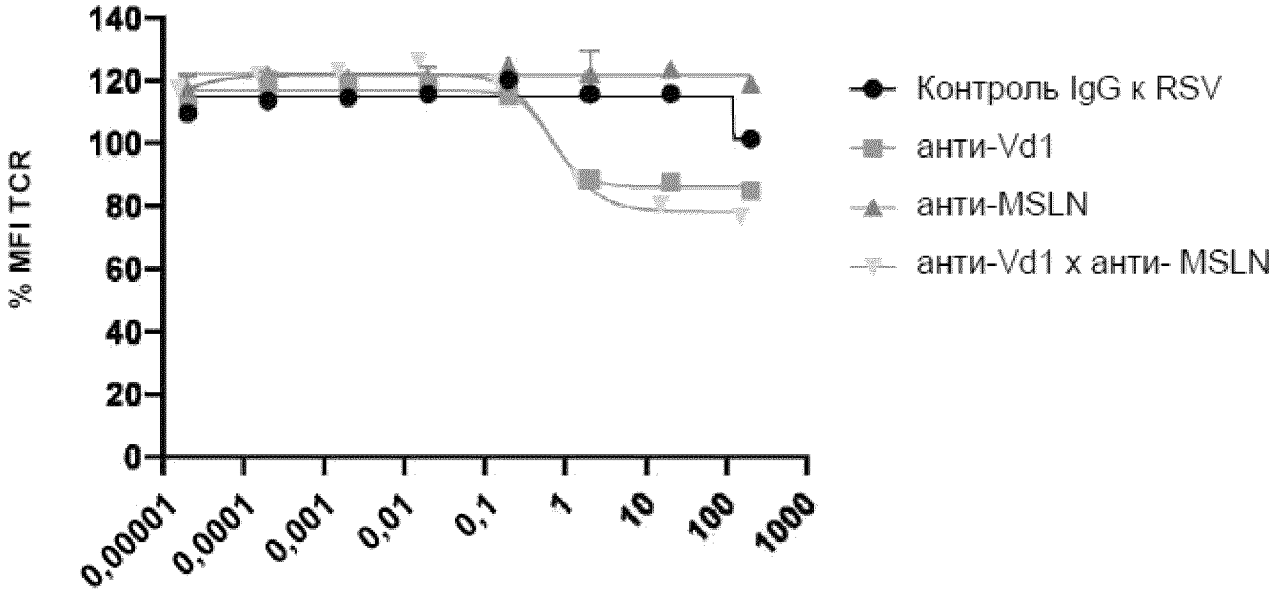


C

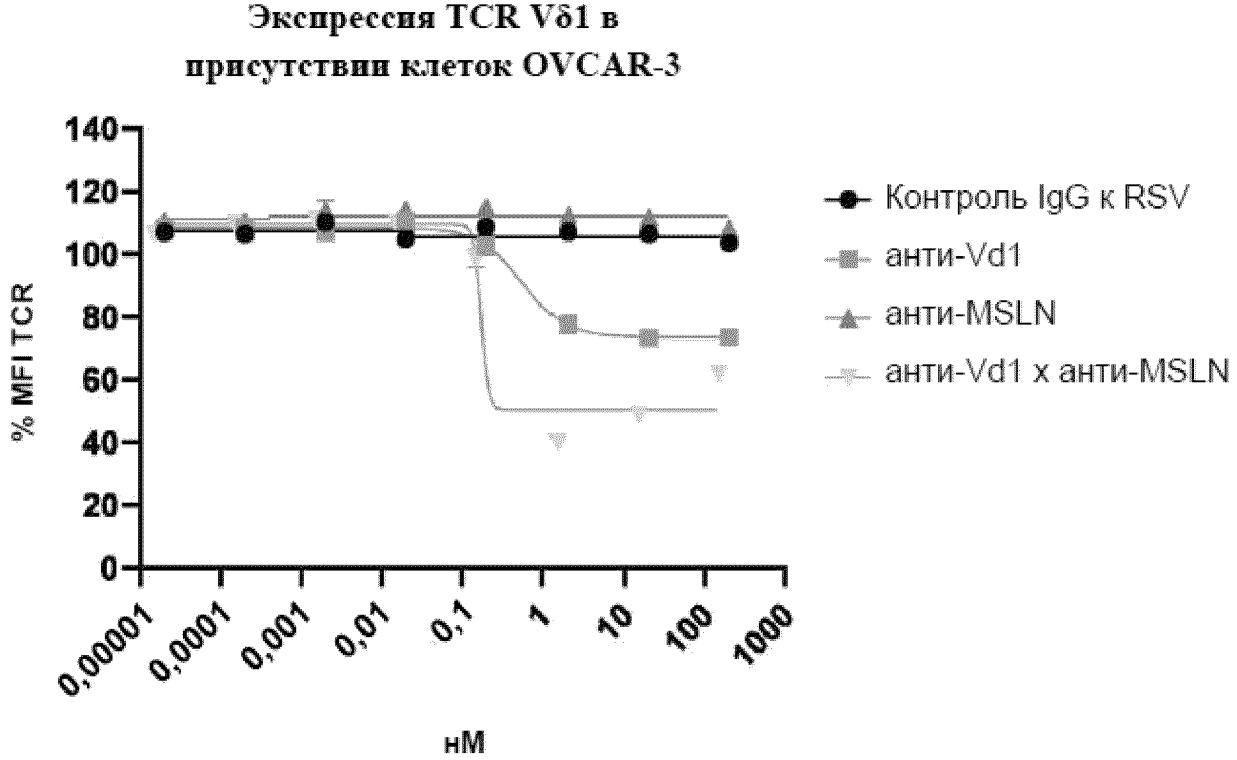


Фиг. 32, продолжение

D

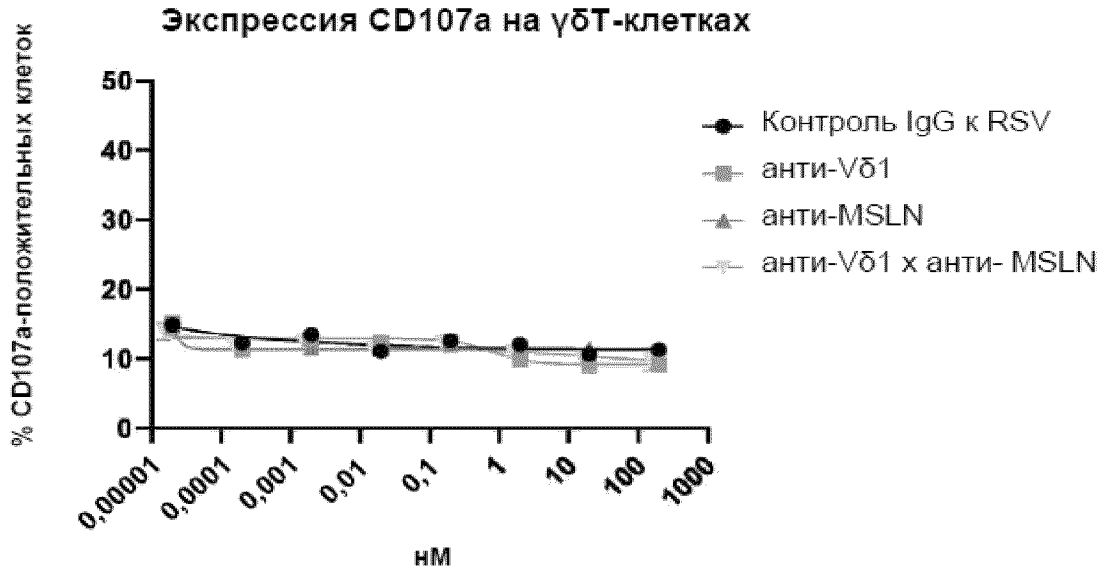


E

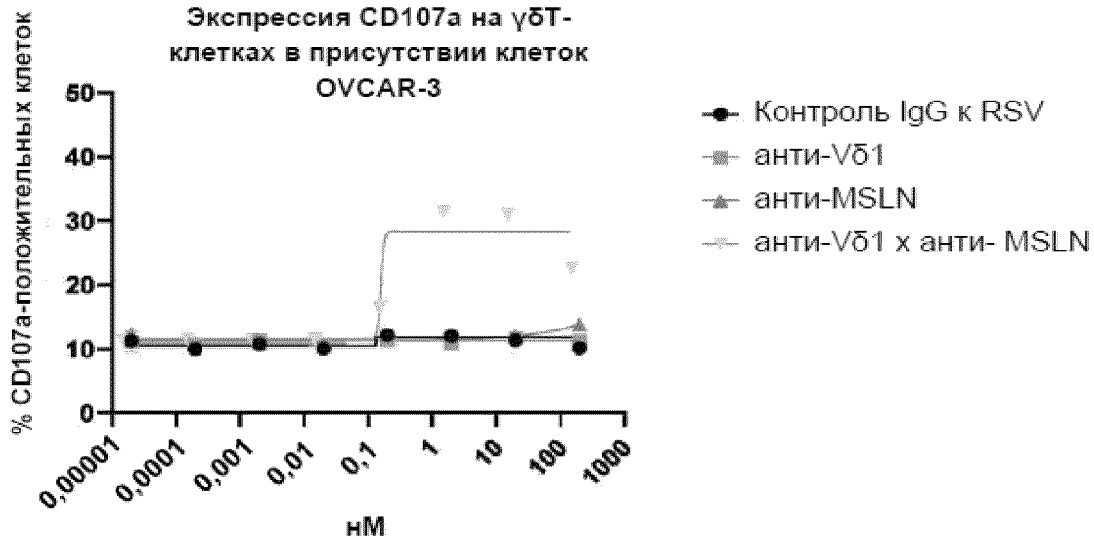


Фиг. 32 (продолжение)

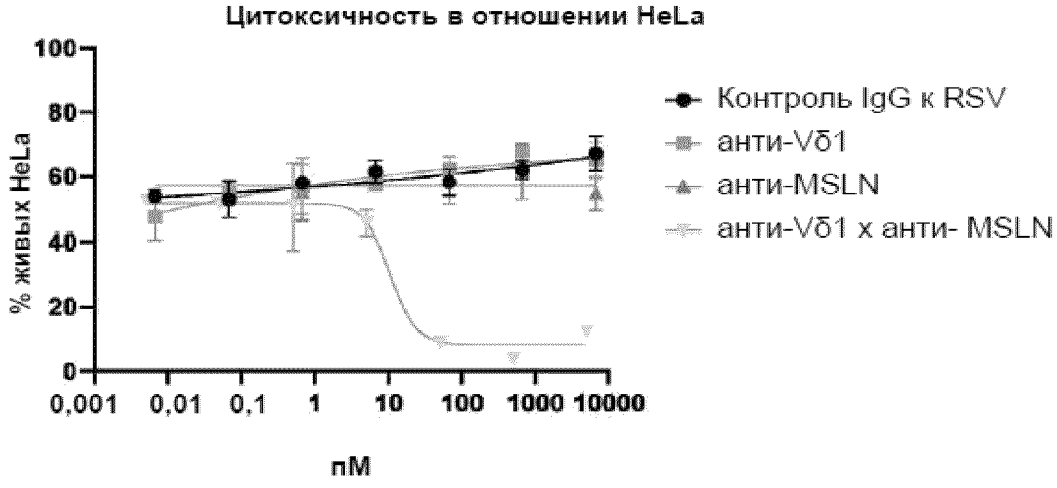
F



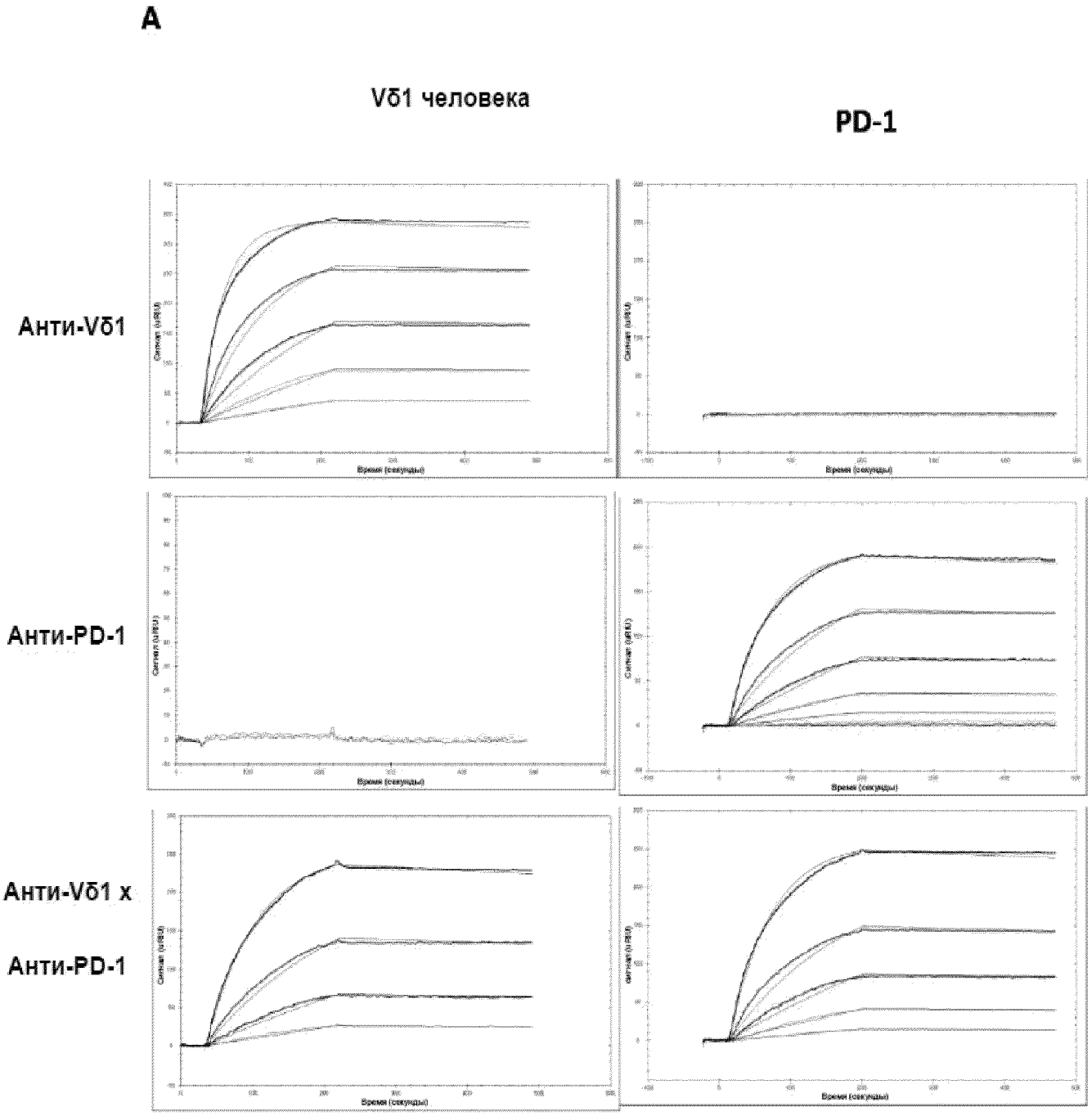
G



H

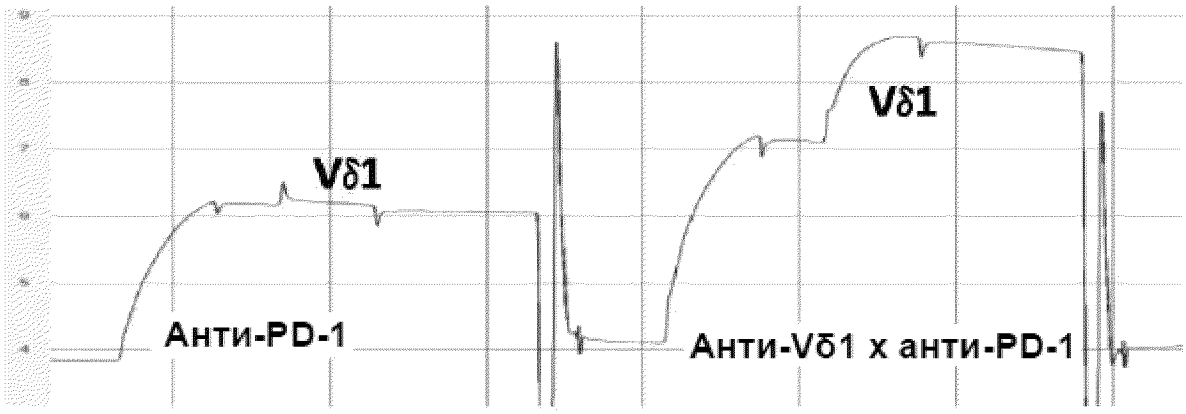


Фиг. 33

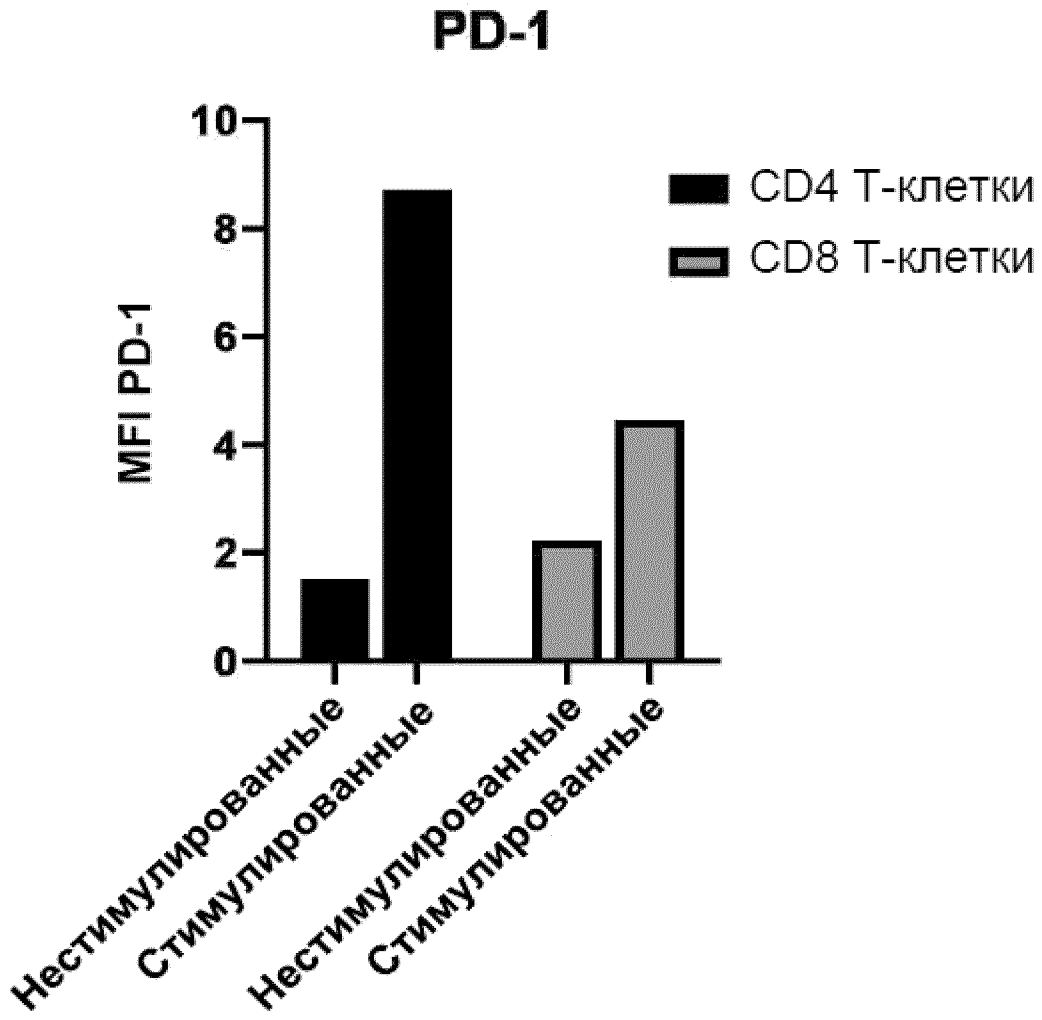


Фиг. 33, продолжение

B

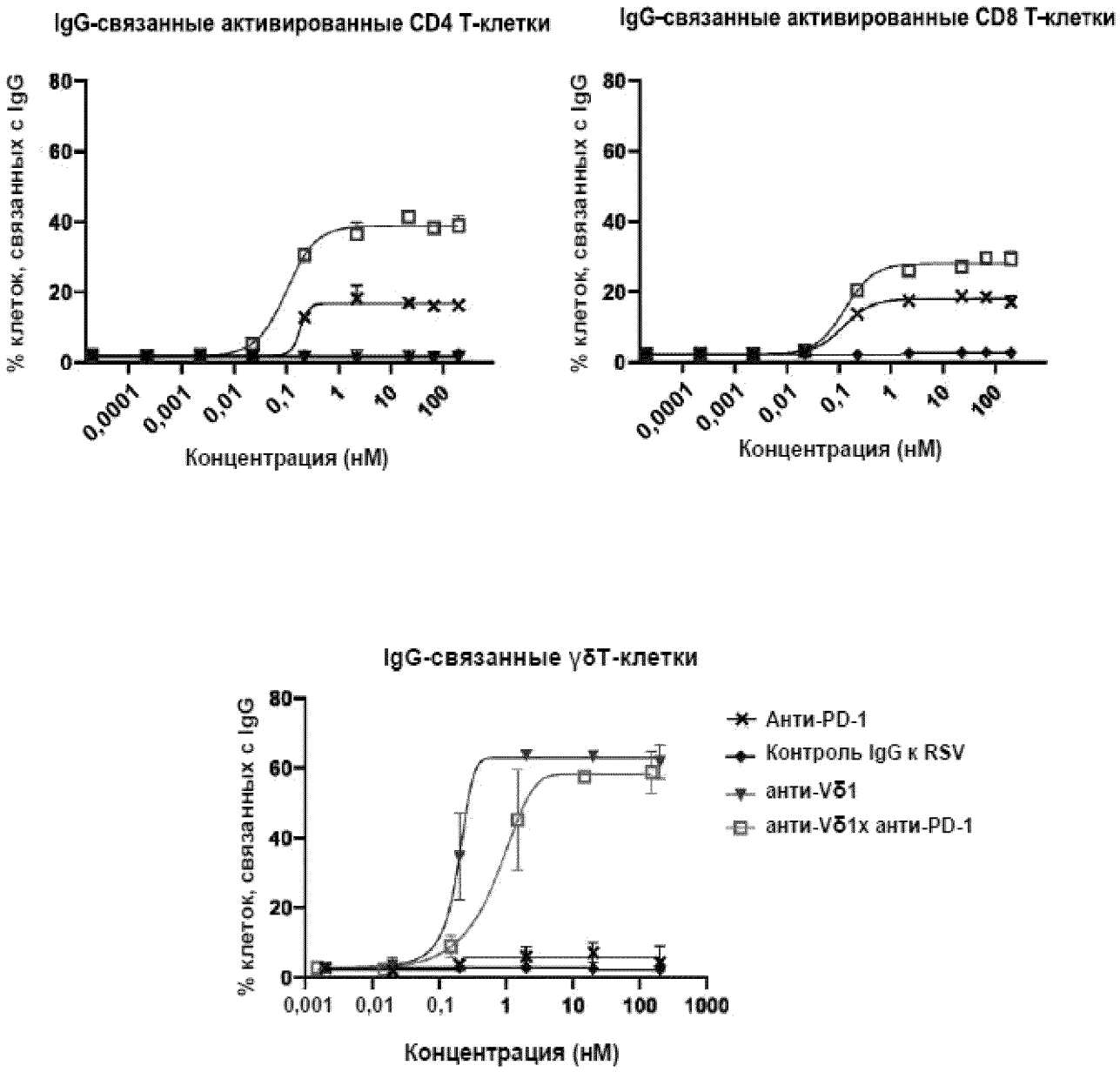


C



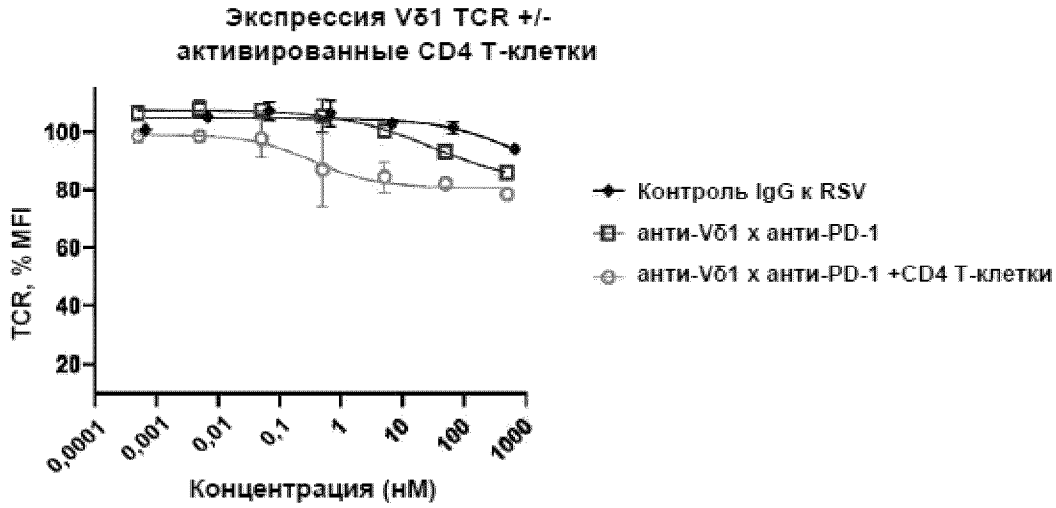
Фиг. 33, продолжение

D

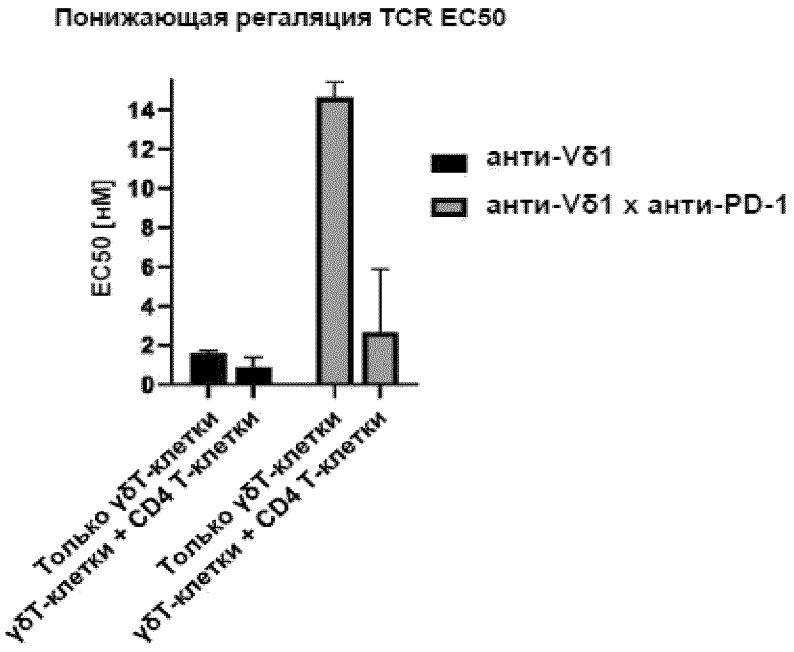


Фиг. 33, продолжение

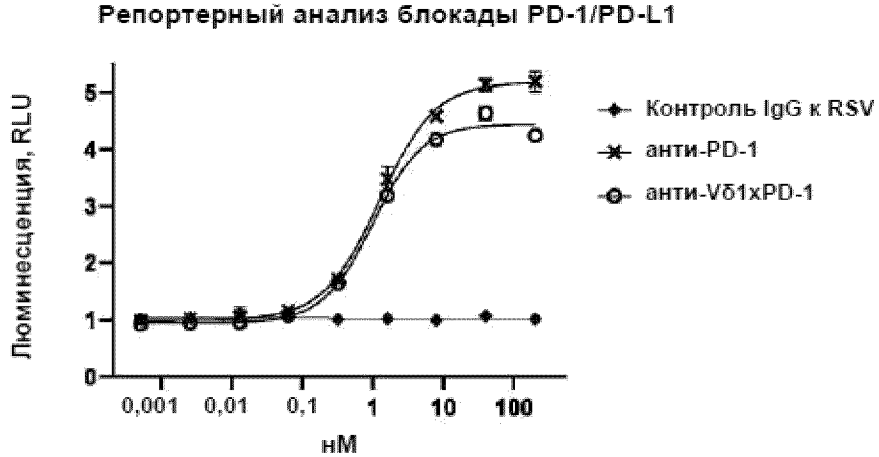
E



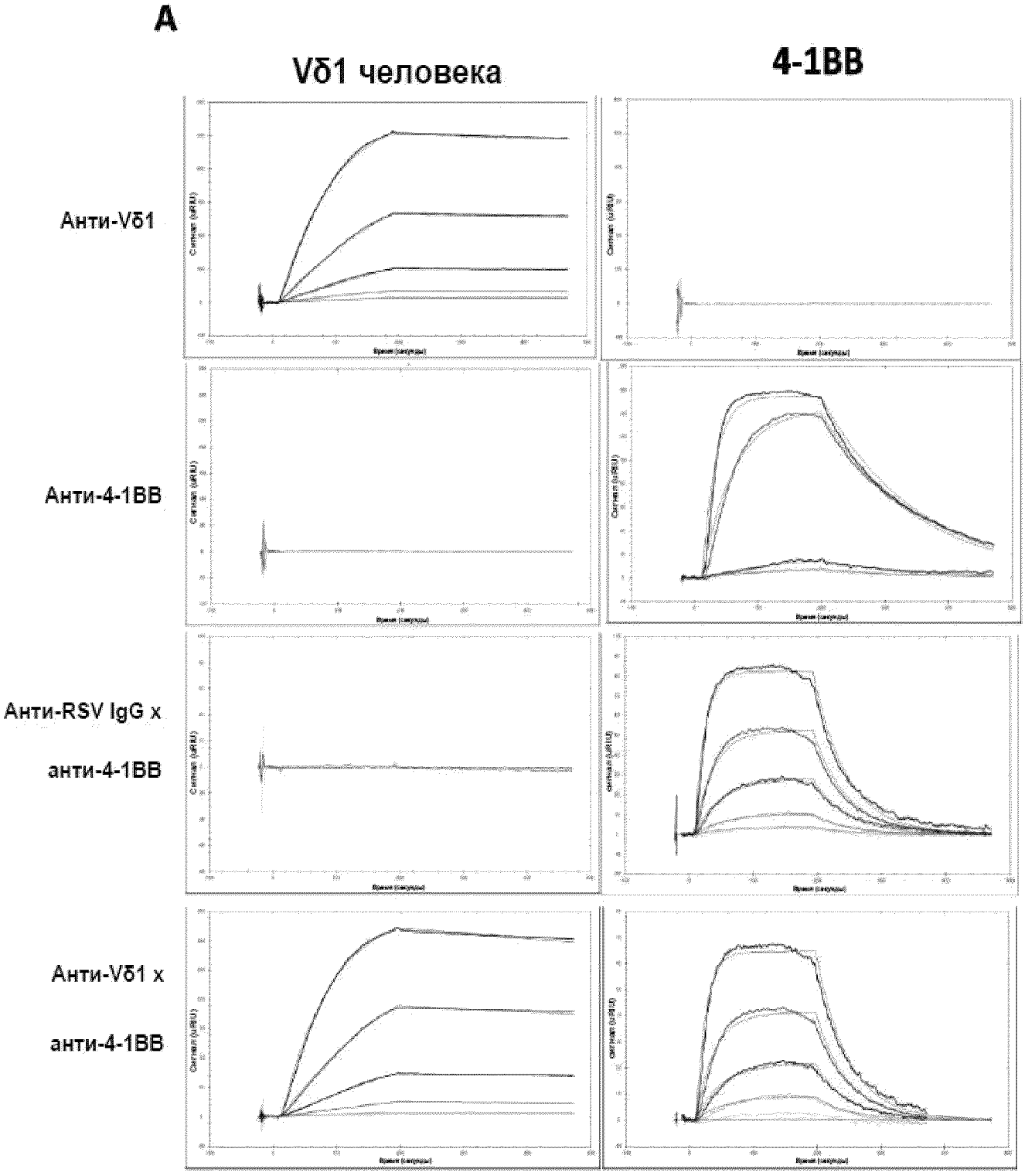
F



G

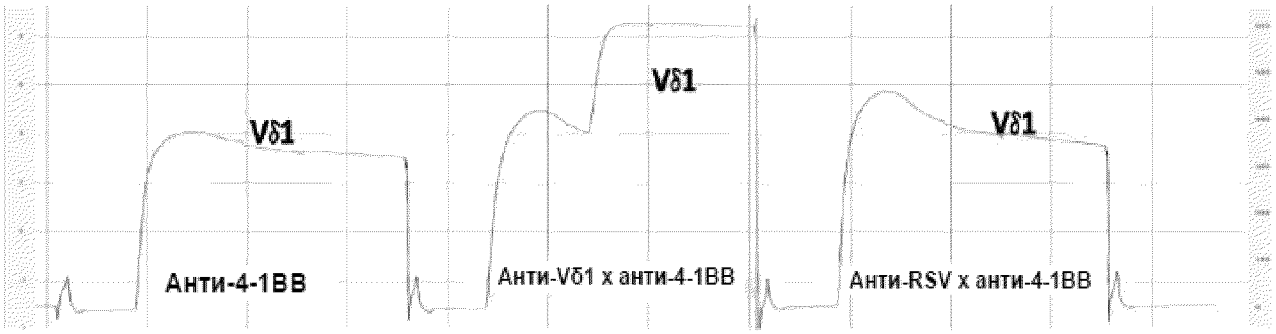


Фиг. 34

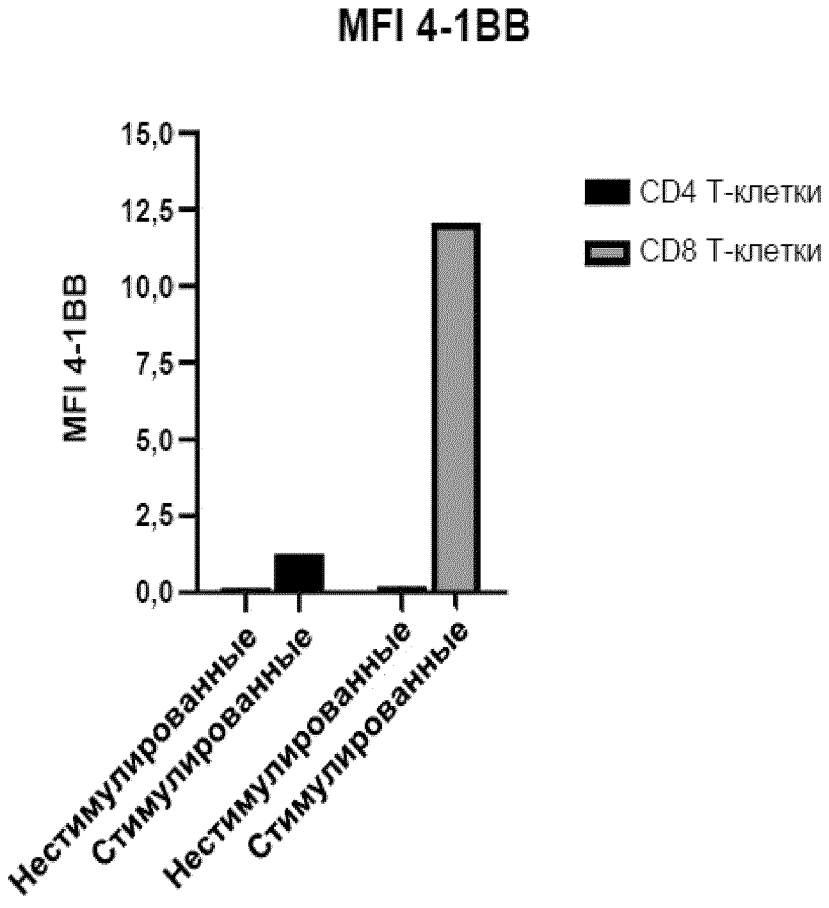

A
Vδ1 человека
4-1BB
Анти-Vδ1
Анти-4-1BB
Анти-RSV IgG x
анти-4-1BB
Анти-Vδ1 x
анти-4-1BB

Фиг. 34, продолжение

B

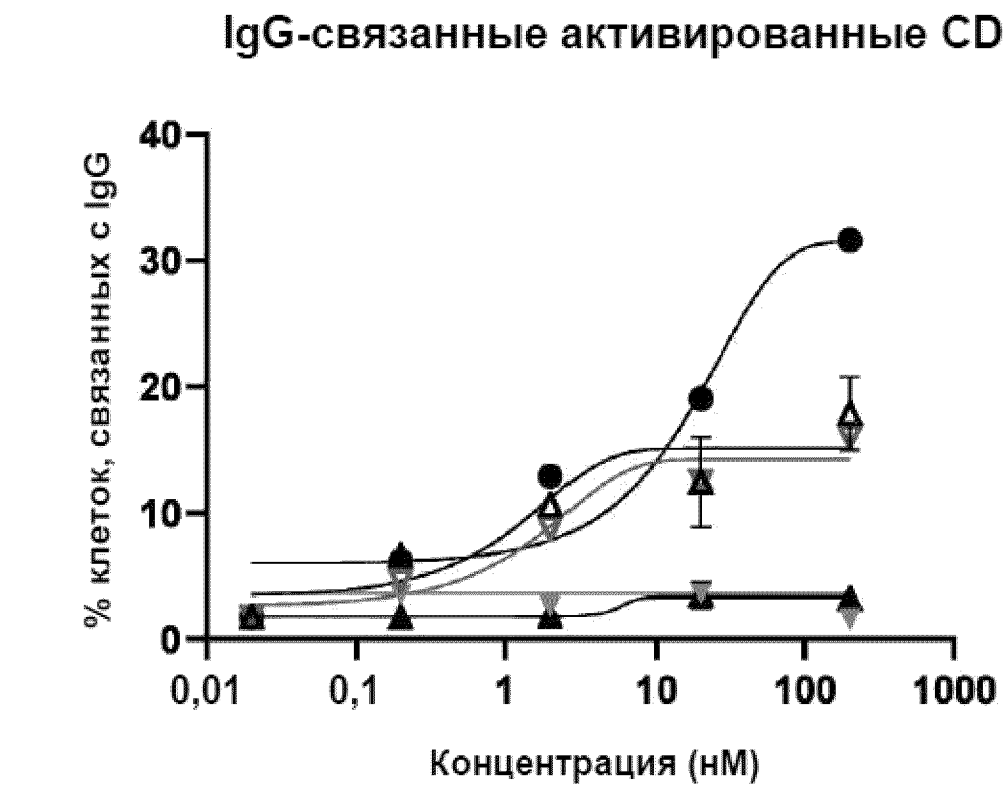


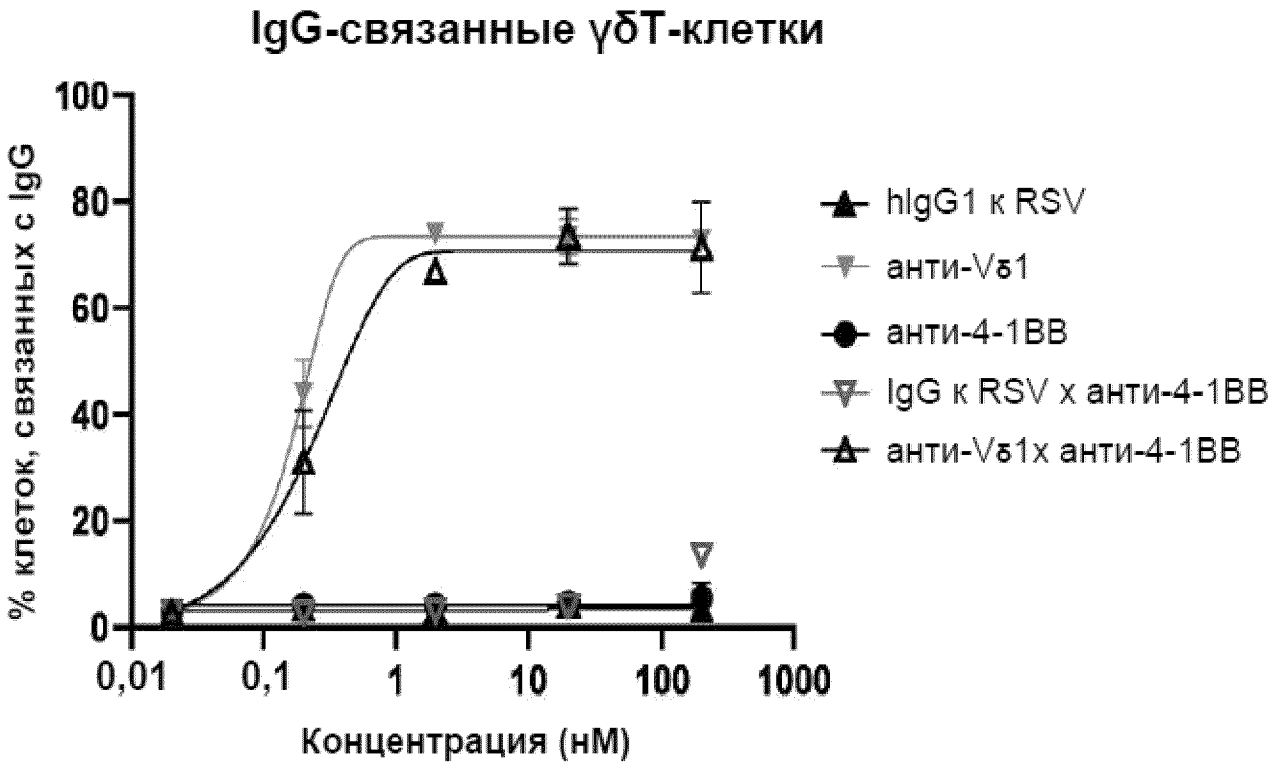
C



Фиг. 34, продолжение

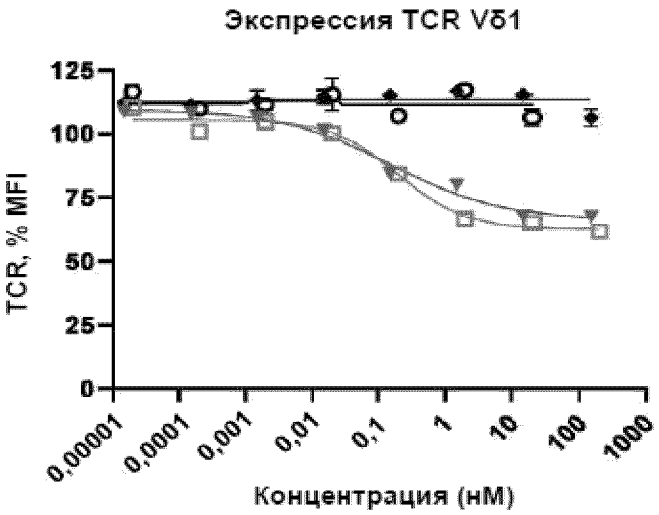
D



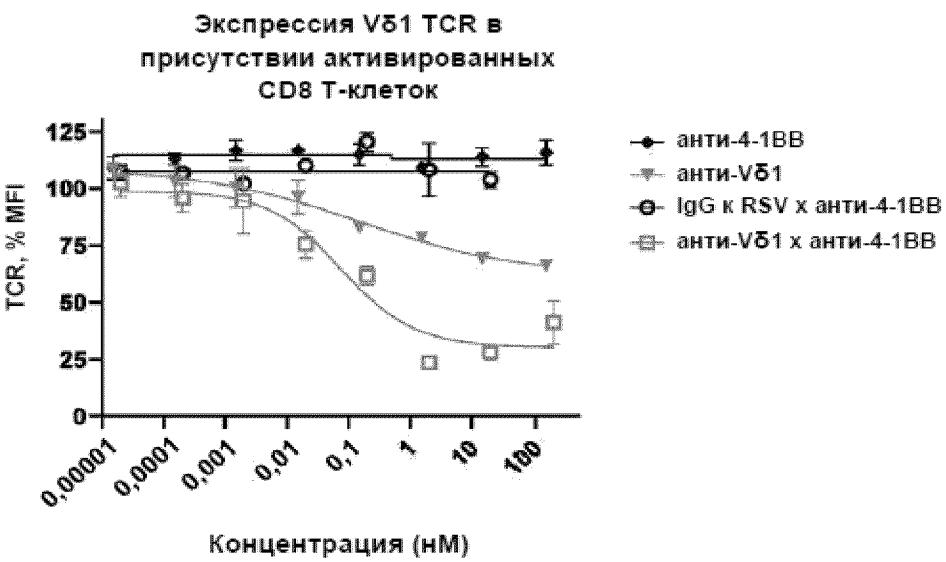


Фиг. 34, продолжение

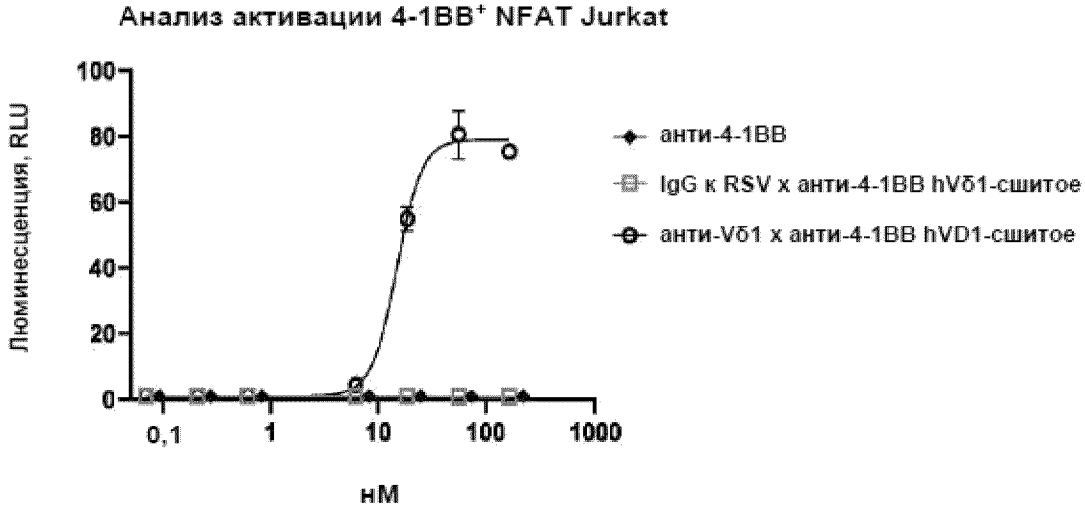
E



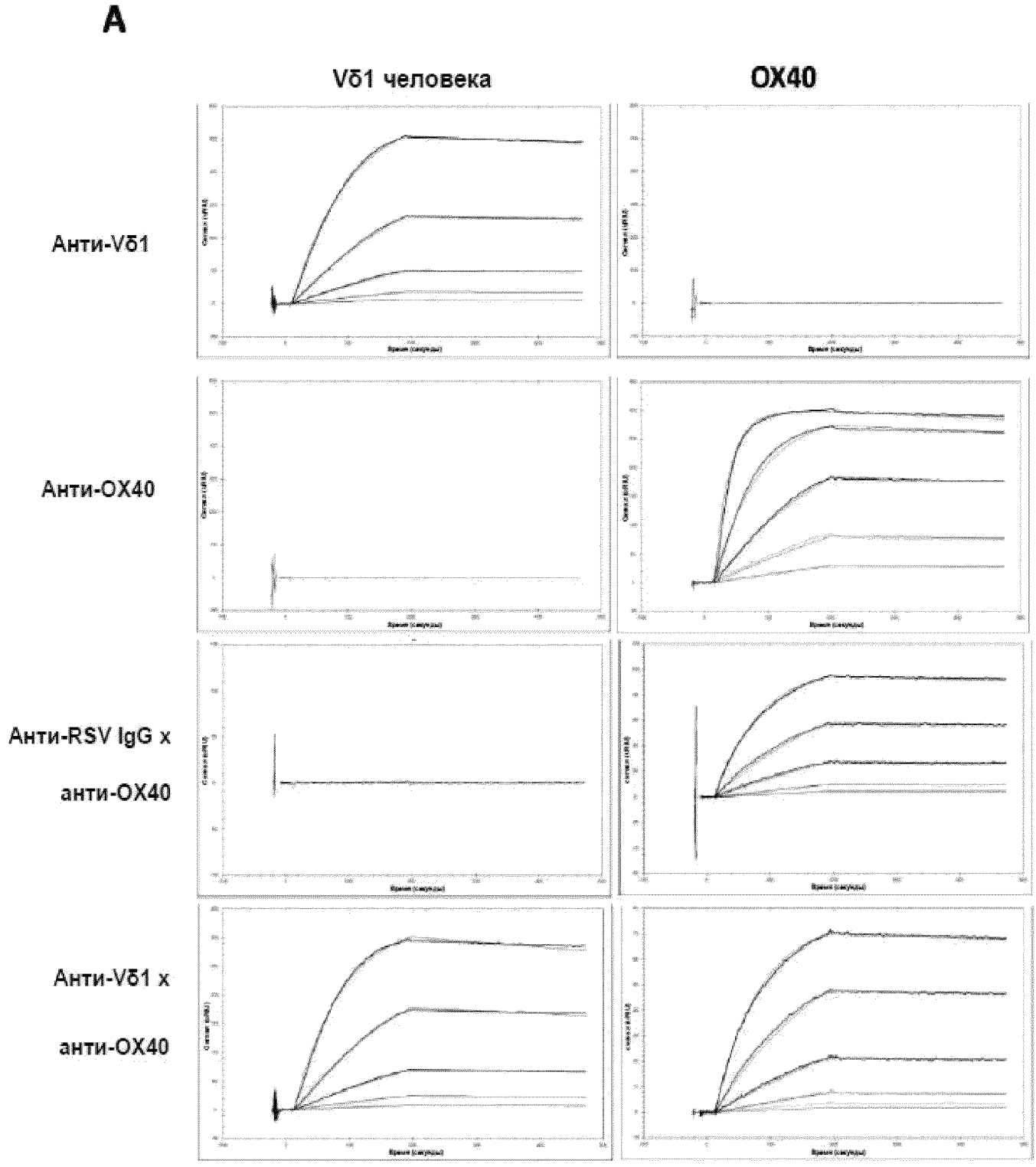
F



G

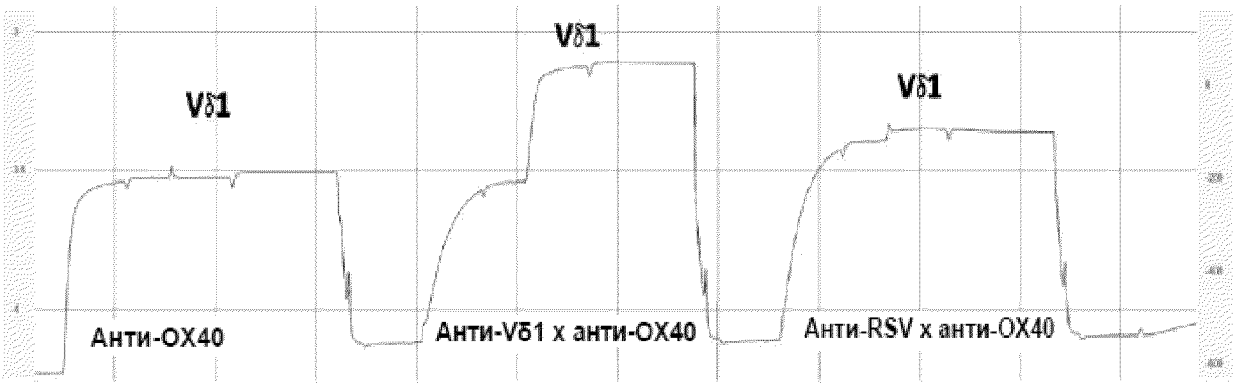


Фиг. 35

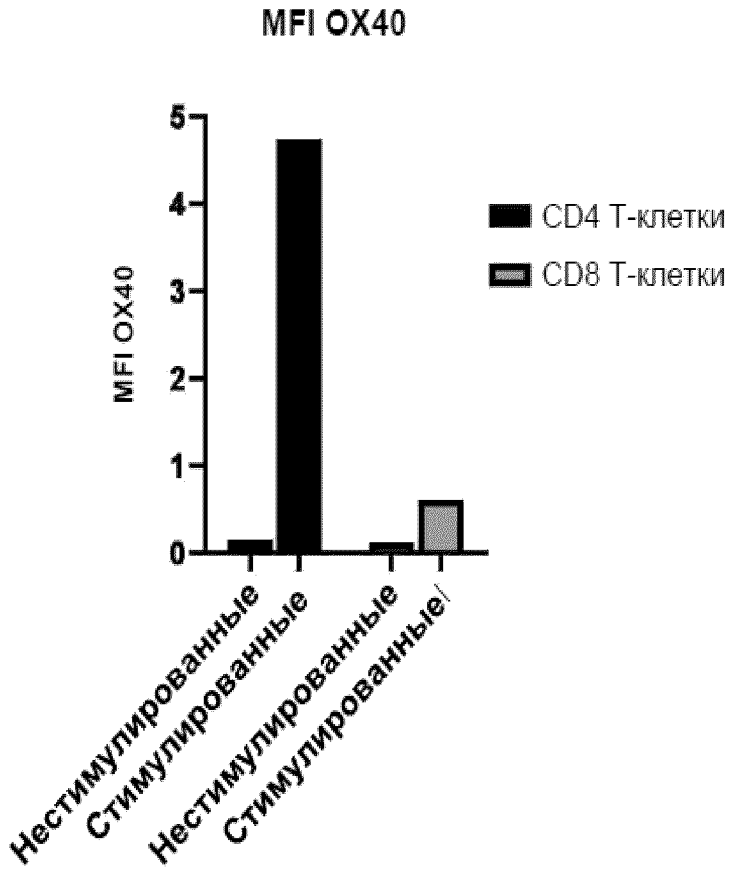

A
Vδ1 человека
OX40
Анти-Vδ1
Анти-OX40
Анти-RSV IgG x анти-OX40
Анти-Vδ1 x анти-OX40

Фиг. 35, продолжение

B

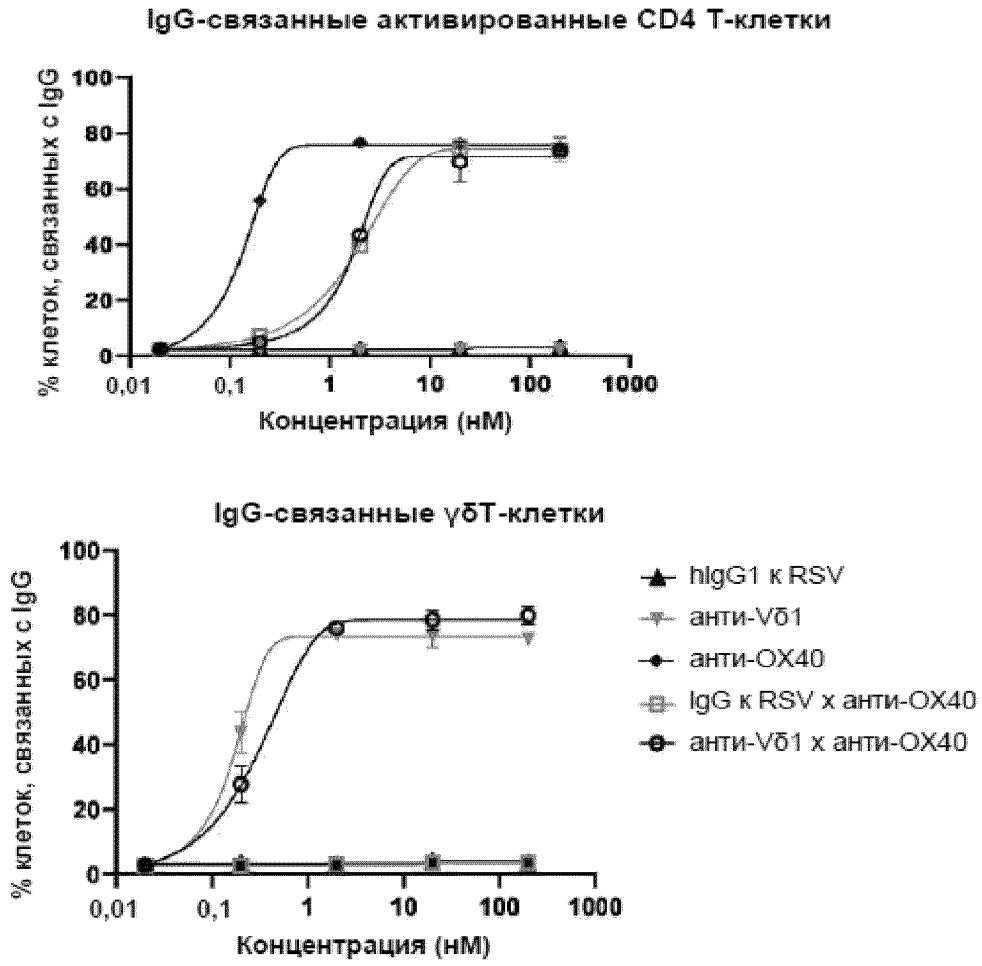


C

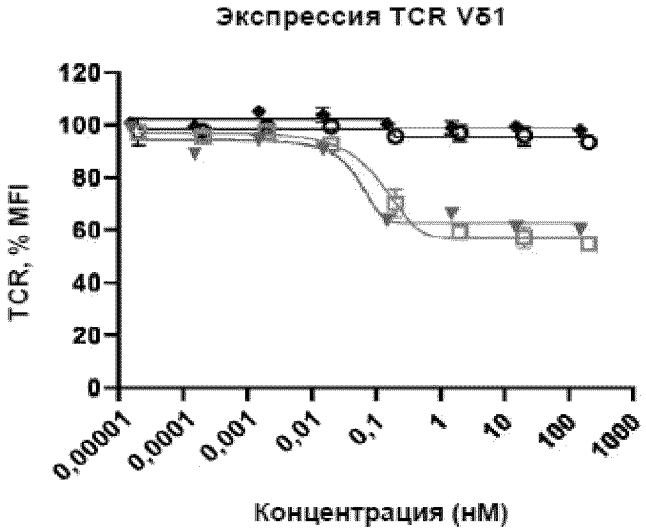


Фиг. 35, продолжение

D

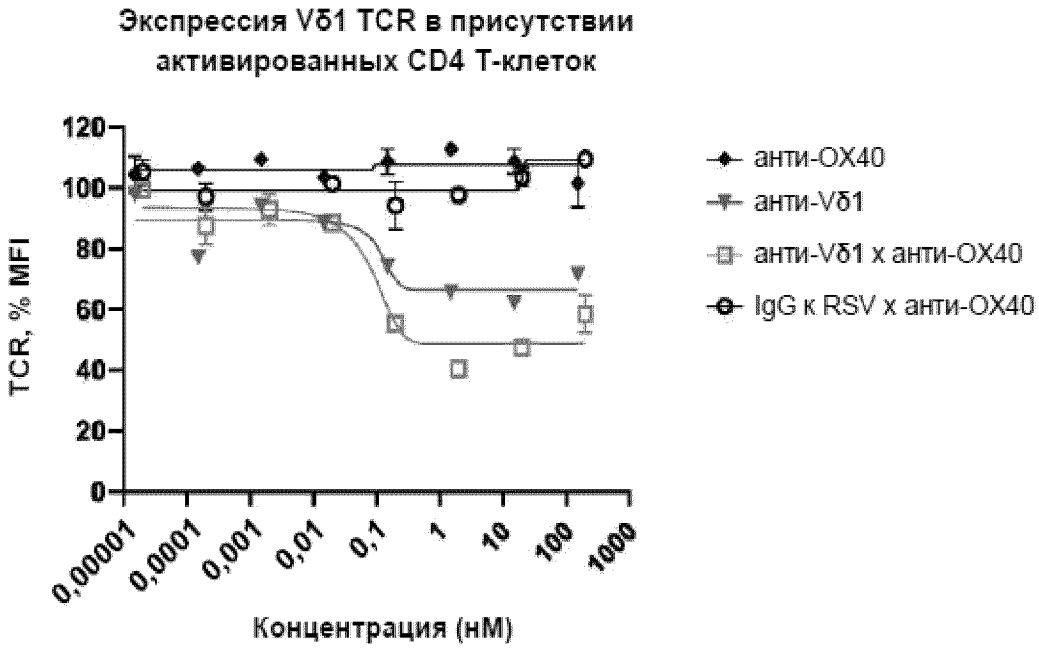


E

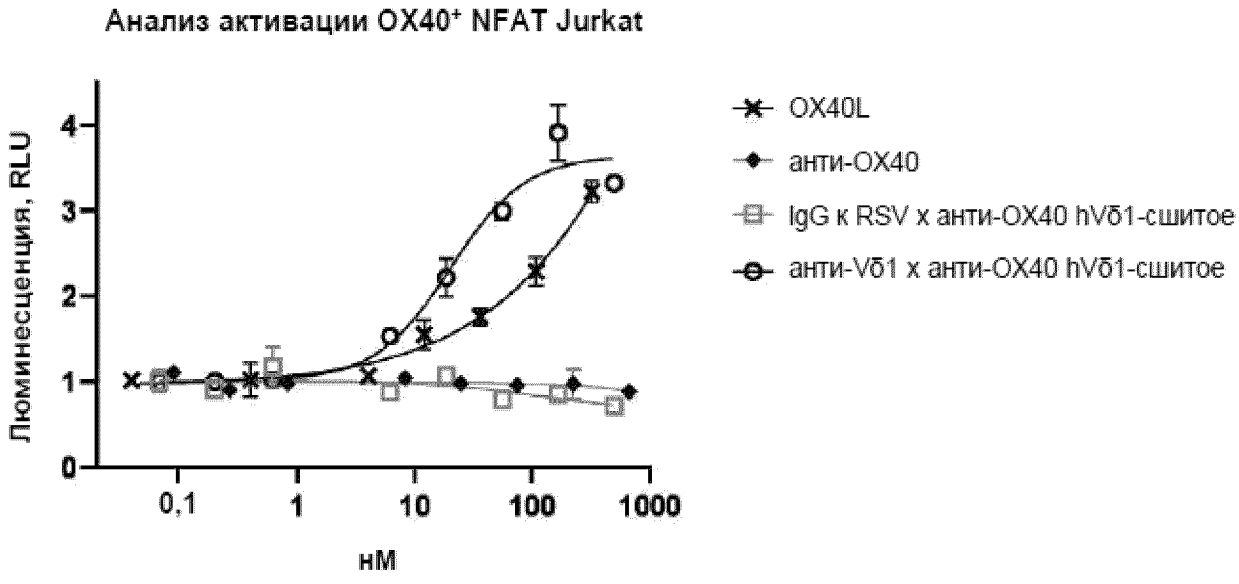


Фиг. 35, продолжение

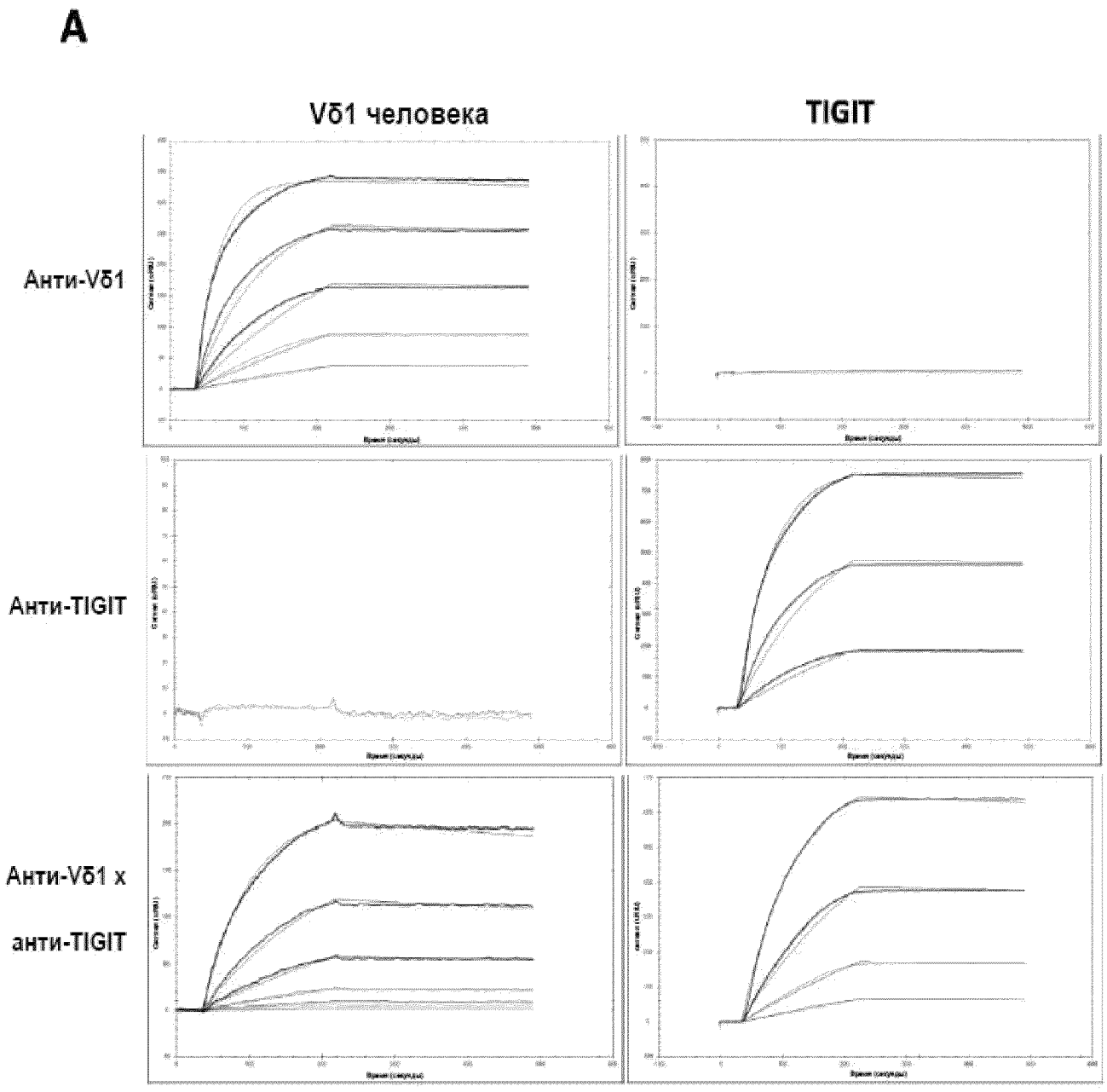
F



G

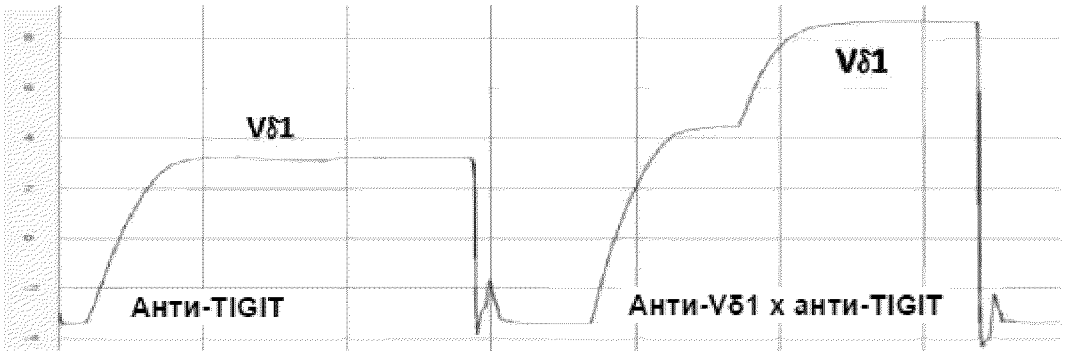


Фиг. 36

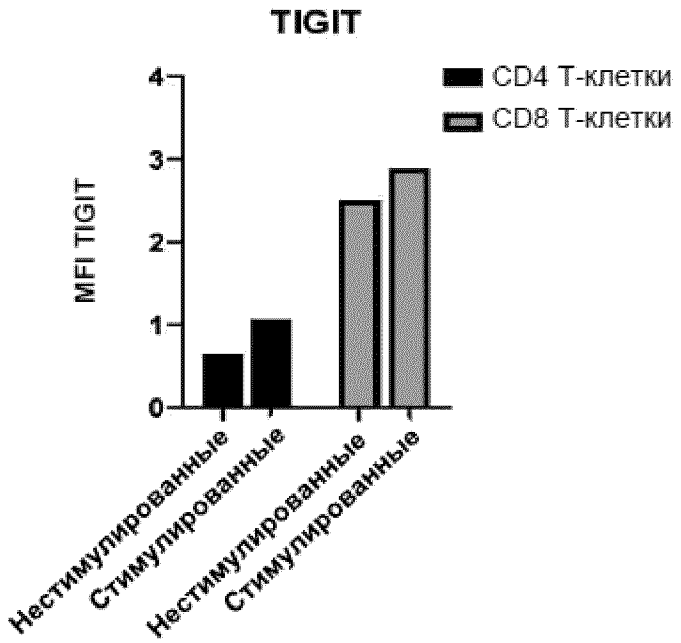

A
Vδ1 человека
TIGIT
Анти-Vδ1
Анти-TIGIT
Анти-Vδ1 x
анти-TIGIT

Фиг. 36, продолжение

B

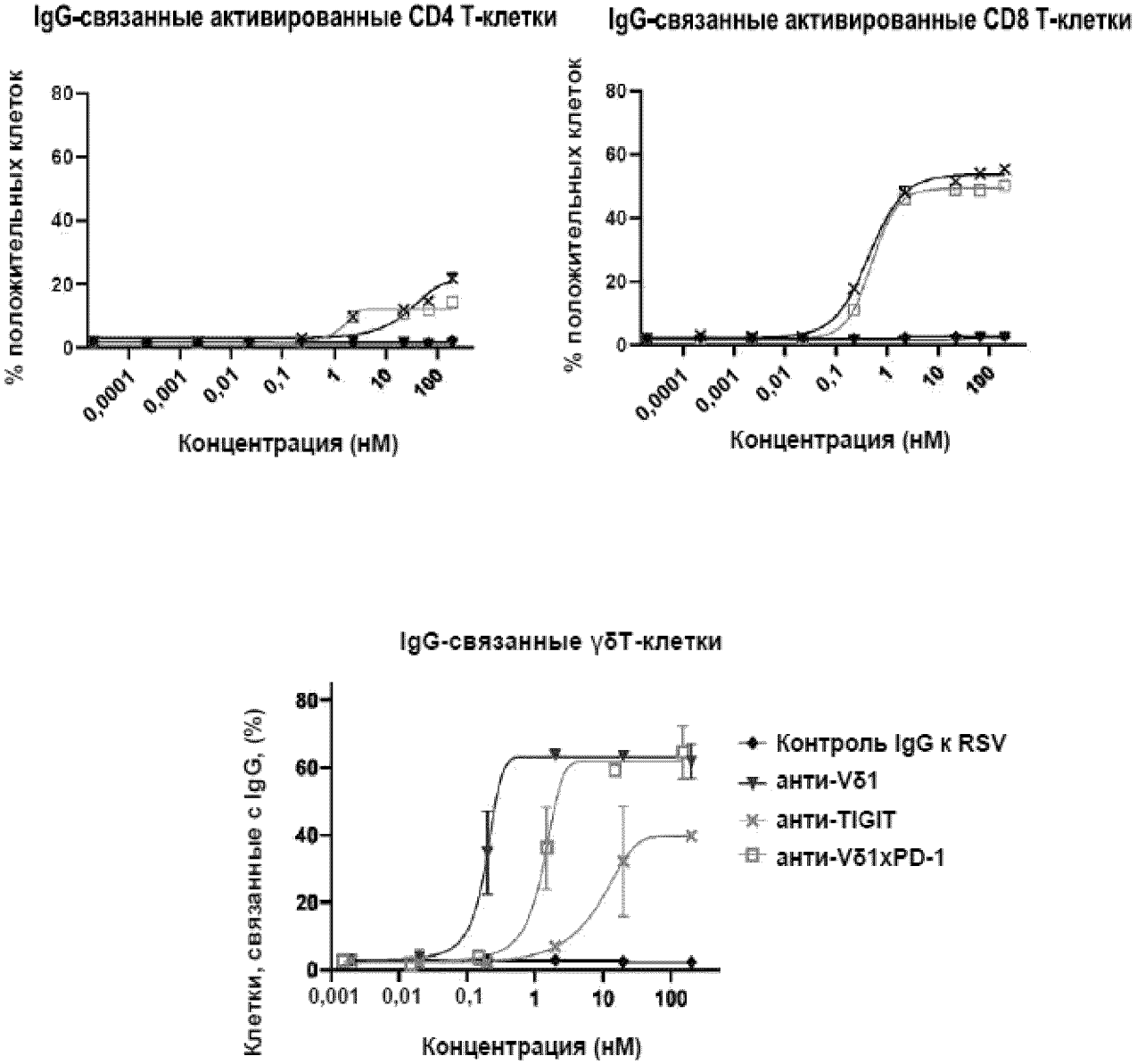


C



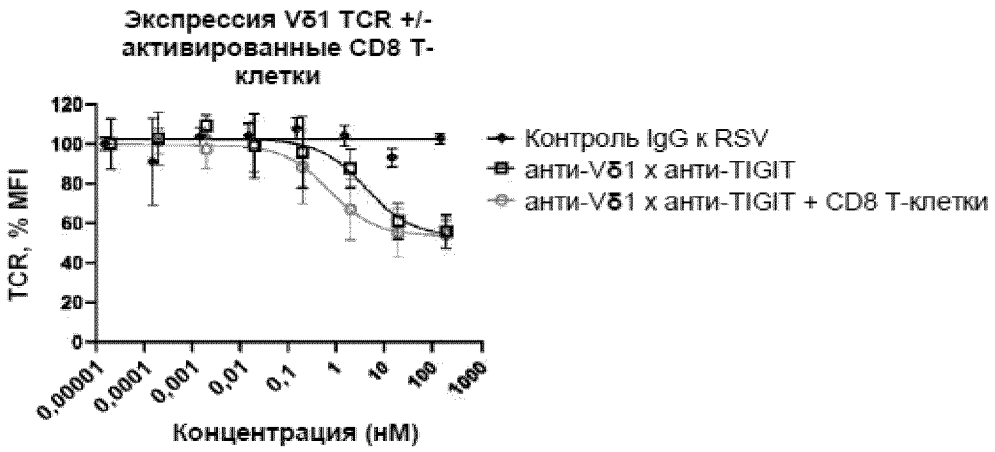
Фиг. 36, продолжение

D

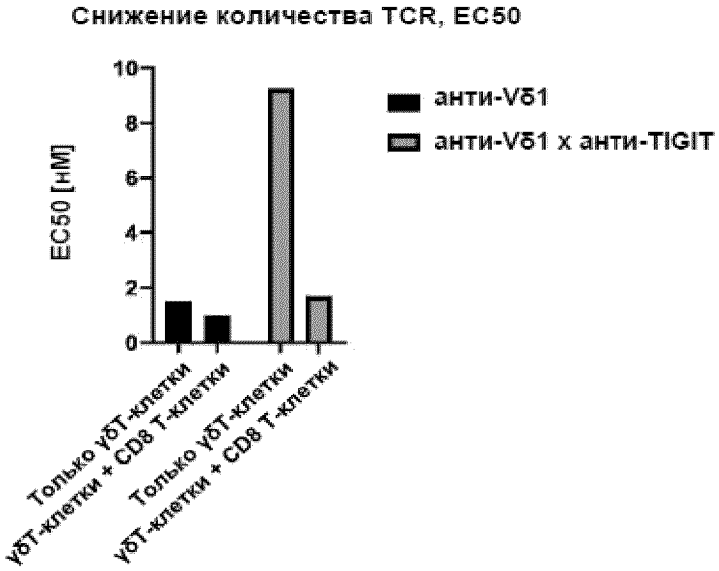


Фиг. 36, продолжение

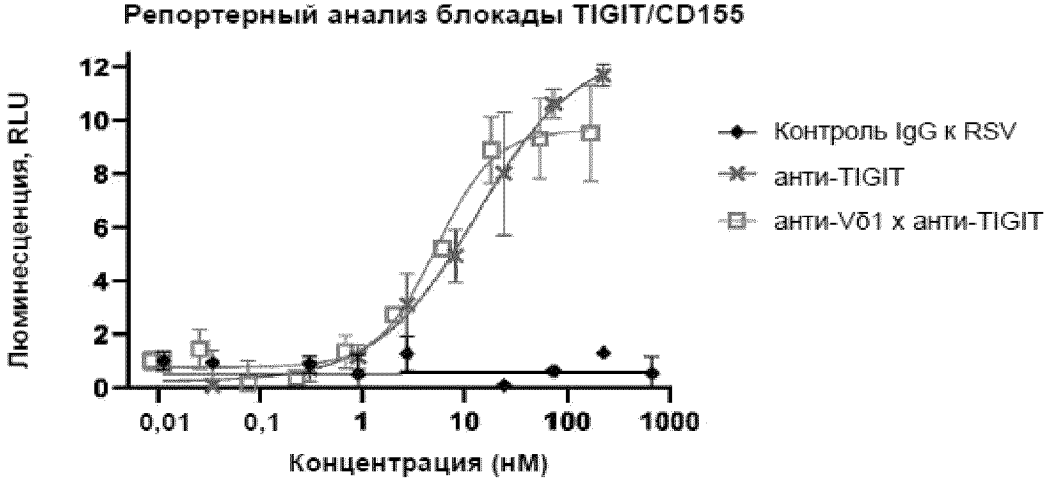
E

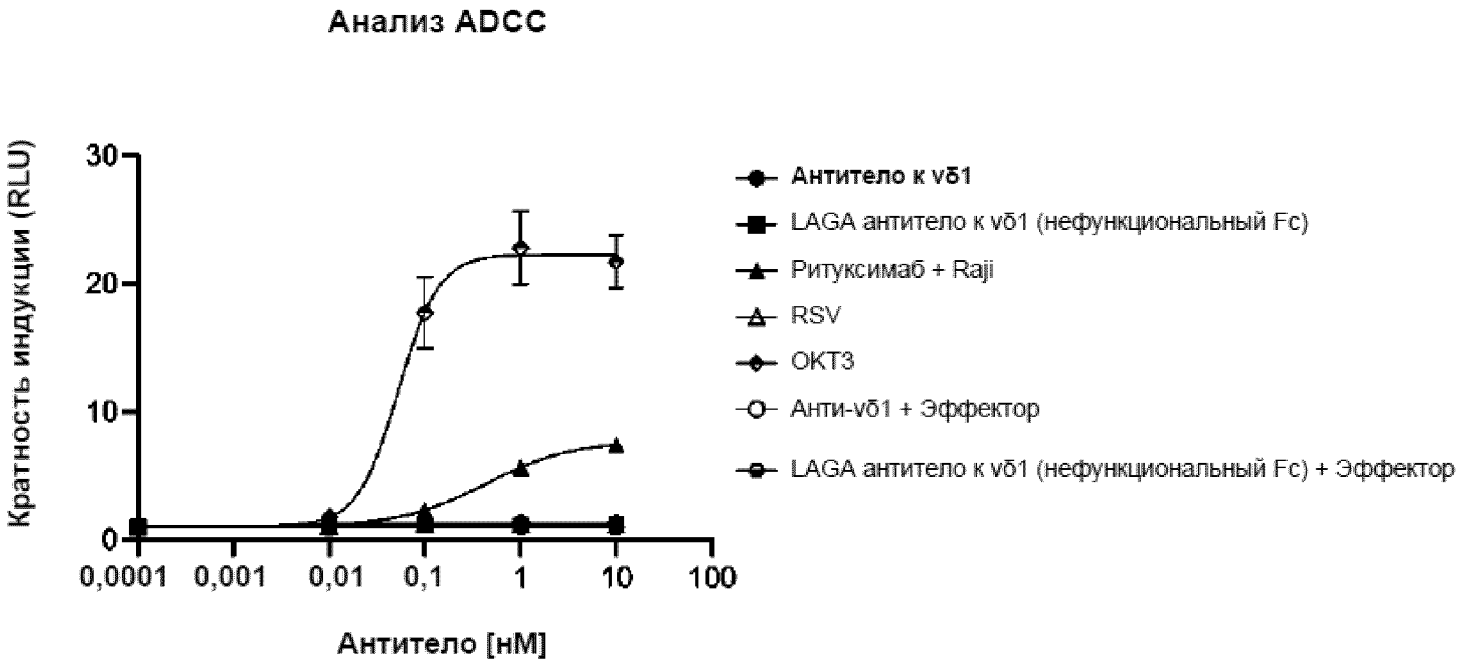


F

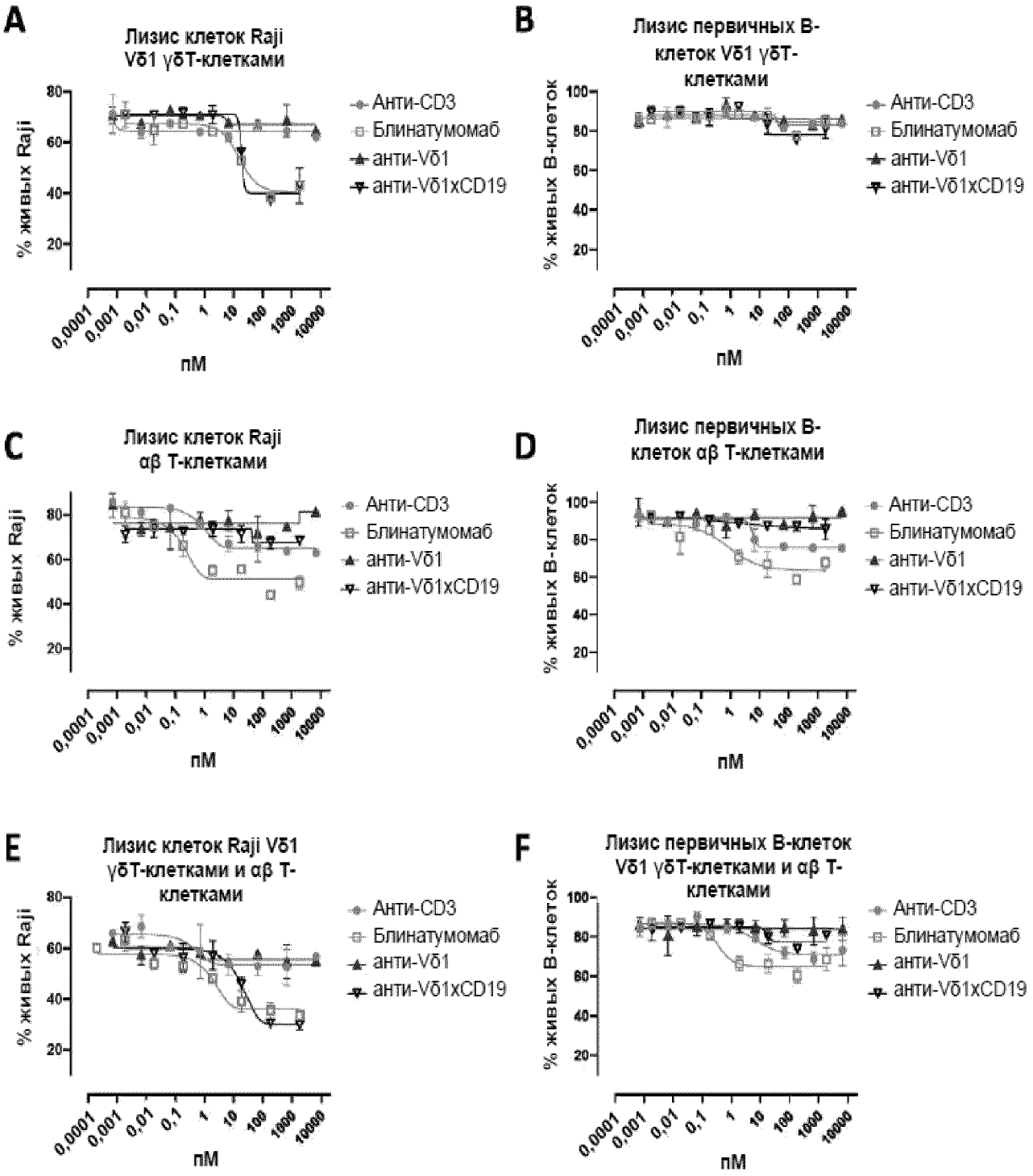


G



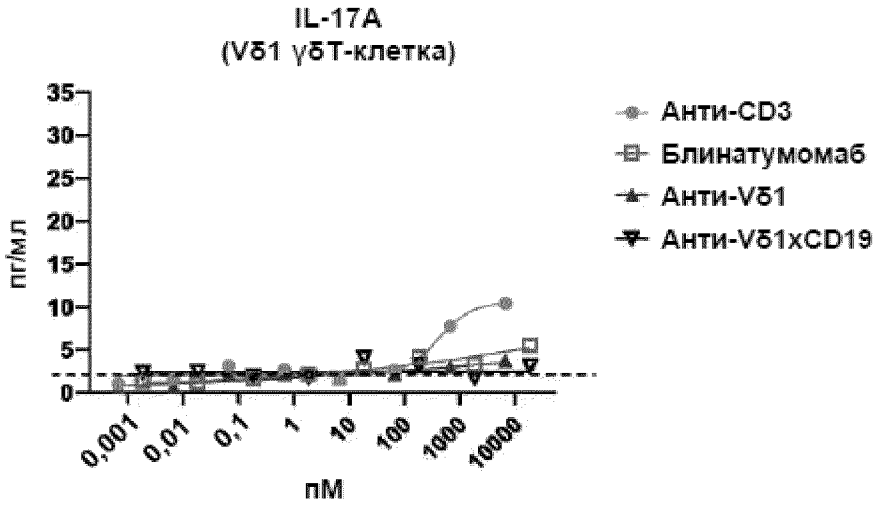

Анализ ADCC
Кратность индукции (RLU)
30
20
10
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Антитело [нМ]
Антитело к vδ1
LAGA антитело к vδ1 (нефункциональный Fc)
Ритуксимаб + Raji
RSV
OKT3
Анти-vδ1 + Эффектор
LAGA антитело к vδ1 (нефункциональный Fc) + Эффектор

Фиг. 37

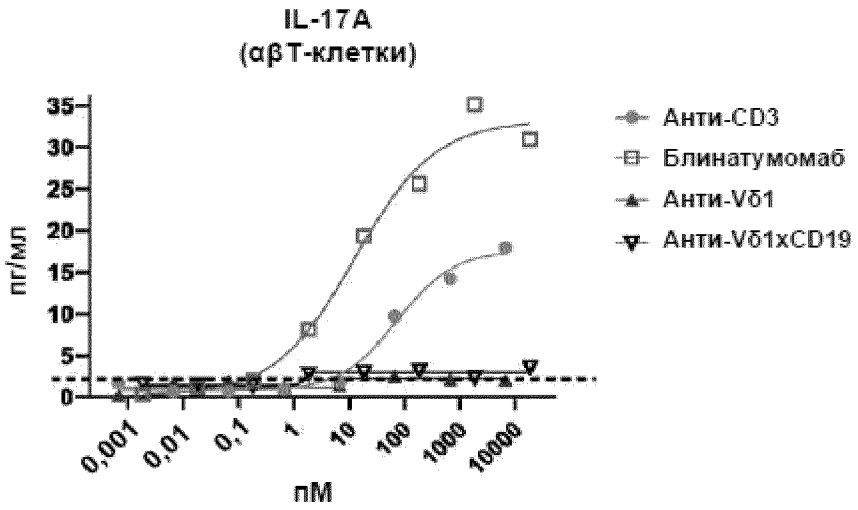

A
Лизис клеток Raji Vδ1 γδT-клетками
% живых Raji
80
60
40
20
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
10000
пМ
Анти-CD3
Блинатумомаб
анти-Vδ1
анти-Vδ1xCD19
B
Лизис первичных B-клеток Vδ1 γδT-клетками
% живых B-клеток
100
80
60
40
20
C
Лизис клеток Raji αβ T-клетками
D
Лизис первичных B-клеток αβ T-клетками
E
Лизис клеток Raji Vδ1 γδT-клетками и αβ T-клетками
F
Лизис первичных B-клеток Vδ1 γδT-клетками и αβ T-клетками

Фиг. 38

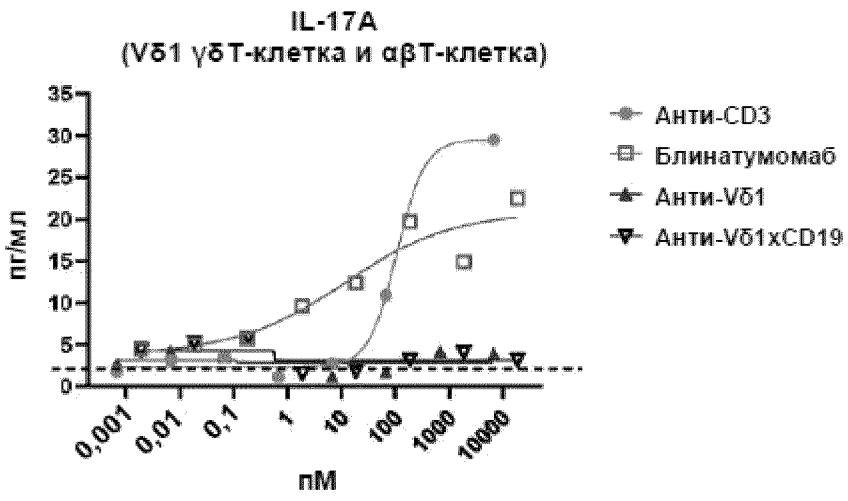
G



H



I



Фиг. 38 (продолжение)