

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390998** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.07.19

(22) Дата подачи заявки
2021.10.01

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА, ОБЛАДАЮЩИЕ СПОСОБНОСТЬЮ СВЯЗЫВАТЬСЯ С ROR2, И
БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С ROR2 И CD3**

(31) 20199893.7
(32) 2020.10.02
(33) EP
(86) PCT/EP2021/077130
(87) WO 2022/069724 2022.04.07
(71) Заявитель:
ГЕНМАБ А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Копман Луиза, Энгельбертс Патрик,
Сатейн Давид, Данненберг Ян-Хермен
(NL)

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

(57) В изобретении описаны антитела, связывающиеся с ROR2, включая биспецифические антитела, связывающиеся с ROR2 и CD3. В изобретении описаны также фармацевтические композиции, содержащие антитела, и применение антител для терапевтических и диагностических процедур, в частности в терапии рака.

A1

202390998

202390998

A1

АНТИТЕЛА, ОБЛАДАЮЩИЕ СПОСОБНОСТЬЮ СВЯЗЫВАТЬСЯ С ROR2, И
БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С ROR2 И CD3

5

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам, связывающимся с ROR2, включая биспецифические антитела, которые связываются с ROR2 и CD3. В изобретении предложены также фармацевтические композиции, содержащие антитела, и применение антител для терапевтических и диагностических процедур, в частности, в противораковой терапии.

10

Предпосылки создания изобретения

ROR2 (рецепторный тирозинкиназоподобный орфанный рецептор 2, NTRKR2, нейтрофическая тирозинкиназа, рецептор-зависимая 2), представляет собой однопроходный трансмембранный гликопротеин типа I, принадлежащий к подсемейству ROR семейства тирозинпротеинкиназ. ROR2 представляет собой рецептор с тирозинкиназной активностью (рецепторную тирозинкиназу), важный для регуляции развития скелета и нейронов, клеточной миграции и клеточной полярности, в частности, благодаря его предполагаемой роли в неканоническом сигнальном пути Wnt5a (Oishi Genes to cells 8, 2003, с.с 645-654.) Он содержит FZ-(frizzled)-домен, Ig-(иммуноглобулин)-подобный домен типа C2, и kringle-домен (домен «двойная петля») во внеклеточной области и протеинкиназный домен в цитоплазматической области (Masiakowski и Carroll J Biol Chem 267, 1992, сс. 26181-26190).

15

20

25

30

В здоровой ткани взрослого человека экспрессия ROR2 является очень ограниченной (происходит только в матке во время менструального цикла, в головном мозге во время восстановления после повреждения, в костях во время формирования кости и в кишечнике в качестве части кишечного гомеостаза) (Debebe и Rathmell Pharmacol & Therap 150, 2015, сс. 143-148; Endo Dev Dyn 247, 2017, сс. 24-32), в то время как экспрессия ROR2 обнаружена на опухолевых клетках человека в многочисленных раковых тканях, включая саркому матки, поджелудочной железы, меланому, почечно-клеточный рак, карциному предстательной железы, колоректальный рак, плоскоклеточные карциномы

головы и шеи, стромальные опухоли и ткань рака молочной железы (см. обзор Debebe и Rathmell *Pharmacol & Therap* 150, 2015, сс. 143-148).

По этой причине предложено целенаправленное воздействие на ROR2 для лечения рака. Например, разработан конъюгат ROR2-специфического антитела с лекарственным средством САВ-ROR2-ADC/BA3021 для терапии солидных опухолей и саркомы мягких тканей (Sharp и др., *Proceedings of the AACR Annual Meeting 2018; Cancer Res* 78(13 дополнение): реферат 833). Кроме того, разработаны Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR), направленные против ROR2, для лечения рака почек (*Association for Cancer Immunotherapy (CIMT) 2019 Annual Meeting*, реферат 123).

Предпринимались попытки также нацеливать Т-клетки на ROR2. Описано биспецифическое антитело к ROR2/CD3 в формате scFv-Fc, основой которого является гуманизированное кроличье антитело к ROR2, обуславливающее Т-клеточную цитотоксичность в линиях опухолевых клеток (Goydel и др., *J Biol Chem* 295, 2020, сс. 5995-6006).

Несмотря на достигнутый определенный прогресс, по-прежнему существует необходимость в разработке основанных на антителах методов лечения рака, нацеленных на ROR2, которые обладают эффективностью и безопасностью для человека при их применении, например, при применении для лечения рака.

Задачей, положенной в основу настоящего изобретения, было получение антитела, содержащего по меньшей мере одну антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с человеческим ROR2. Следующей задачей было получение антитела, содержащего две антигенсвязывающие области, которые обладают способностью связываться с человеческим ROR2. И еще одной задачей было получение биспецифического антитела, обладающего способностью связываться с человеческим ROR2 и человеческим CD3, таким как человеческий CD3ε (эпсилон). Следующей задачей было получение биспецифического антитела CD3xROR2 IgG-формата, такого как формат человеческого IgG1. Следующей задачей было получение биспецифического антитела CD3xROR2 IgG1-формата, в котором Fc-область является инертной. Следующей задачей было получение биспецифического антитела CD3xROR2, имеющего время полужизни в плазме в пределах времени полужизни

канонического человеческого антитела IgG1-формата. И еще одной задачей было получение антитела к ROR2 и/или биспецифического антитела CD3xROR2, которое эффективно и безопасно при применении для лечения рака.

Краткое изложение сущности изобретения

5 Основным объектом настоящего изобретения являются ROR2-связывающие антитела и, в частности, антитело, которое содержит по меньшей мере одну антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с человеческим ROR2, где указанное антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3
10 вариательной области тяжелой цепи (VH), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариательной области легкой цепи (VL), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно.

В следующем объекте изобретения антитело может представлять собой, в частности, биспецифическое антитело, содержащее первую
15 антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с человеческим ROR2, где указанное антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 VH-области, которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 VL-области, которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно, и
20 содержащее вторую антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с человеческим CD3, таким как человеческий CD3ε (эпсилон), таким как человеческий CD3ε (эпсилон), указанный в SEQ ID NO: 21.

Следующим объектом настоящего изобретения является биспецифическое антитело, содержащее первую антигенсвязывающую область, которая обладает
25 способностью связываться с человеческим ROR2, указанную в настоящем описании, и вторую антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с человеческим CD3, где указанное антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 VH-области, которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно, и
30 CDR1, CDR2 и CDR3 VL-области, которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 27, GTN и SEQ ID NO: 28.

Другим объектом настоящего изобретения является конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая

а) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, которая содержит указанную в настоящем описании антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с ROR2, и/или

б) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, которая содержит указанную в настоящем описании антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с ROR2.

10 Другим объектом настоящего изобретения является экспрессионный вектор, содержащий

а) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, которая содержит указанную в настоящем описании антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с ROR2, и/или

б) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, которая содержит указанную в настоящем описании антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с ROR2.

20 Следующим объектом настоящего изобретения является клетка, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты или экспрессионный вектор, указанную/указанный в настоящем описании.

Другим объектом настоящего изобретения является композиция, содержащая антитело, указанное в одном из объектов или вариантов осуществления изобретения, которые представлены в настоящем описании.

25 Следующим объектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая антитело, указанное в одном из объектов или вариантов осуществления изобретения, которые представлены в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель.

30 Следующим объектом настоящего изобретения является антитело, указанное в одном из объектов или вариантов осуществления изобретения, которые представлены в настоящем описании, предназначенное для применения в качестве лекарственного средства, такого как применение для лечения заболевания.

Другим объектом настоящего изобретения является способ лечения заболевания или нарушения, включающий введение антитела, композиции или фармацевтической композиции, которые указаны в одном из объектов или вариантов осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, субъекту, который нуждается в этом.

Одним из объектов изобретения является способ получения антитела, указанного в одном из объектов или вариантов осуществления изобретения, которые представлены в настоящем описании, включающий культивирование рекомбинантной клетки-хозяина в культуральной среде и в условиях, пригодных для получения антитела.

Следующим объектом настоящего изобретения является состоящий из частей набор, содержащий антитело, указанное в настоящем описании; и инструкции по применению указанного набора.

Эти и другие объекты и варианты осуществления изобретения описаны более подробно ниже.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - результаты оценки связывания с ROR2, экспрессируемым на клетках рака шейки матки линии HeLa, кроличьего-человеческого химерного антитела chIgG1-ROR2-A-FEAR и его гуманизированных вариантов, предлагаемых в изобретении, полученные с помощью проточной цитометрии;

на фиг. 2 - результаты оценки связывания биспецифических антител CD3xROR2 и моноспецифических антител к ROR2, предлагаемых в изобретении, с CHO-клетками, которые экспрессируют ROR2 человека или обезьян циномоглус (яванский макак). Связывание bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR, chIgG1-ROR2-A-FEAR и IgG1-ROR2-A-NC4LC3-FEAR с CHO-клетками, экспрессирующими ROR2 человека (левые панели) или ROR2 обезьян циномоглус (правые панели), определяли с помощью проточной цитометрии. Нетрансфектированные CHO-клетки применяли в качестве отрицательного контроля (данные не представлены);

на фиг. 3 - результаты оценки связывания моноспецифических в отношении ROR2 и биспецифических антител CD3xROR2, предлагаемых в изобретении, с

СНО-клетками, экспрессирующими ROR2 человека, обезьян циномоглус или T322M-вариант ROR2 обезьян циномоглус. Связывание chIgG1-ROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR определяли с помощью проточной цитометрии;

5 на фиг. 4 - результаты оценки связывания биспецифических антител CD3xROR2, предлагаемых в изобретении, с СНО-клетками, экспрессирующими T322M-вариант ROR2 обезьян циномоглус. Связывание bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR с СНО-клетками, экспрессирующими RORmf-T322M, определяли с помощью проточной цитометрии;

на фиг. 5 - результаты оценки связывания биспецифических антител CD3xROR2, предлагаемых в изобретении, с экспрессирующими ROR2 CD3-негативными клеточными линиями человеческих опухолей. (А) Результаты оценки связывания bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR с клетками человеческих опухолей линии HeLa (рак шейки матки), LCLC103-H (крупноклеточный рак легкого), NCI-H1650 (аденокарцинома легкого), 786-O (почечно-клеточная аденокарцинома), NCI-H23 (аденокарцинома легкого) и ZR-75-1 (протоковая карцинома молочной железы). Связывание определяли с помощью проточной цитометрии. Антитело bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxb12-FEAR, обладающее способностью связываться с CD3, но не с ROR2, применяли в качестве антитела, представляющего собой отрицательный контроль. (Б) Данные об уровнях экспрессии ROR2 на тестируемых опухолевых клеточных линиях, определенные с помощью QIFI (количественная флуоресцентная проточная цитометрия)-анализа; представлены результаты индивидуальных анализов (n=4-6), медиана и диапазон. sABC: специфическая связывающая активность антитела;

на фиг. 6 – результаты оценки индукции *in vitro* опосредуемой Т-клетками цитотоксичности в совместных культурах ROR2-позитивных клеток HeLa и Т-клеток здорового донора при различных соотношениях эффекторных клеток и клеток-мишеней (Е:Т) в присутствии биспецифических антител CD3xROR2 bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR. Антитело bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, обладающее способностью

связываться с CD3, но не с ROR2, применяли в качестве антитела, представляющего собой отрицательный контроль. Выживаемость клеток HeLa использовали в качестве показателя опосредуемой Т-клетками цитотоксичности;

на фиг. 7 - результаты оценки индукции *in vitro* цитотоксичности в различных опухолевых клеточных линиях при применении биспецифических антител CD3xROR2 bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR в присутствии Т-клеток здорового донора. Антитело bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, обладающее способностью связываться с CD3, но не с ROR2, применяли в качестве антитела, представляющего собой отрицательный контроль. Выживаемость опухолевых клеток использовали в качестве показателя опосредуемой Т-клетками цитотоксичности;

на фиг. 8 – данные о максимальном достигнутом цитолизе опухолевых клеток с помощью опосредуемого Т-клетками цитолиза опухолевых клеток в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR, полученные для различных опухолевых клеточных линий (2-7 доноров каждой клеточной линии). Клеточные линии ранжировали в соответствии с уровнем экспрессии ROR2. Максимальный достигнутый цитоллиз опухолевых клеток определяли как разницу между верхней и нижней частями кривой дозовой зависимости, представленной в виде среднего значения и стандартного отклонения (для наглядности представлены либо выше, либо ниже среднего значения). Вертикальная пунктирная линия указывает нижний предел обнаружения QIFI-анализа, применяемого для определения уровней экспрессии ROR2. sABC: специфическая связывающая активность антитела;

на фиг. 9 (А) – данные о концентрации цитокина IL-6 в супернатанте совместных культур Т-клеток – опухолевых клеток с повышающимися концентрациями антитела bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR при использовании Т-клеток из 2 доноров и клеток 786-О в качестве клеток-мишеней. (Б) Концентрации IFN-гамма, IL-6, IL-8 и IL-10, ассоциированные с опосредуемой Т-клетками цитотоксичностью, в 50% и 90% опухолевых клеток (IC_{50} и IC_{90}), измеренные в супернатанте совместных культур Т-клеток – опухолевых клеток (HeLa или 786-О), в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR или bsIgG1-huCD3-

H101G-FEALxchROR2-A-FEAR. Уровни цитокинов определяли с помощью мультиплексного анализа U-plex. На фиг. 9(А) представлены кривые дозовой зависимости. На фиг. 9(Б) представлены геометрические средние и стандартное отклонение («усы»). Представлены результаты, полученные с использованием Т-клеток двух доноров на одну клеточную линию;

на фиг.10 – результаты оценки цитотоксической активности в присутствии биспецифических антител CD3xROR2 bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR в клетках HeLa при использовании PBMC обезьян циномогус в качестве источника Т-клеток *in vitro*. Антитело bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, обладающее способностью связываться с CD3, но не с ROR2, применяли в качестве антитела, представляющего собой отрицательный контроль;

на фиг. 11 – результаты оценки индукции активации Т-клеток в популяции PBMC обезьян циномогус в присутствии биспецифических антител CD3xROR2 bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR и клеток HeLa. Активацию Т-клеток (% CD69, CD25 или PD-1 на CD8+ клетках) в присутствии антитела и клеток HeLa определяли с помощью проточной цитометрии. Антитело bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, обладающее способностью связываться с CD3, но не с ROR2, применяли в качестве антитела, представляющего собой отрицательный контроль;

на фиг. 12 – результаты оценки уровней экспрессии мРНК ROR2 в отобранных первичных солидных опухолях. Данные об уровнях мРНК ROR2 получали из базы данных Omicsoft TCGA и визуализировали с использованием программного обеспечения Oncoland. Показания ранжировали в соответствии с медианой экспрессии мРНК ROR2. LIHC = печеночно-клеточная карцинома печени, renal-all = рак почки (объединенный почечно-светлоклеточный рак почки, хромофобный рак почки и папиллярно-клеточный рак почки, metast. mel = метастатическая меланома кожи, prim. melanoma = первичная меланома кожи, COAD = аденокарцинома ободочной кишки, LUAD = аденокарцинома легкого, CESC = плоскоклеточная карцинома шейки матки, BLCA = уротелиальная карцинома мочевого пузыря, HNSC = плоскоклеточная карцинома головы и шеи, LUSC = плоскоклеточная карцинома легкого, OV = серозная

цистаденокарцинома яичников, BRCA = инвазивная карцинома молочной железы, PAAD = аденокарцинома поджелудочной железы, UCEC = карцинома эндометрия тела матки, UCS = карциносаркома матки, SARC = саркома.

Подробное описание изобретения

5 Определения

В контексте настоящего изобретения понятие «антитело» (Ат) относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному любой из указанных молекул, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном. Антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит Fc-домен иммуноглобулина и антигенсвязывающую область. Как правило, антитело содержит два СН₂-СН₃-участка и соединяющую область, например, шарнирную область, например, по меньшей мере Fc-домен. Таким образом, антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, может содержать Fc-область и антигенсвязывающую область. Вариабельные области тяжелых и легких цепей молекулы иммуноглобулина содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области или «Fc»-области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент классического пути активации комплемента. В контексте настоящего описания, если это не противоречит контексту, Fc-область иммуноглобулина, как правило, содержит по меньшей мере СН₂-домен и СН₃-домен СН иммуноглобулина и может содержать соединяющую область, например, шарнирную область. Fc-область, как правило, находится в димеризованной форме, благодаря, например, дисульфидным мостикам, которые соединяют две шарнирные области, и/или нековалентным взаимодействиям между двумя СН₃-участками. Димер может представлять собой гомодимер (в котором аминокислотные последовательности двух мономеров Fc-области являются идентичными) или гетеродимер (в котором аминокислотные последовательности двух мономеров Fc-области отличаются одной или большим количеством аминокислот). Как хорошо известно в данной области, представляющий собой Fc-область фрагмент полноразмерного антитела можно получать, например, путем расщепления полноразмерного антитела папаином.

Антитело, указанное в настоящем описании, может помимо Fc-области и антигенсвязывающей области содержать дополнительно одну или обе такие области иммуноглобулина, как CH1-область и CL-область. Антитело может представлять собой также мультиспецифическое антитело, такое как

5 биспецифическое антитело, или сходную молекулу. Понятие «биспецифическое антитело» относится к антителу, которое обладает специфичностями в отношении по меньшей мере двух различных, как правило, не перекрывающихся эпитопов. Указанные эпитопы могут находиться на одной и той же мишени или на различных мишенях. Если эпитопы находятся на различных мишенях, то

10 такие мишени могут присутствовать в одной и той же клетке или в различных клетках или типах клеток. Как указано выше, если не указано иное или это явно не противоречит контексту, то в контексте настоящего описания понятие антитело включает фрагменты антитела, которые содержат по меньшей мере часть Fc-области и которые сохраняют способность специфически связываться с

15 антигеном. Указанные фрагменты можно получать с помощью любого известного метода, такого как ферментативное расщепление, пептидный синтез и технологии рекомбинантной экспрессии. Известно, что антигенсвязывающую функцию антитело могут осуществлять фрагменты полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, подпадающих под понятие «Ат» или

20 «антитела», включают (но не ограничиваясь только ими) одновалентные антитела (описанные в WO 2007/059782, фирма Genmab); антитела из тяжелых цепей, которые состоят только из двух тяжелых цепей и которые встречаются в естественных условиях, например, в представителях семейства верблюдовых (см., например, Hamers-Casterman Nature 363, 1993, с. 446); ThioMab (фирма

25 Roche, WO 2011/069104), созданные с помощью обмена цепей (SEED или Seed-боди), которые являются ассиметричными, и подобные биспецифическим антителам молекулы (фирма Merck, WO 2007/110205); Triomab (фирма Pharma/Fresenius Biotech, Lindhofer и др., J Immunol 155, 1995, с. 219; WO 2002/020039); FcΔAdp (фирма Regeneron, WO 2010/151792), ассиметричный

30 каркас (фирма Zymeworks/Merck, WO 2012/058768), mAb-Fv (фирма Xencor, WO 2011/028952) Xmab (фирма Xencor), иммуноглобулин с двумя переменными доменами (фирма Abbott, DVD-Ig, патент США № 7612181); антитела с двумя доменами и двойной «головкой» (фирмы Unilever; Sanofi Aventis, WO

2010/0226923), двойные диабоды (фирма ImClone/Eli Lilly), антитела формата «Knobs-into-holes» (фирма Genentech, WO 98/50431); DuoBody (фирма Genmab, WO 2011/131746); биспецифический IgG1 и IgG2 (фирма Pfizer/ Rinat, WO 11/143545), DuetMab (фирма MedImmune, US 2014/0348839), регулируемые электростатическими силами форматы антител (фирма Amgen, EP 1870459 и WO 2009/089004; фирма Chugai, US 201000155133; фирма Oncomed, WO 2010/129304 A2); биспецифические IgG1 и IgG2 (фирма Rinat neurosciences Corporation, WO 11/143545) CrossMAb (фирма Roche, WO 2011/117329), LUZ-Y (фирма Genentech), Biclonic (фирма Merus, WO 2013/157953), антитела с доменом двойного нацеливания (фирма GSK/Domantis), антитела «два в одном» или Fab двойного действия, распознающие две мишени (фирмы Genentech, NovImmune, Adimab), перекрестно сшитые Mab (фирма Karmanos Cancer Center), ковалентно связанные Mab (фирма AIMM), CovX-боды (фирма CovX/Pfizer), FynomAb (фирма Covagen/Janssen ilag), DutaMab (фирма Datalys/Roche), iMab (фирма MedImmune), IgG-подобные биспецифические антитела (фирма ImClone/Eli Lilly, Shen, J. и др., J Immunol Methods, 318(1-2), 2007, сс. 65-74), TIG-боды, DIG-боды и FIG-боды (фирма Pharmabcine), перенацеливающие (переориентирующие) молекулы двойного сродства (Fc-DART или Ig-DART, фирма MacroGenics, WO 2008/157379, WO 2010/080538), BEAT (фирма Glenmark), Zybodies (фирма Zyngenia), антитела, полученные с помощью подходов с использованием общей легкой цепи (фирма Crucell/ Merus, US 7262028) или общих тяжелых цепей (κλBodies, фирма NovImmune, WO 2012/023053), а также слитые белки, содержащие полипептидную последовательность, слитую с фрагментом антитела, который содержит подобные Fc-области scFv-слияния, типа BsAb фирмы ZymoGenetics/BMS, HERCULES фирмы Biogen Idec (US 007951918), SCORPIONS фирмы Emergent BioSolutions/Trubion и Zymogenetics/BMS, Ts2Ab (фирма MedImmune/AZ (Dimasi N. и др., J Mol Biol, 393(3), 2009, сс. 672-692), scFv-слияние фирмы Genentech/Roche, scFv-слияние фирмы Novartis, scFv-слияние фирмы Immunomedics, scFv-слияние фирмы Changzhou Adam Biotech Inc (CN 102250246), TvAb фирмы Roche, WO 2012025525, WO 2012025530), mAb2 фирмы f-Star, WO 2008/003116) и двойные scFv-слияния. Должно быть очевидно, что понятие «антитело», если не указано иное, включает моноклональные антитела (такие как человеческие моноклональные антитела), поликлональные

антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, моноспецифические антитела (такие как двухвалентные моноспецифические антитела), биспецифические антитела, антитела любого изотипа и/или аллотипа; смеси антител (рекомбинантные поликлональные антитела), например, созданные с помощью технологий, разработанных фирмами Symphogen и Merus (олигоклонии (Oligoclones)), мультимерные Fc-белки, описанные в WO 2015/158867, и слитые белки, описанные в WO 2014/031646. Хотя эти различные фрагменты и форматы антител, как правило, включают в понятие антитела, они в совокупности и каждый независимо друг от друга являются уникальными отличительными признаками настоящего изобретения, которые обладают различными биологическими свойствами и ценностью.

В контексте настоящего описания «антитело к ROR2» или «анти-ROR2 антитело» означает антитело, которое специфически связывается с антигеном ROR2, в частности, человеческим ROR2.

В контексте настоящего описания понятие «вариант» относится к белковой или полипептидной последовательности, которая отличается одним или несколькими аминокислотными остатками от родительской или эталонной последовательности. Вариант может, например, иметь последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, например, на 90% или 95%, или 97%, или 98%, или 99%, родительской или эталонной последовательности. Кроме того, или альтернативно указанному, вариант может отличаться от родительской или эталонной последовательности 12 или меньшим количеством, например, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутацией(ями), такой(ими) как замены, инсерции или делеции аминокислотных остатков. Таким образом, понятия «антитело, являющееся вариантом» и «вариант антитела», которые в настоящем описании являются взаимозаменяемыми, относятся к антителу, которое отличается одним несколькими аминокислотными остатками от родительского или эталонного антитела, например, в антигенсвязывающей области, Fc-области или в обеих областях. Аналогично этому «являющаяся вариантом Fc-область» или «вариант Fc-области» относится к Fc-области, которая отличается одним несколькими аминокислотными остатками от родительской или эталонной Fc-области, необязательно отличается от аминокислотной последовательности родительской или эталонной Fc-области 12 или меньшим количеством, например, 11, 10, 9, 8,

7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутацией(ями), такой(ими) как замены, инсерции или делеции аминокислотных остатков. Родительская или эталонная Fc-область, как правило, представляет собой Fc-область человеческого антитела дикого типа, которое в зависимости от контекста, может относиться к конкретному изотипу.

5 Вариант Fc-области может находиться в димеризованной форме, представлять собой гомодимер или гетеродимер, например, в котором одна из аминокислотных последовательностей димеризованной Fc-области содержит мутацию, а другая является идентичной родительской или эталонной аминокислотной последовательности дикого типа. Примеры аминокислотных последовательностей дикого типа (как правило, родительской или эталонной последовательности) CH IgG и константной области варианта IgG, которая содержит аминокислотные последовательности Fc-области, представлены в таблице 1.

15 Подразумевается, что в контексте настоящего описания понятие «иммуноглобулиновая тяжелая цепь» или «тяжелая цепь иммуноглобулина» относится к одной из тяжелых цепей иммуноглобулина. Тяжелая цепь, как правило, состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначена в настоящем описании как VH) и константной области тяжелой цепи (сокращенно обозначена в настоящем описании как CH), которая определяет изотип иммуноглобулина. Константная область тяжелой цепи, как правило, состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Подразумевается, что в контексте настоящего описания понятие «иммуноглобулин» относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) цепей с низкой молекулярной массой и одной пары тяжелых (H) цепей, в которых все четыре цепи могут быть соединены между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована (см., например, *Fundamental Immunology*, глава 7 (под ред. Paul W., 2-ое изд., изд-во Raven Press, N.Y. 1989). В структуре иммуноглобулина две тяжелые цепи соединены между собой с помощью дисульфидных связей в так называемой «шарнирной области». Аналогично тяжелым цепям каждая легкая цепь, как правило, состоит из нескольких областей: вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначена в настоящем описании как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи, как

правило, состоит из одного домена, CL. Кроме того, VH- и VL-области можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или могут образовывать структурно определенные петли),
5 которые обозначают также как определяющие комплементарность участки (CDR), перемежающиеся с более консервативными участками, которые обозначают как каркасные участки (FR). Каждая VH и VL, как правило, состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3,
10 CDR3, FR4. Последовательности CDR в настоящем описании идентифицируют в соответствии с правилами IMGT (см. Lefranc M.P., Nucl Acids Res 27, 1999, сс. 209-212; и Brochet X., Nucl Acids Res 36, 2008).

В контексте настоящего описания понятия «полумолекула», «Fab-плечо» и «плечо» относятся в одной паре тяжелая цепь – легкая цепь. Когда
15 биспецифическое антитело описывают как антитело, содержащее полумолекулу антитела, «имеющую происхождение» из первого антитела, и полумолекулу антитела, «имеющую происхождение» из второго антитела, по понятие «имеет происхождение» означает, что биспецифическое антитело создавали путем рекомбинации с помощью любого известного метода указанных полумолекул из
20 каждого из указанных первого и второго антител с получением в результате биспецифического антитела. В этом контексте не подразумевается, что «рекомбинация» ограничена каким-либо конкретным методом рекомбинации, и, таким образом, она включает все методы получения биспецифических антител, указанные ниже в настоящем описании, включая, например, рекомбинацию
25 путем обмена полумолекул (также известную как «обмен Fab-плечей») и метод DuoBody®, а также рекомбинацию на уровне нуклеиновых кислот и/или посредством совместной экспрессии двух полумолекул в одних и тех же клетках.

В контексте настоящего описания понятие «антигенсвязывающая область» или «связывающая область», или «антигенсвязывающий домен» относится к
30 области антитела, которая обладает способностью связываться с антигеном. Указанная связывающая область, как правило, определяется VH-, и VL-доменами антитела, которые можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут быть

гипервариабельными по последовательности и/или могут образовывать структурно определенные петли), которые обозначают также как определяющие комплементарность участки (CDR), перемежающиеся с более консервативными участками, которые обозначают как каркасные участки (FR). Антиген может представлять собой любую молекулу, такую как полипептид, например, присутствующую на клетке, бактерии или вирусе. Понятия «антигенсвязывающая область» и «антигенсвязывающий центр», и «антигенсвязывающий домен» можно, если это не противоречит контексту, применять взаимозаменяемо в контексте настоящего изобретения.

10 Понятия «антиген» и «мишень» можно, если это не противоречит контексту, применять взаимозаменяемо в контексте настоящего изобретения.

В контексте настоящего описания понятие «связывание» относится к связыванию антитела с заданным антигеном или заданной мишенью, при котором, как правило, аффинность связывания характеризуется K_D , составляющей $1E^{-6}M$ или менее, например, $5E^{-7}M$ или менее, $1E^{-7}M$ или менее, например, $5E^{-8}M$ или менее, например, $1E^{-8}M$ или менее, например, $5E^{-9}M$ или менее или такой как $1E^{-9}M$ или менее, при определении, например, с помощью биослойной интерферометрии с использованием антитела в качестве лиганда и антигена в качестве аналита, и когда антитело связывается с заданным антигеном с аффинностью, характеризующейся величиной K_D , которая по меньшей мере в десять раз ниже, например, по меньшей мере в 100 раз ниже, например, по меньшей мере в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере в 10000 раз ниже, например, по меньшей мере в 100000 раз ниже, чем величина аффинности связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином), отличным от заданного антигена или близкородственного антигена.

25 В контексте настоящего описания понятие « K_D » (M) относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело - антиген и ее получают путем деления k_d на k_a .

В контексте настоящего описания понятие « k_d » (s^{-1}) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанную величину обозначают также как величина k_{off} и скорость диссоциации.

В контексте настоящего описания понятие « k_a » ($M^{-1} \times c^{-1}$) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело - антиген. Указанную величину обозначают также как k_{on} или скорость ассоциации.

В контексте настоящего описания понятие «ROR2» относится к белку, обозначенному как ROR2, который известен также как рецепторный тирозинкиназоподобный орфанный рецептор 2, NTRKR2 и нейтрофическая тирозинкиназа, рецептор-зависимая 2, который представляет собой однопроходный трансмембранный гликопротеин типа I, принадлежащий к подсемейству ROR семейства тирозинпротеинкиназ. ROR2 представляет собой рецептор с тирозинкиназной активностью, важный для регуляции развития скелета и нейронов, клеточной миграции и клеточной полярности, в частности, благодаря его предполагаемой роли в неканоническом сигнальном пути Wnt5a (Oishi Genes to cells 8, 2003, с.с 645-654.) Он содержит FZ-(frizzled)-домен, Ig-(иммуноглобулин)-подобный домен типа C2, и kringle-домен во внеклеточной области и протеинкиназный домен в цитоплазматической области (Masiakowski и Carroll J Biol Chem 267, 1992, сс. 26181-26190). У людей (*Homo sapiens*) белок ROR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 (Uniprot, регистрационный № Q01974). В аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, аминокислотные остатки 1-31 представляют собой сигнальный пептид, а аминокислотные остатки 32-420 представляют собой зрелый полипептид. У обезьян циномоглус (*Macaca fascicularis*) белок ROR2 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39 (Uniprot, регистрационный №. A0A2K5UT30). В аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, аминокислотные остатки 1-34 представляют собой сигнальный пептид, а аминокислотные остатки 35-420 представляют собой зрелый полипептид.

В контексте настоящего описания понятие «CD3» относится к белку человеческого кластера дифференцировки 3, который является частью белкового комплекса Т-клеточного корцептора и состоит из четырех различных цепей. CD3 встречается также в других видах, и поэтому понятие «CD3» не ограничено человеческим CD3, если это не противоречит контексту. У млекопитающих комплекс содержит CD3 γ -(гамма) цепь (человеческая CD3 γ -цепь UniProtKB/Swiss-Prot № P09693 или CD3 γ обезьян циномоглус UniProtKB/Swiss-

Prot № Q95LI7), CD3 δ -(дельта) цепь (человеческая CD3 δ -цепь UniProtKB/Swiss-Prot № P04234 или CD3 δ обезьян циномоглус UniProtKB/Swiss-Prot № Q95LI8), две CD3 ϵ -(эпсилон) цепи (человеческая CD3 ϵ UniProtKB/Swiss-Prot № P07766; аминокислотные остатки 1-22 представляют собой сигнальный пептид, а

5 аминокислотные остатки 23-207 представляют собой зрелый полипептид CD3 ϵ , где зрелый белок в настоящем описании представлен в SEQ ID NO: 21; CD3 ϵ циномоглус UniProtKB/Swiss-Prot № Q95LI5; или CD3 ϵ макак резус UniProtKB/Swiss-Prot № G7NCB9), и CD3 ζ -цепь (дзета)-цепь (человеческая CD3 ζ UniProtKB/Swiss-Prot № P20963, CD3 ζ обезьян циномоглус UniProtKB/Swiss-Prot

10 № Q09TK0). Эти цепи связываются с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (TCR), и генерируют сигнал активации в Т-лимфоцитах. Молекулы TCR и CD3 вместе составляют комплекс TCR.

Понятие «область, с которой связывается антитело» относится к области антигена, которая содержит эпитоп, с которым связывается антитело. Область, с

15 которой связывается антитело, можно определять путем группировки эпитопов с использованием биослойной интерферометрии, путем сканирования аланином или анализов перестановок (с использованием антигенных конструкций, в которых области антигена заменяют на области из других видов и определяют, обладает ли все еще антитело способностью связываться с антигеном, или нет).

20 Аминокислотные остатки в области, с которой связывается антитело, которые вовлечены во взаимодействие с антителом, можно определять с помощью масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом и кристаллографии антитела, связанного с его антигеном.

Понятие «эпитоп» означает антигенную детерминанту, с которой

25 специфически связывается антитело. Эпитопы, как правило, состоят из поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров или их комбинации, и обычно обладают специфическими трехмерными структурными характеристиками, а также специфическими характеристиками зарядов. Конформационные и неконформационные эпитопы отличаются тем, что

30 связывание с первыми в отличие от вторых утрачивается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, которые непосредственно участвуют в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в связывании,

такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются или «охватываются» антителом при его связывании с антигеном (другими словами, аминокислотный остаток находится внутри или близко примыкает к футпринту специфического антитела).

5 В контексте настоящего описания понятия «моноклональное антитело», «моноклональное Ат», «композиция моноклонального антитела», «МАт» или т.п. относятся к препарату молекул антител одного молекулярного состава. Композиция моноклональных антител характеризуется одинаковыми специфичностью связывания и аффинностью к конкретному эпитопу. Таким
10 образом, понятие «человеческое моноклональное антитело» относится к антителам, характеризующимся одинаковой специфичностью связывания, которые имеют переменные и константные области, имеющие происхождение из последовательностей иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии. Человеческие моноклональные антитела можно получать с помощью гибридомы,
15 которая включает В-клетку, полученную из трансгенного или трансхромосомного животного кроме человека, такого как трансгенная мышь, которая имеет геном, содержащий трансген человеческой тяжелой цепи и трансген легкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой. Моноклональные антитела можно получать также из модифицированных с помощью
20 рекомбинации клеток-хозяев, или систем, в которых применяют клеточные экстракты, поддерживающие *in vitro* транскрипцию и/или трансляцию последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих антитело.

В контексте настоящего описания понятие «изотип» относится к классу иммуноглобулина (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM) или
25 любым их аллотипам, таким как IgG1m(za) и IgG1m(f)), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Кроме того, каждый изотип тяжелой цепи можно объединять с легкой либо каппа (κ)-, либо лямбда (λ)-цепью.

В контексте настоящего описания понятие «полноразмерное» относится к антителу, которое содержит одну или две пары тяжелых и легких цепей, каждая
30 из которых содержит все константные и переменные домены тяжелых и легких цепей, которые в норме присутствуют в паре тяжелая цепь – легкая цепь антитела дикого типа данного изотипа. В варианте полноразмерного антитела константные и переменные домены тяжелых и легких цепей могут содержать,

в частности, аминокислотные замены, которые улучшают функциональные свойства антитела по сравнению с полноразмерным родительским антителом или антителом дикого типа. Полноразмерное антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, можно получать с использованием метода, включающего стадии (I) клонирования последовательностей CDR в приемлемом векторе, который содержит полные последовательности тяжелых цепей и полную последовательность легкой цепи, и (II) экспрессии полных последовательностей тяжелых и легких цепей в приемлемых экспрессионных системах. Получение полноразмерного антитела, начиная процесс либо с последовательностей CDR, либо с полных последовательностей переменных областей, находится в компетенции специалиста в данной области. Таким образом, специалисту в данной области очевидно, как создавать полноразмерное антитело, предлагаемое в настоящем изобретении.

В контексте настоящего описания понятие «человеческое антитело» относится к антителам, которые имеют переменные области и каркасные участки, имеющие происхождение из последовательностей иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии, и константный домен человеческого иммуноглобулина. Человеческие антитела, предлагаемые в изобретении, могут включать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии (например, мутации, инсерции или делеции, интродуцированные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*). Однако в контексте настоящего описания не подразумевается, что «человеческое антитело» включает антитела, в которых последовательности CDR, имеющие происхождение из зародышевой линии антител других видов кроме человека, таких как мыши, трансплантированы в последовательности человеческих каркасных участков.

В контексте настоящего описания понятие «гуманизированное антитело» относится к генетически сконструированному нечеловеческому антителу, которое содержит константные домены человеческого антитела и переменные домены нечеловеческого антитела, модифицированные так, чтобы они обладали высоким уровнем гомологии последовательности с человеческими переменными доменами. Для достижения этого можно трансплантировать

шесть определяющих комплементарность участков (CDR) нечеловеческого антитела, которые вместе образуют антигенсвязывающий центр, в гомологичную человеческую акцепторную каркасную область (FR) (см. WO 92/22653 и EP0629240). Для полного восстановления аффинности и специфичности связывания родительского антитела может требоваться замена каркасных остатков из родительского антитела (т.е. нечеловеческого антитела) на остатки человеческой каркасной области (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может способствовать идентификации аминокислотных остатков в каркасных участках, которые являются важными для связывающих свойств антитела. Таким образом, гуманизированное антитело может содержать последовательности нечеловеческих CDR, преимущественно человеческие каркасные участки, необязательно содержащие одну или несколько обратных мутаций аминокислот в нечеловеческую аминокислотную последовательность, и полностью человеческие константные области. Необязательно можно применять дополнительные аминокислотные модификации, которые необязательно представляют собой обратные мутации, для получения гуманизированного антитела с предпочтительными характеристиками, такими как аффинность и биохимические свойства.

В контексте настоящего описания понятие «Fc-область» относится к области, содержащей в направлении от N- к C-концу антитела по меньшей мере шарнирную область, CH2-участок и CH3-участок. Fc-область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента.

В контексте настоящего описания понятие «шарнирная область» относится к шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, шарнирная область человеческого антитела IgG1-изотипа соответствует аминокислотам 216-230 согласно Eu-нумерации, представленной у Kabat E.A. и др., Sequences of proteins of immunological interest. 5-ое изд. - US Department of Health and Human Services, публикация NIH № 91-3242, 1991, сс. 662, 680, 689. Однако шарнирная область может относиться к любому из других подтипов, указанных в настоящем описании.

В контексте настоящего описания понятие «СН1-участок» или «СН1-домен» относится к СН1-участку тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, СН1-участок человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 118-215 согласно Eu-нумерации, представленной у Kabat (там же). Однако СН1-участок может относиться к любому из других подтипов, указанных в настоящем описании.

В контексте настоящего описания понятие «СН2-участок» или «СН2-домен» относится к СН1-участку тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, СН2-участок человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 231-340 согласно Eu-нумерации, представленной у Kabat (там же). Однако СН2-участок может относиться к любому из других подтипов, указанных в настоящем описании.

В контексте настоящего описания понятие «СН3-участок» или «СН3-домен» относится к СН3-участку тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, СН3-участок человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 341-447 согласно Eu-нумерации, представленной у Kabat (там же). Однако СН3-участок может относиться к любому из других подтипов, указанных в настоящем описании.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие «опосредуемые Fc эффекторные функции» относится к функциям, которые являются следствием связывания полипептида или антитела с его мишенью или антигеном на клеточной мембране, где опосредуемая Fc эффекторная функция определяется Fc-областью полипептида или антитела. Примеры опосредуемых Fc эффекторных функций включают (I) связывание C1q, (II) активацию комплемента, (III) комплементзависимую цитотоксичность (CDC), (IV) антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC), (V) связывание Fc-гамма рецептора (FcγR), (VI) антитело-зависимое опосредуемое FcγR перекрестное сшивание антигена, (VII) антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), (VIII) комплементзависимую клеточную цитотоксичность (CDCC), (IX) усиливаемую комплементом цитотоксичность, (X) связывание с рецептором комплемента опсонизированного антитела, опосредуемое антителом, (XI) опсонизацию и (XII) комбинацию функций, указанных в любом из подпунктов (I)-(XI).

В контексте настоящего описания понятие «инертность», «инертная» или «неактивирующая» относится к Fc-области, которая по меньшей мере не обладает способностью связываться с любым FcγR, индуцируя опосредуемое Fc перекрестное сшивание FcγR-рецепторов или индуцируя опосредуемое FcγR перекрестное сшивание антигенов-мишеней через две Fc-области
5 индивидуальных антител, или которая не обладает способностью связываться с C1q. Инертность Fc-области антитела можно тестировать с использованием антитела в моноспецифическом или биспецифическом формате. Fc-области, имеющие мутации FEA, описанные ниже, являются примерами инертных Fc-
10 областей. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-область является инертной. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления изобретения некоторые или все опосредуемые Fc эффекторные функции ослаблены или полностью отсутствуют.

Понятие «полноразмерное» касательно антитела указывает на то, что
15 антитело не представляет собой фрагмент, а содержит все домены конкретного изотипа, которые в норме характерны для этого изотипа в естественных условиях, например, VH-, CH1-, CH2-, CH3-домены, шарнир, VL и CL-домены в случае антитела изотипа IgG1.

В контексте настоящего изобретения понятие «одновалентное антитело»
20 относится к молекуле антитела, которая может взаимодействовать со специфическим эпитопом антигена с помощью только одного антигенсвязывающего домена (например, одного Fab-плеча). В контексте биспецифического антитела понятие «одновалентное связывание антитела» относится к связыванию биспецифического антитела с одним специфическим
25 эпитопом антигена с помощью только одного антигенсвязывающего домена (например, одного Fab-плеча).

В контексте настоящего изобретения понятие «моноспецифическое антитело» относится к антителу, которое обладает способностью специфически
30 связываться только с одним эпитопом. Антитело может представлять собой моноспецифическое одновалентное антитело (т.е. антитело, несущее только одну антигенсвязывающую область) или моноспецифическое двухвалентное антитело (т.е. антитело с двумя идентичными антигенсвязывающими областями).

Понятие «биспецифическое антитело» относится к антителу, имеющему два неидентичных антигенсвязывающих домена, т.е. два неидентичных Fab-плеча или два Fab-плеча с неидентичными CDR-участками. В контексте настоящего изобретения биспецифические антитела обладают специфичностью в отношении по меньшей мере двух различных эпитопов. Указанные эпитопы могут находиться на одних и тех же или различных антигенах или мишенях. Если эпитопы находятся на различных антигенах, то такие антигены могут присутствовать на одной и той же клетке или на различных клетках, типах клеток или структурах, таких как внеклеточный матрикс или везикулы и растворимый белок. Таким образом, биспецифическое антитело может обладать способностью к перекрестному сшиванию нескольких антигенов, например, двух различных клеток. Конкретное биспецифическое антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, обладает способностью связываться с ROR2 и CD3, которые, как правило, не экспрессируются на одной и той же клетке, и поэтому обладает способностью перекрестно сшивать две различные клетки, каждая из которых экспрессирует одну из указанных мишеней, такие как опухолевая клетка и Т-клетка.

Понятие «двухвалентное антитело» относится к антителу, которое имеет две антигенсвязывающие области, которые связываются с эпитопами на одной/одном или двух мишенях или антигенах или связываются с одним или двумя эпитопами на одном и том же антигене. Таким образом, двухвалентное антитело может представлять собой моноспецифическое двухвалентное антитело или биспецифическое двухвалентное антитело.

В контексте настоящего описания понятия «аминокислота» и «аминокислотный остаток» можно применять взаимозаменяемо, и они не должны рассматриваться как ограничивающие понятия. Аминокислоты представляют собой органические соединения, содержащие амино- ($-NH_2$) и карбоксильную ($-COOH$) функциональные группы наряду с боковой цепью (R-группа), специфической для каждой аминокислоты. В контексте настоящего изобретения аминокислоты можно классифицировать на основе структуры и химических характеристик. Таким образом, классы аминокислот могут быть представлены в одной или обеих следующих таблицах:

Основная классификация, основанная на структуре и основных химических характеристиках R-группы

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

Альтернативные физические и функциональные классификации

5 аминокислотных остатков

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

Замена одной аминокислоты на другую можно классифицировать как консервативную или неконсервативную замену. В контексте изобретения понятие «консервативная замена» обозначает замену одной аминокислоты на другую аминокислоту, которая имеет сходные структурные и/или химические характеристики, например, замену одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток этого же класса, указанный в любой из двух приведенных выше таблиц: например, лейцин можно заменять на изолейцин, поскольку обе аминокислоты являются алифатическими разветвленными гидрофобными. Аналогично этому аспарагиновую кислоту можно заменять на глутаминовую кислоту, поскольку обе представляют собой низкомолекулярные отрицательно заряженные остатки.

В контексте настоящего изобретения замену в антителе обозначают следующим образом:

исходная аминокислота – положение – применяемая в качестве замены аминокислота.

5 В соответствии с общепризнанной номенклатурой аминокислот используют трехбуквенный или однобуквенный код, включая коды «Хаа» или «Х» для обозначения любого аминокислотного остатка. Так, Хаа или Х могут, как правило, обозначать любую из 20 встречающихся в естественных условиях аминокислот. В контексте настоящего описания понятие «встречающийся в
10 естественных условиях» относится любому из следующих аминокислотных остатков: глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин, лизин, аргинин, гистидин, аспарагиновая кислота, аспарагин, глутаминовая кислота, глутамин, пролин, триптофан, фенилаланин, тирозин, метионин и цистеин. Соответственно обозначение «K409R» или «Lys409Arg» означает, что антитело
15 содержит замену лизина на аргинин в аминокислотном положении 409.

Замену аминокислоты в данном положении на любую аминокислоту обозначают как:

исходная аминокислота- положение; или, например, «K409».

20 При модификации, в которой исходная(ые) аминокислота(ы) и/или применяемая(ые) в качестве замены аминокислота(ы) могут включать более одной, но не все аминокислоты, более чем одна аминокислота может быть отделена символом «,» или «/». Например, замену лизина на аргинин, аланин или фенилаланин в положении 409 обозначают как:

25 «Lys409Arg,Ala,Phe» или «Lys409Arg/Ala/Phe», или «K409R,A,F», или «K409R/A/F», или «K409 на R, A или F».

Такие обозначения можно использовать взаимозаменяемо в контексте изобретения, но они должны иметь одинаковые значение и цель.

30 Кроме того, под понятие «замена» подпадает замена на любую одну или другую из 19 встречающихся в естественных условиях аминокислот или на другие аминокислоты, такие как не встречающиеся в естественных условиях аминокислоты. Например, замена аминокислоты К в положении 409 включает каждую из следующих замен: 409A, 409C, 409D, 409E, 409F, 409G, 409H, 409I, 409L, 409M, 409N, 409Q, 409R, 409S, 409T, 409V, 409W, 409P и 409Y. Причем,

это эквивалентно обозначению 409X, где X обозначает любую аминокислоту, отличную от исходной аминокислоты. Указанные замены можно обозначать также как K409A, K409C и т.д. или K409A,C и т.д. или K409A/C/и т.д. То же самое применимо по аналогии к каждой позиции, упомянутой в настоящем описании, для конкретного включения в настоящее описание любой из таких замен.

Антитело, предлагаемое в изобретении, может содержать также делецию аминокислотного остатка. Указанную делецию можно обозначать также как «del», и это включает, например, такую запись, как K409del. Таким образом, в указанных вариантах осуществления изобретения лизин в положении 409 удален в результате делеции из аминокислотной последовательности.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие «клетка-хозяин» относится к клетке, в которую интродуцирован экспрессионный вектор. Должно быть очевидно, что подразумевается, что указанные понятия относятся не только к конкретной рассматриваемой клетке, то также и к потомству указанной клетки. Из-за определенных модификаций, которые могут происходить в последующих поколениях либо вследствие мутации, либо под воздействием окружающей среды, такое потомство может фактически не быть идентичным родительской клетке, но все еще подпадает под понятие «клетка-хозяин». Рекомбинантные клетки-хозяева включают, например, трансфектомы, такие как CHO-клетки, HEK-293-клетки, Expi293F-клетки, PER.C6-клетки, NS0-клетки и лимфоцитарные клетки и прокариотические клетки, такие как *E. coli*, и другие эукариотические клетки-хозяева, такие как растительные клетки и грибы.

В контексте настоящего описания понятие «трансфектома» включает рекомбинантные эукариотические клетки-хозяева, экспрессирующие антитело или антиген-мишень, такие как CHO-клетки, PER.C6-клетки, NS0-клетки, HEK-293-клетки, Expi293F-клетки, растительные клетки или грибы, включая клетки дрожжей.

Для целей настоящего изобретения идентичность последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями определяют с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman и Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 1970, сс. 443-453), реализованного в программе Needle пакета программ EMBOSS (EMBOSS: Европейский открытый программный пакет по

молекулярной биологии, Rice и др., Trends Genet. 16, 2000, сс. 276-277), предпочтительно версия 5.0.0 или более поздняя. Применяют следующие параметры; штраф за открытие бреши 10, штраф за удлинение бреши 0,5, и матрица замещения EBLOSUM62 (EMBOSS-версия BLOSUM62). Выходные

5 данные программы Needle с надписью «самая длинная идентичность» (полученные с использованием опции -nobrief) используют в качестве процента идентичности и рассчитывают следующим образом:

(идентичные остатки × 100)/(длина выравнивания – общее количество брешей в выравнивании).

10 Сохранение сходных остатков можно также или альтернативно этому измерять с помощью показателя сходства, определяемого с помощью программы BLAST (например, версия BLAST 2.2.8, доступная на NCBI, с использованием стандартных установок BLOSUM62, открытие бреши =11 и удлинение бреши=1). Приемлемые варианты, как правило, характеризуются сходством с родительской
15 последовательностью, составляющим по меньшей мере примерно 45%, например, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или более (например, примерно 99%).

20 В контексте настоящего описания понятие «интернализированный» или «интернализация» относится к биологическому процессу, в ходе которого молекулы, такие как антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, поглощаются клеточной мембраной и попадают внутрь клетки. Интернализацию можно обозначать также как «эндоцитоз»

25 В контексте настоящего описания понятие «эффекторная клетка» относится к иммунной клетке, которая участвует в эффекторной фазе иммунного ответа. Примеры иммунных клеток включают клетку миелоидного или лимфоидного происхождения, например, лимфоциты (такие как В-клетки и Т-клетки, включая цитолитические Т-клетки (CTL)), клетки-киллеры, естественные клетки-киллеры, макрофаги, моноциты, эозинофилы, полиморфноядерные клетки, такие как нейтрофилы, гранулоциты, тучные клетки и базофилы. Некоторые эффекторные клетки экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) или рецепторы
30 комплемента и обладают специфическими иммунными функциями. В некоторых

вариантах осуществления изобретения эффекторная клетка, например, естественная клетка-киллер, обладает способностью индуцировать ADCC. Например, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки и клетки Купфера, которые экспрессируют FcR, участвуют в специфическом цитолизе клеток-мишеней и/или презентации антигенов другим компонентам иммунной системы, или связываются с клетками, которые презентуют антигены. В некоторых вариантах осуществления изобретения ADCC можно дополнительно усиливать посредством управляемой антителами классической активации комплемента, приводящей к отложению активированных C3-фрагментов на клетке-мишени. Продуктами расщепления C3 являются лиганды для рецепторов комплемента (CR), таких как CR3, который экспрессируется на миелоидных клетках. Распознавание фрагментов комплемента CR на эффекторных клетках может способствовать усилению Fc-опосредуемой ADCC. В некоторых вариантах осуществления изобретения классическая активация комплемента, управляемая антителами, приводит к образованию C3-фрагментов в клетке-мишени. Указанные продукты расщепления C3 могут контролировать комплементзависимую клеточную цитотоксичность (CDCC). В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторная клетка может поглощать путем фагоцитоза антиген-мишень, частицу-мишень или клетку-мишень, что может зависеть от связывания антител и опосредоваться Fc γ R, которые экспрессируются эффекторными клетками. Экспрессия конкретного FcR или рецептора комплемента на эффекторной клетке может регулироваться гуморальными факторами, такими как цитокины. Например, установлено, что экспрессия Fc γ RI может подвергаться повышающей регуляции с помощью интерферона γ (IFN γ) и/или G-CSF. Указанная усиленная экспрессия повышает цитотоксическую активность несущих Fc γ RI клеток в отношении мишеней. Эффекторная клетка может поглощать посредством фагоцитоза антиген-мишень или лизировать клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления изобретения классическая активация комплемента, управляемая антителами, приводит к образованию C3-фрагментов на клетке-мишени. Указанные продукты расщепления C3 могут способствовать фагоцитозу эффекторными клетками прямо или косвенно путем усиления опосредуемого антителами фагоцитоза.

Понятие «эффекторные Т-клетки» или «Teffs», или «Teff» относится к Т-лимфоцитам, которые выполняют функцию иммунного ответа, такую как цитолиз опухолевых клеток и/или активация противоопухолевого иммунного ответа, который может приводить к элиминации опухолевых клеток из организма. Примеры фенотипов Teff включают CD3+CD4+ и CD3+CD8+. Teff могут секретировать, содержать или экспрессировать маркеры, такие как IFN γ , гранзим В и ICOS. Должно быть очевидно, что Teff могут не быть полностью ограничены указанными фенотипами.

В контексте настоящего описания понятие «активация комплемента» относится к активации классического пути комплемента, который инициируется крупным макромолекулярным комплексом, называемым C1, который связывается с комплексами антитело-антиген на поверхности. C1 представляет собой комплекс, который состоит из 6 распознающих белков C1q и гетеротетрамера сериновых протеаз C1r2C1s2. C1 является первым белком комплекса на ранних стадиях классического каскада комплемента, который включает в себя серию реакций расщепления, начинающихся с расщепления C4 до C4a и C4b и C2 до C2a и C2b. C4b депонируется и образует вместе с C2a ферментативно активную конвертазу, называемую C3-конвертазой, которая расщепляет компонент комплемента C3 до C3b и C3a, которые образуют C5-конвертазу. Указанная C5-конвертаза расщепляет C5 до C5a и C5b, и последний компонент депонируется на мембране, и это в свою очередь запускает последние события активации комплемента, при которых происходит сборка конечных компонентов комплемента C5b, C6, C7, C8 и C9 с образованием мембрано-атакующего комплекса (MAC). Каскад комплемента приводит к созданию пор в клеточной мембране, что вызывает лизис клетки, а также приводит к комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Активацию комплемента можно оценивать, используя анализы эффективности C1q, CDC-кинетики, CDC (описанные в WO 2013/004842, WO 2014/108198) или с помощью оценки диспозиции на клетках C3b и C4b методом, описанным у Beurskens и др., J Immunol, т. 188, № 7, 1 апреля 2012 г., сс. 3532-3541.

Понятие «лечение» относится к введению в эффективном количестве терапевтически активного варианта антитела, предлагаемого в настоящем

изобретении, с целью ослабления, улучшения состояния, купирования или искоренения (излечения) симптомов или болезненных состояний.

Понятие «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение 5 периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и вес индивидуума и способность антитела вызывать требуемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество может представлять 10 собой также количество, в котором любые токсические или вредные действия варианта антитела перевешиваются терапевтически полезными действиями.

Конкретные варианты осуществления изобретения

Антитела

В первом объекте настоящего изобретения предложено антитело, 15 содержащее по меньшей мере одну антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с человеческим ROR2, где указанное антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL), 20 которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно. Так, указанное антитело может являться одновалентным, двухвалентным или многовалентным в отношении ROR2.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело содержит две антигенсвязывающие области, которые обладают способностью связываться с 25 человеческим ROR2, где указанное антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно. Указанное антитело 30 может представлять собой каноническое двухвалентное антитело.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело к ROR2 представляет собой гуманизованную форму антитела, которая содержит VH-область, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и/или

VL-область, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, где указанные области обладают способностью связываться с человеческим ROR2. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой гуманизованную форму антитела, которая представляет собой химерное антитело, содержащее кроличью переменную область тяжелой цепи (VH), представленную в SEQ ID NO: 2, и легкой цепи (VL), представленную в SEQ ID NO: 6, и содержащее человеческие константные области, такие как области легкой каппа-цепи Ig и тяжелой цепи IgG1 аллотипа G1m(f). Одним из примеров такого химерного антитела является chIgG1-ROR2-A. Таким образом, предложено химерное антитело, которое обладает высокой способностью связываться с клетками HeLa и которое связывается с человеческим ROR2 и не связывается с человеческим ROR1. Указанное антитело представляет собой ценную «исходную точку» для создания гуманизованных антител, обладающих высокой способностью связываться с ROR2 и/или клетками HeLa и другими экспрессирующими ROR2 опухолевыми клетками.

Хотя специалисту в данной области должно быть очевидно, как гуманизовать антитело, полученное из вида кроме человека, гуманизацию антител, предлагаемых в изобретении, можно осуществлять согласно методу, представленному в настоящем описании в примере 5. Антитело к ROR2 из вида кроме человека может представлять собой кроличье антитело, обладающее специфичностью в отношении человеческого ROR2. Так, родительское антитело, подлежащее гуманизации, может иметь кроличьи VH- и VL-области, и при этом иметь человеческую Fc-область. Аминокислотную последовательность V-области тяжелой и легкой цепей можно сравнивать с базой данных последовательностей сегментов V и J человеческой зародышевой линии для идентификации человеческих последовательностей тяжелых и легких цепей с самой высокой степенью гомологии для применения в качестве человеческих каркасных участков переменного домена. В одном из вариантов осуществления изобретения последовательности зародышевых линий, применяемые в качестве основы для создания гуманизованных версий последовательностей, обозначают как IGHV3-23*03, IGHJ2, IGKV1-39*01 и IGKJ4. Таким образом, антитело, предлагаемое в изобретении, может иметь CDR-участки из кроличьего антитела, в котором участки VH- и VL-областей вне

CDR-участков являются гуманизированными. Кроме того, константные области тяжелых и легких цепей предпочтительно имеют происхождение из человеческого антитела. Константная область тяжелой цепи или Fc-область антитела, предлагаемого в изобретении, предпочтительно представляет собой

5 человеческую Fc-область из человеческого иммуноглобулина. Она может представлять собой любую человеческую Fc-область, но предпочтительно может представлять собой область человеческого IgG, такого как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения она

10 представляет собой область человеческого IgG1. В одном из вариантов осуществления изобретения константная область легкой цепи может представлять собой область человеческой легкой каппа-цепи. В другом варианте осуществления изобретения она может представлять собой область человеческой легкой лямбда-цепи.

В вариантах осуществления изобретения антитело содержит VH-область, которая имеет последовательность, выбранную из группы, которая содержит:

15

- а. VH-область, представленную в SEQ ID NO: 10 (HC1);
- б. VH-область, представленную в SEQ ID NO: 11 (HC2);
- в. VH-область, представленную в SEQ ID NO: 12 (HC3);
- г. VH-область, представленную в SEQ ID NO: 13 (HC4);
- 20 д. VH-область, представленную в SEQ ID NO: 14 (HC5);
- е. VH-область, представленную в SEQ ID NO: 15 (HC6);
- ж. VH-область, представленную в SEQ ID NO: 16 (HC7) или
- з. VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 90% любой из последовательностей SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

25 Вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VH-область, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

Вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VH-область, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11.

30 Вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VH-область, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12.

Предпочтительным вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VH-область, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

Вариантом осуществления изобретения является антители, содержащее VH-область, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

Вариантом осуществления изобретения является антители, содержащее VH-область, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15.

5 Другим вариантом осуществления изобретения является антители, содержащее VH-область, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16.

10 Другим вариантом осуществления изобретения является антители, содержащее VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 90% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10.

Другим вариантом осуществления изобретения является антители, содержащее VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 90% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11.

15 Другим вариантом осуществления изобретения является антители, содержащее VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 90% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12.

Другим вариантом осуществления изобретения является антители, содержащее VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 90% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13.

20 Другим вариантом осуществления изобретения является антители, содержащее VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 90% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14.

25 Другим вариантом осуществления изобретения является антители, содержащее VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 90% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15.

Другим вариантом осуществления изобретения является антители, содержащее VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 90% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16.

30 Другим вариантом осуществления изобретения является антители, содержащее VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 95% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10.

Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 95% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11.

5 Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 95% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12.

Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 95% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13.

10 Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 95% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14.

Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 95% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15.

15 Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VH-область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 95% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16.

В других вариантах осуществления изобретения антитело содержит VL-область, которая имеет последовательность, выбранную из группы, которая содержит:

- а. VL-область, представленную в SEQ ID NO: 17 (LC1);
- б. VL-область, представленную в SEQ ID NO: 18 (LC2);
- в. VL-область, представленную в SEQ ID NO: 19 (LC3);
- 25 г. VL-область, представленную в SEQ ID NO: 20 (LC4); или
- д. VL- область, последовательность которой идентична по меньшей мере на 90% любой из последовательностей SEQ ID NO: 17, 18, 19 или 20.

Следующим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VL-область, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17.

30 Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VL-область, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VL-область, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19.

5 Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VL-область, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VL-область, последовательность которой идентичная по меньшей мере на 90% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17.

10 Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VL-область, последовательность которой идентичная по меньшей мере на 90% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18.

15 Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VL-область, последовательность которой идентичная по меньшей мере на 90% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19.

Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VL-область, последовательность которой идентичная по меньшей мере на 90% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20.

20 Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VL-область, последовательность которой идентичная по меньшей мере на 95% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17.

Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VL-область, последовательность которой идентичная по меньшей мере на 95% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18.

25 Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VL-область, последовательность которой идентичная по меньшей мере на 95% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19.

30 Другим вариантом осуществления изобретения является антитело, содержащее VL-область, последовательность которой идентичная по меньшей мере на 95% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID

NO: 12, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 17. Такое антитело обозначено как ROR2-A-HC3LC1.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 12, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 18. Такое антитело обозначено как ROR2-A-HC3LC2.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 12, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 19. Такое антитело обозначено как ROR2-A-HC3LC3.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 12, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 20. Такое антитело обозначено как ROR2-A-HC3LC4.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 13, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 17. Такое антитело обозначено как ROR2-A-HC4LC1.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 13, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 18. Такое антитело обозначено как ROR2-A-HC4LC2.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 13, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 19. Такое антитело обозначено как ROR2-A-HC4LC3. Таким образом, предложено гуманизованное антитело, которое обладает аффинностью связывания, очень сходной с аффинностью родительского антитела chIgG1-ROR2-A, и которое является безопасным при применении на людях, поскольку не вызывает иммунный ответ при применении для лечения людей.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID

NO: 15, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 20. Такое антитело обозначено как ROR2-A-HC6LC4.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 16, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 17. Такое антитело обозначено как ROR2-A-HC7LC1.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 16, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 18. Такое антитело обозначено как ROR2-A-HC7LC2.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 16, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 19. Такое антитело обозначено как ROR2-A-HC7LC3.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 16, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 20. Такое антитело обозначено как ROR2-A-HC7LC4.

Антитела, предлагаемые в изобретении, отличаются наличием специфичности или наличием способности связываться с ROR2 человека (*Homo sapiens*). Таким образом, указанный в настоящем описании ROR2 может представлять собой, в частности, человеческий ROR2, такой как зрелый полипептид, имеющий SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления изобретения указанные антитела не связываются с человеческим ROR1.

В следующих вариантах осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, отличаются наличием специфичности или наличием способности связываться с ROR2 обезьян циномогус (*Macaca fascicularis*), например, специфичностью и способностью связываться с ROR2 и человека, и обезьян циномогус. ROR2 обезьян циномогус может представлять собой, в частности, зрелый полипептид, имеющий SEQ ID NO: 39.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, отличаются наличием специфичности или наличием способности связываться с ROR2 как человека (*Homo sapiens*), так и

ROR2 обезьян циномоглус (*Macaca fascicularis*). Таким образом, предложены антитела, которые позволяют проводить доклинические исследования безопасности на релевантных для изучения токсикологии видов (таких как обезьяны циномоглус) с использованием предполагаемого клинического кандидата и избегать необходимости применять суррогатные антитела для доклинических токсикологических исследований.

Как указано выше, VH- и VL-области антител, предлагаемых в изобретении, могут быть гуманизированы, в результате ROR2-связывающие антитела, предлагаемые в изобретении, в некоторых вариантах осуществления изобретения представляют собой гуманизированные антитела и поэтому маловероятно, что они будут вызывать иммунный ответ у людей при применении для их лечения.

Предпочтительно антитела, предлагаемые в изобретении, имеют Fc-область, основой которой является Fc-область человеческого иммуноглобулина типа G. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, имеет Fc-область, основой которой является Fc-область человеческого IgG1. В другом варианте осуществления изобретения константная область тяжелой цепи соответствует области человеческого IgG1. Однако она может содержать аминокислотные замены, описанные ниже. В другом варианте осуществления изобретения константная область тяжелой цепи соответствует области человеческого IgG2 или основана на ней. В другом варианте осуществления изобретения константная область тяжелой цепи соответствует области человеческого IgG3 или основана на ней. В другом варианте осуществления изобретения константная область тяжелой цепи соответствует области человеческого IgG4 или основана на ней. Fc-область может необязательно иметь аминокислотные модификации, предназначенные для изменения эффекторных функций антитела или для других целей, таких как возможность создания биспецифических антител, предлагаемых в изобретении. Такие модификации могут представлять собой замены, дополнительно описанные ниже.

В одном из вариантов осуществления изобретения константная область легкой цепи антитела представляет собой область человеческой легкой цепи. В другом варианте осуществления изобретения константная область

легкой цепи антитела представляет собой область человеческой легкой лямбда-цепи.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело, такое как полноразмерное антитело IgG1-изотипа, такое как антитело IgG1-изотипа, имеющее канонический формат иммуноглобулина, которое имеет два связывающих плеча (Fab-область) и Fc-область, при этом Fc-область может быть инертной, как указано в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело представляет собой одновалентное антитело.

В другом варианте осуществления изобретения антитело представляет собой двухвалентное антитело.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело представляет собой моноспецифическое антитело.

В другом варианте осуществления изобретения антитело представляет собой биспецифическое антитело.

Как указано выше, антитело, предлагаемое в изобретении, обладает способностью связываться с человеческим ROR2. В конкретных вариантах осуществления изобретения указанный человеческий ROR2 представляет собой зрелый белок, имеющий SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления изобретения антитела, представленные в настоящем описании, обладают способностью связываться с Kringle-доменом человеческого ROR2. Kringle-домен состоит из аминокислот 316-394 человеческого ROR2, представленного в SEQ ID NO: 1. Таким образом, предложены антитела, которые связываются в домене ROR2, расположенном вблизи клеточной мембраны.

В настоящем описании предложены также антитела, которые связываются с эпитопом или с областью, с которым/которой связывается антитело, на человеческом ROR2, который/которая включает аминокислотный остаток в положении 322 человеческого ROR2, где нумерация относится к его положению в SEQ ID NO: 1.

В варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, связывается с внеклеточным доменом человеческого ROR2 с

аффинностью связывания, которая соответствует величине KD , составляющей 100нМ или менее, такой как 50нМ или менее, 10нМ или менее, 6нМ или менее, или такой как 3нМ или менее, такой как 1,5нМ или менее. В другом варианте осуществления изобретения связывание антитела характеризуется аффинностью связывания, которая соответствует величине KD , находящейся в диапазоне от 100нМ до 0,1нМ. В другом варианте осуществления изобретения связывание антитела характеризуется аффинностью связывания, которая соответствует величине KD , находящейся в диапазоне от 100нМ до 1нМ. В другом варианте осуществления изобретения связывание антитела характеризуется аффинностью связывания, которая соответствует величине KD , составляющей менее чем примерно 2,5нМ или менее чем примерно 2,0нМ. В предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, обладает аффинностью связывания с внеклеточным доменом человеческого ROR2, составляющей менее чем примерно 1,5нМ, такой как примерно 1,1нМ.

Хотя специалисту в данной области должно быть очевидно, как определять аффинность связывания антитела с его мишенью, аффинность связывания антител, предлагаемых в изобретении, в отношении ROR2, можно определять, в частности с помощью биослойной интерферометрии, необязательно согласно методу, изложенному в настоящем описании в примере 2 или 6.

Так, аффинность связывания можно определять с использованием биослойной интерферометрии, которая включает следующие стадии:

- а. иммобилизация антитела в количестве 1 мкг/мл в течение 600 с на биосенсоре для захвата содержащих Fc-область античеловеческих IgG;
- б. определение ассоциации в течение периода времени, составляющего 1500 с, и диссоциации в течение периода времени, составляющего 1500 с, меченного с помощью his-метки внеклеточного домена ROR2 (ROR2-ECD, фирма G&P Biosciences, каталожный № FCL0192), используя 2-кратные серийные разведения в диапазоне от 100нМ до 1,56нМ;
- в. сравнение с данными для содержащего только буфер контроля (0нМ).

Биспецифические антитела

Примеры молекул биспецифических антител, которые можно применять в настоящем изобретении, включают (но не ограничиваясь только ими) (I) индивидуальное антитело, которое содержит два плеча, которые содержат различные антигенсвязывающие области, (II) одноцепочечное антитело, которое содержит специфичности, которые связываются с двумя различными эпитопами, например, посредством двух scFv, сцепленных в виде тандема с помощью дополнительного пептидного линкера; (III) антитело с двумя переменными доменами (DVD-IgTM), в котором каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два переменных домена в виде тандема, образованного с помощью короткой пептидной связи (Wu и др., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule, в: Antibody Engineering, изд-во Springer Berlin Heidelberg, 2010); (IV) химически связанный биспецифический (Fab')₂-фрагмент; (V) Tandab®, представляющее собой слияние двух одноцепочечных димерных антител, в результате чего образуется четырехвалентное биспецифическое антитело, имеющее два связывающих центра для каждого из антигенов-мишеней; (VI) флексибоди (flexibody), которое содержит комбинацию scFv с димерным антителом, в результате чего образуется многовалентная молекула; (VII) так называемую молекулу, созданную с использованием подхода «стыковка и блокировка» (Dock-and-Lock®), основанную на «домене димеризации и стыковки» в протеинкиназе A, который при применении к Fab может приводить к образованию трехвалентного биспецифического связывающего белка, состоящего из двух идентичных Fab-фрагментов, сцепленных с другим Fab-фрагментом; (VIII) так называемая молекула Scorpion, содержащая, например, два scFv, присоединенных к обоим концам плеча человеческого Fab; и (IX) димерное антитело (диабоди).

В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифическое антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, представляет собой димерное антитело или кроссбоди, такое как CrossMab. В предпочтительном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело получают посредством контролируемого обмена Fab-плечей (например, описанного в WO 2011/131746), что известно также как технология DuoBody®.

Примеры различных классов биспецифических антител включают (но не ограничиваясь только ими) (I) IgG-подобные молекулы с комплементарными СНЗ-доменами для усиления гетеродимеризации; (II) рекомбинантные IgG-подобные молекулы двойного нацеливания, в которых каждое из двух плечей молекулы содержит Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента по меньшей мере двух различных антител; (III) слитые молекулы IgG, в которых полноразмерные антитела IgG-типа слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; (IV) слитые молекулы Fc, в которых одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные димерные антитела слиты с константными доменами тяжелых цепей, Fc-областями или их частями; (V) слитые молекулы Fab, в которых различные Fab-фрагменты, слитые друг с другом, слиты с константными доменами тяжелых цепей, Fc-областями или их частями; и (VI) антитела на основе scFv и димерных антител и тяжелых цепей (например, доменные антитела Nanobodies®), в которых различные молекулы одноцепочечных Fv или различные димерные антитела, или различные тяжелые цепи антител (например, доменных антител Nanobodies®) слиты друг с другом или с другим белком или молекулой-носителем, которые слиты с константными доменами тяжелых цепей, Fc-областями или их частями.

Примеры IgG-подобных молекул с комплементарными СНЗ-доменами включают (но не ограничиваясь только ими) Triomab® (фирма Trion Pharma/Fresenius Biotech, WO 2002/020039), антитела формата «Knobs-into-holes» (фирма Genentech, WO 98/50431), CrossMAbs (фирма Roche, WO 2011-117329) и регулируемые электростатическими силами форматы антител (фирма Amgen, EP 1870459 и WO 2009/089004; фирма Chugai, US 201000155133; фирма Oncomed, WO 2010/129304), LUZ-Y (фирма Genentech), DIG-боди и PIG-боди (фирма Pharmabsine), созданные с помощью обмена цепей доменные антитела (SEED-боди) (фирма EMD Serono, WO 2007/110205), Biclomics (фирма Merus), FcΔAdp (фирма Regeneron, WO 2010/015792), биспецифические IgG1 и IgG2 (фирма Pfizer/Rinat, WO 11/143545), ассиметричный каркас (фирма Zymeworks/Merck, WO 2012/058768), mAb-Fv (фирма Xencor, WO 2011/028952), двухвалентные биспецифические антитела (фирма Roche, WO 2009/080254) и молекулы DuoBody® (фирма Genmab A/S, WO 2011/131746). В

предпочтительном варианте осуществления изобретения биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, представляют собой молекулы DuoBody.

Примеры рекомбинантных IgG-подобных молекул двойного нацеливания включают (но не ограничиваясь только ими) Ig двойного нацеливания ((DT)-Ig) (фирма GSK/Domantis), антитело «два в одном» (фирма Genentech), перекрестно сшитые МАт (фирма Karmanos Cancer Center), mAb2 (фирма F-Star, WO 2008/003116), ZybodiesTM (фирма Zyngenia), антитела, созданные на основе подходов с общей легкой цепью (фирма Crucell/Merus, US 7262028), κλ-боди (фирма NovImmune) и CovX-боди (фирма CovX/Pfizer).

Примеры слитых молекул IgG включают (но не ограничиваясь только ими) Dual Variable Domain (DVD)-IgTM (фирма Abbott, US 7612181), антитела с двумя доменами и двойной «головкой» (фирмы Unilever; Sanofi Aventis, WO 2010/0226923), IgG-подобные биспецифические антитела (фирма ImClone/Eli Lilly), Ts2Ab (фирма MedImmune/AZ) и BsAb (фирма Zymogenetics), HERCULES (фирма Biogen Idec, US 007951918), scFv-слияние (фирма Novartis), scFv-слияние (фирма Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246) и TvAb (фирма Roche, WO 2012/025525, WO 2012/025530).

Примеры слитых молекул Fc включают (но не ограничиваясь только ими) ScFv/Fc-слияния (фирма Academic Institution), SCORPION (фирма Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), антитела, созданные с помощью технологии перенацеливания двойного сродства (Fc- DARTTM), фирма MacroGenics, WO 2008/157379, WO 2010/080538) и Dual(ScFv)2-Fab (фирма National Research Center for Antibody Medicine – Китай).

Примеры биспецифических антител, содержащих слияние Fab, включают (но не ограничиваясь только ими) F(ab)2 (фирма Medarex/AMGEN), антитела двойного действия или бис-Fab (фирма Genentech), Dock-and-Lock® (DNL) (фирма ImmunoMedics), двухвалентные биспецифические антитела (фирма Biotecnol) и Fab-Fv (фирма UCB-Celltech).

Примеры антител на основе scFv, димерных антител и доменных антител включают (но не ограничиваясь только ими) биспецифический активатор (проводник) Т-клеток (BiTE®) (фирма Micromet), тандемное димерное антитело (TandabTM) (фирма Affimed), антитела, созданные с помощью технологии перенацеливания двойного сродства (DART) (фирма MacroGenics),

одноцепочечное димерное антитело (фирма Academic), TCR-подобные антитела (AIT, фирма ReceptorLogics), слияние ScFv с человеческим сывороточным альбумином (фирма Merrimack) и COMBODY (фирма Epigen Biotech), антитела двойного нацеливания Nanobodies® (фирма Ablynx), антитела двойного нацеливания, содержащие только домен тяжелой цепи.

В следующем варианте осуществления изобретения предложено антитело, которое содержит указанную выше в настоящем описании первую антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться к человеческим ROR2, и которая содержит CDR1, CDR2 и CDR3 VH-области, имеющие SEQ ID NO: 3, 4 и 5 соответственно и CDR1, CDR2 и CDR3 VL-области, имеющие SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно, и которое содержит вторую антиген связывающую область, обладающую способностью связываться с другой мишенью. В конкретном варианте осуществления изобретения вторая антигенсвязывающая область обладает способностью связываться с человеческим CD3, таким как человеческий CD3ε (эпсилон), таким как человеческий CD3ε (эпсилон), представленный в SEQ ID NO: 21. В предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, представляет собой биспецифическое антитело. В другом варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, представляет собой мультиспецифическое антитело.

В следующем варианте осуществления изобретения вторая антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит VH-область, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно, и VL-область, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 27, GTN и 28 соответственно.

В другом варианте осуществления изобретения CD3-связывающая область, предлагаемая в изобретении, содержит VH- и VL-область, которые представляют собой гуманизированные VH- и VL-области и которые получали с помощью гуманизации из мышинового антитела к человеческому CD3 SP34, которое имеет VH- и VL-области, представленные в SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 26 соответственно. Как упоминалось выше, специалисту в данной области должен быть очевиден метод гуманизации антитела. Ниже представлены некоторые

предпочтительные варианты указанных гуманизированных версий VH- и VL-областей мышиного SP34.

Так, в одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит VH-область, аминокислотная последовательность которой идентична по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 29. В другом варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит VH-область, аминокислотная последовательность которой идентична по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 29. В другом варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит VH-область, аминокислотная последовательность которой идентична по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 29. В другом варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит VH-область, аминокислотная последовательность которой идентична по меньшей мере на 97% последовательности SEQ ID NO: 29. В другом варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит VH-область, аминокислотная последовательность которой идентична по меньшей мере на 99% последовательности SEQ ID NO: 29. В другом варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит VH-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

В следующем варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит VL-область, аминокислотная последовательность которой идентична по меньшей мере на 80% последовательности SEQ ID NO: 30. В следующем варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит VL-область, аминокислотная последовательность которой идентична по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 30. В следующем варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит VL-область, аминокислотная последовательность которой идентична по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 30. В следующем варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая

область, которая связывается с CD3, содержит VL-область, аминокислотная последовательность которой идентична по меньшей мере на 97% последовательности SEQ ID NO: 30. В следующем варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит VL-область, аминокислотная последовательность которой идентична по меньшей мере на 99% последовательности SEQ ID NO: 30. В другом варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит VL-область, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

10 В предпочтительном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 29, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность SEQ ID NO: 30.

15 В другом варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит вторую антигенсвязывающую область, которая обладает более низкой аффинностью связывания с человеческим CD3ε, чем антитело, которое имеет антигенсвязывающую область, содержащую последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 29, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 30. В одном из вариантов осуществления изобретения более низкая аффинность представляет собой аффинность, сниженную по меньшей мере в 5 раз. В другом варианте осуществления изобретения более низкая аффинность представляет собой аффинность, сниженную по меньшей мере в 10 раз. В другом варианте осуществления изобретения более низкая аффинность представляет собой аффинность, сниженную по меньшей мере в 20 раз. В одном из вариантов осуществления изобретения более низкая аффинность представляет собой аффинность, сниженную по меньшей мере в 30 раз. В следующем варианте осуществления изобретения более низкая аффинность представляет собой аффинность, сниженную по меньшей мере в 40 раз. В одном из вариантов осуществления изобретения более низкая аффинность представляет собой аффинность, сниженную по меньшей мере в 45 раз. В одном из вариантов осуществления изобретения более низкая аффинность представляет собой аффинность,

сниженную по меньшей мере в 50 раз. В одном из вариантов осуществления изобретения более низкая аффинность представляет собой аффинность, сниженную по меньшей мере в 54 раза. Таким образом, предложены CD3-связывающие области, которые обладают более низкой аффинностью в отношении человеческого CD3 по сравнению с антигенсвязывающей областью, которая содержит последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 29, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 30. Когда указанная CD3-связывающая область является частью биспецифического антитела CD3xROR2, то биспецифическое антитело должно обладать более низкой аффинностью в отношении CD3. Это позволяет получать биспецифические антитела, которые имеют меньше побочных действий и являются более безопасными при применении, сохраняя при этом эффективность при лечении заболевания, такого как рак.

Другим объектом изобретения является антитело, в котором связывание указанной антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3, характеризуется константой равновесия диссоциации KD, находящейся в диапазоне 200 – 1000нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 300 – 1000нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 400 – 1000нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 500 – 1000нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 300 – 900нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 400 – 900нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 400 – 700нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 500 – 900нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 500 – 800нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 500 – 700нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 600 – 1000нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 600 – 900нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 600 – 800нМ. В другом варианте осуществления изобретения ее

связывание находится в диапазоне 600 – 700нМ. Указанные аффинности связывания с CD3 рассматриваются в настоящем описании как более низкие аффинности связывания.

Другим объектом изобретения является антитело, в котором связывание 5
указанной антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3,
характеризуется константой равновесия диссоциации KD, находящейся в
диапазоне 1 – 100нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее
связывание находится в диапазоне 5 – 100нМ. В одном из вариантов
10 осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 10 – 100нМ. В
одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в
диапазоне 1 – 80нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее
связывание находится в диапазоне 1 – 60нМ или 1 – 40нМ. В одном из вариантов
15 осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 1 – 20нМ. В
одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в
диапазоне 5 – 80нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее
связывание находится в диапазоне 5 – 60нМ. В одном из вариантов
20 осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 5 – 40нМ. В
одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в
диапазоне 5 – 20нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее
связывание находится в диапазоне 10 – 80нМ. В одном из вариантов
25 осуществления изобретения ее связывание находится в диапазоне 10 – 60нМ. В
одном из вариантов осуществления изобретения ее связывание находится в
диапазоне 10 – 40нМ. В одном из вариантов осуществления изобретения ее
связывание находится в диапазоне 10 – 20нМ. Указанные аффинности
связывания с CD3 рассматриваются в настоящем описании как более высокие
30 аффинности связывания. Когда указанная CD3-связывающая область является
частью биспецифического антитела CD3xROR2, то биспецифическое антитело
должно обладать более высокой аффинностью в отношении CD3 по сравнению с
обладающими более низкой аффинностью антителами, указанными в настоящем
описании. Это позволяет получать биспецифические антитела, которые
обладают более высокой цитотоксичностью в отношении экспрессирующих
ROR2 клеток, и которые в результате обладают повышенной эффективностью
при лечении заболевания, такого как экспрессирующий ROR2 рак.

Аффинность, с которой антитело, предлагаемое в изобретении, связывается с CD3, можно определять с помощью биослойной интерферометрии, при осуществлении которой антитело иммобилизуют на биосенсоре для захвата содержащего Fc-область IgG человека и определяют ассоциацию и диссоциацию CD3E27-GSKa (SEQ ID NO: 51) с иммобилизованным антителом. Кроме того, аффинность, с которой антитело, предлагаемое в изобретении, связывается с CD3, можно определять с помощью биослойной интерферометрии, описанной в примере 9.

Антитела, связывающиеся с CD3, в частности, человеческим CD3, с пониженной аффинностью, представлены в WO 2017/009442, и, как должно быть очевидно, любое из этих антител может служить в качестве основы для создания антител, предлагаемых в настоящем изобретении, которые в дополнение к способности связываться с ROR2, обладают также способностью связываться с CD3 с пониженной аффинностью.

В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область антитела, которая связывается с CD3, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит последовательность CDR1, последовательность CDR2 и последовательность CDR3 переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 29, но содержит аминокислотную замену в одной из последовательностей CDR, где замена находится в положении, выбранном из группы, которая состоит из: T31, N57, H101, G105, S110 и Y114, где нумерация положений соответствует последовательности SEQ ID NO: 29; и содержит переменную область легкой цепи (VL), которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 27, GTN и SEQ ID NO: 28 соответственно. Последовательности CDR в настоящем описании идентифицируют в соответствии с правилами IMGT.

В одном из вариантов осуществления изобретения замена в CD3-связывающей области антитела находится в положении T31. В другом варианте осуществления изобретения замена находится в положении N57. В другом варианте осуществления изобретения замена находится в положении H101. В другом варианте осуществления изобретения замена находится в положении G105. В другом варианте осуществления изобретения замена находится в

положении S110. В другом варианте осуществления изобретения замена находится в положении Y114.

В другом варианте антитела CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3, содержат в целом максимум 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен по сравнению с CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29. В одном из вариантов осуществления изобретения только одна замена присутствует в одном из CDR-участков. В другом варианте осуществления изобретения присутствуют в целом две замены в одном из CDR-участков или в двух различных участках. В другом варианте осуществления изобретения присутствуют в целом три замены в одном или нескольких CDR-участках. В другом варианте осуществления изобретения присутствуют в целом четыре замены в одном или нескольких CDR-участках. В другом варианте осуществления изобретения присутствуют в целом три замены в одном или нескольких CDR-участках. В другом варианте осуществления изобретения присутствуют в целом пять замен в одном или нескольких CDR-участках.

В следующем варианте осуществления изобретения антигенсвязывающая область антитела, которая связывается с CD3, содержит аминокислотную замену в VH-области, имеющей SEQ ID NO: 29, выбранную из группы, которая состоит из: T31M, T31P, N57E, H101G, H101N, G105P, S110A, S110G, Y114M, Y114R, Y114V, где нумерация положений соответствует последовательности SEQ ID NO: 29. В одном из вариантов осуществления изобретения замена представляет собой T31P. В другом варианте осуществления изобретения замена представляет собой N57E. В другом варианте осуществления изобретения замена представляет собой H101G. В другом варианте осуществления изобретения замена представляет собой H101N. В другом варианте осуществления изобретения замена представляет собой G105P. В другом варианте осуществления изобретения замена представляет собой S110A. В другом варианте осуществления изобретения замена представляет собой S110G. В другом варианте осуществления изобретения замена представляет собой Y114M. В другом варианте осуществления изобретения замена представляет собой Y114M. В другом варианте осуществления изобретения замена представляет собой Y114M. В другом варианте осуществления изобретения замена представляет собой

Y114R. В другом варианте осуществления изобретения замена представляет собой Y114V.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложено антитело, в котором антигенсвязывающая область, обладающая способностью связываться с CD3, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 31 соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 27, последовательности GTN и последовательности SEQ ID NO: 28 соответственно. Указанное биспецифическое антитело обладает более низкой аффинностью к CD3, что описано выше, по сравнению с идентичным антителом, которое отличается только тем, что в нем VH-CDR3-участок имеет SEQ ID NO: 25. Таким образом, предложено биспецифическое антитело CD3xROR2, обладающее пониженной аффинностью к CD3. Указанное антитело является ценным для лечения заболеваний, таких как экспрессирующие ROR2 опухоли, и может иметь меньше побочных эффектов, таких, например, как более мягкий синдром высвобождения цитокинов, по сравнению с версией биспецифического антитела с более высокой аффинностью к CD3. Это в некоторых ситуациях может иметь преимущество, поскольку позволяет применять биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении, в более высоких концентрациях.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложено антитело, в котором антигенсвязывающая область, обладающая способностью связываться с CD3, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30. Таким образом, для предлагаемого в изобретении биспецифического антитела предложено связывающее плечо с более низкой аффинностью к CD3.

В основном варианте осуществления изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее первую антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с человеческим ROR2, и вторую связывающую область, которая обладает способностью связываться с

человеческим CD3, в котором указанная первая антигенсвязывающая область содержит:

CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), которые содержат последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5

5 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL), которые содержат последовательности, представленные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;

и указанная вторая антигенсвязывающая область содержит:

10 CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), которые содержат последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL), которые содержат последовательности SEQ ID NO: 27, GTN и 28 соответственно.

15 Таким образом, предложено биспецифическое антитело CD3xROR2, которое обладает более высокой аффинностью к CD3. Указанное антитело является ценным для лечения заболеваний, таких как экспрессирующие ROR2 опухоли. Версия биспецифического антитела с более высокой аффинностью может иметь преимущество, поскольку позволяет применять его в более низких концентрациях и/или реже. Оно может также обладать более высокой
20 эффективностью и поэтому более высокой цитотоксичностью по сравнению с обладающим меньшей аффинностью биспецифическим антителом CD3xROR2.

В другом варианте осуществления изобретения предложено биспецифическое антитело, содержащее первую антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с человеческим ROR2, и вторую
25 связывающую область, которая обладает способностью связываться с человеческим CD3, в котором указанная первая антигенсвязывающая область содержит:

CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), которые содержат последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5

30 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL), которые содержат последовательности, представленные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;

и указанная вторая антигенсвязывающая область содержит:

CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), которые содержат последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 31 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL), которые содержат последовательности SEQ ID NO: 27, GTN и 28

5 соответственно.

Таким образом, предложено биспецифическое антитело CD3xROR2, имеющее меньшую аффинность к CD3 по сравнению с вариантом, содержащим VH-CDR3-участок, имеющий SEQ ID NO: 25. Указанное антитело, также является ценным при лечении заболеваний, таких как экспрессирующие ROR2
10 опухоли, указанные выше. В некоторых ситуациях указанное биспецифическое антитело может лучше переноситься и быть более безопасным при применении на людях.

В изобретении предложено также биспецифическое антитело, где указанное антитело содержит первую антигенсвязывающую область, которая обладает
15 способностью связываться с человеческим ROR2, и вторую связывающую область, которая обладает способностью связываться с человеческим CD3, в котором указанная первая антигенсвязывающая область содержит VH-область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и VL область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и
20 указанная вторая антигенсвязывающая область содержит VH-область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, и VL область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

В изобретении предложено также биспецифическое антитело, где указанное антитело содержит первую антигенсвязывающую область, которая обладает
25 способностью связываться с человеческим ROR2, и вторую связывающую область, которая обладает способностью связываться с человеческим CD3, в котором указанная первая антигенсвязывающая область содержит VH-область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и VL область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и
30 указанная вторая антигенсвязывающая область содержит VH-область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и VL область, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающая(ие) область(и), обладающая(ие) способностью связываться с ROR2, является(ются) гуманизированной(ыми). В одном из вариантов осуществления изобретения вторая антигенсвязывающая область, обладающая способностью связываться с CD3, если она присутствует, является гуманизированной.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, содержит помимо антигенсвязывающих областей Fc-область, состоящую из последовательностей Fc двух тяжелых цепей. Первая и вторая последовательность Fc каждая может относиться к любому изотипу, включая любой человеческий изотип, такой как изотип IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgD, IgM или IgA или смешанный изотип. Предпочтительно Fc-область относится к человеческому изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанному изотипу, например, человеческому изотипу IgG1.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит первую и вторую тяжелые цепи, например, первую и вторую тяжелые цепи, каждая из которых содержит по меньшей мере шарнирную область, СН2- и СН3-участки. Стабильные гетеродимерные антитела можно получать с высокой производительностью, например, с помощью так называемой технологии обмена Fab-плечей, описанной в WO 2011/131746, на основе двух гомодимерных исходных белков, содержащих лишь несколько асимметричных мутаций в СН3-участках. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит константные области первой и второй тяжелых цепей, каждая из указанных константных областей первой и второй тяжелых цепей содержит по меньшей мере шарнирную область, СН2- и СН3-участки, в котором в указанной константной области первой тяжелой цепи по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, которая состоит из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409, в тяжелой цепи человеческого IgG1, заменена, и в указанной константной области второй тяжелой цепи по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным их группы, которая состоит из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409, в тяжелой цепи человеческого IgG1, заменена, в котором указанные замены в указанных первой и второй тяжелых

цепях не находятся в одинаковых положениях и в котором аминокислотные положения в константных областях пронумерованы согласно Eu-нумерации.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения константная область тяжелых цепей связывающегося с ROR2 антитела, предлагаемого в изобретении, содержит аминокислоту R в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1. Предпочтительно константные области тяжелых цепей представляют собой константные области IgG1, но они могут относиться также к другим изотипам, таким, например, как IgG4. Таким образом, антитело к ROR2 предпочтительно имеет аргинин в положении 409 его тяжелых цепей. В предпочтительном варианте осуществления изобретения CD3-связывающее плечо имеет лейцин в положении 405 его тяжелых цепей при использовании системы нумерации Eu.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения предложено биспецифическое антитело, в котором в константной области первой тяжелой цепи присутствует аминокислота аргинин (R) в положении 409, а в константной области второй тяжелой цепи присутствует аминокислота лейцин (L) в положении 405, где нумерация соответствует системе нумерации Eu.

В другом варианте осуществления изобретения предложено биспецифическое антитело, в котором в константной области первой тяжелой цепи присутствует аминокислота аргинин (R) в положении 409 и аминокислота фенилаланин (F) в положении 405, а в константной области второй тяжелой цепи присутствует аминокислота лизин (K) в положении 409 и аминокислота лейцин (L) в положении 405.

Кроме того, антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно представляет собой антитело, которое по данным, полученным с помощью проточной цитометрии или ELISA, не связывается с FcγR-рецепторами и в результате не индуцирует опосредуемые FcγR эффекторные функции, включая зависимое от антитела к CD3 опосредуемое FcγR CD3-перекрестное сшивание в отсутствии специфических для мишени (ROR2) опухолевых клеток. Кроме того, антитело, предлагаемое в изобретении, предпочтительно представляет собой антитело, которое по данным, полученным с помощью проточной цитометрии или ELISA, не связывается с C1q и в результате не обладает способностью

индуцировать комплементзависимые эффекторные функции. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, не связывается с FcγR и не связывается с C1q.

В другом варианте осуществления изобретения предложено антитело, которое содержит первую и вторую тяжелые цепи и в котором первая и вторая тяжелые цепи модифицированы таким образом, что антитело индуцирует Fc-опосредуемую эффекторную функцию в меньшей степени, чем идентичное немодифицированное антитело.

Антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, могут содержать модификации в Fc-области для придания антителу инертности или отсутствия активирующего действия. Таким образом, в антителах, указанных в настоящем описании, одна или обе тяжелые цепи могут быть модифицированы таким образом, чтобы антитело индуцировало опосредуемую Fc эффекторную функцию в меньшей степени, чем антитело, которое является идентичным за исключением того, что оно содержит немодифицированную первую и вторую тяжелые цепи. Fc-опосредуемую эффекторную функцию можно оценивать количественно, определяя опосредуемую Fc экспрессию CD69 на Т-клетках (т.е. экспрессию CD69, являющуюся результатом опосредуемого антителом к CD3, зависимо от Fcγ-рецептора перекрестного сшивания CD3), определяя связывание с Fcγ-рецепторами, связывание с C1q или индукцию опосредуемого Fc перекрестного сшивания FcγR. В частности, последовательность константной области тяжелой цепи можно модифицировать так, чтобы уровень опосредуемой Fc экспрессии CD69 снижался по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 99% или 100% по сравнению с антителом дикого типа (немодифицированным антителом), при определении указанной опосредуемой Fc экспрессии CD69 с помощью функционального анализа на основе РВМС, например, описанного в примере 3 в WO 2015/001085. Модификации в последовательностях константных областей тяжелых и легких цепей могут приводить также к уменьшению связывания C1q с указанным антителом. По сравнению с немодифицированным антителом снижение может составлять по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100%, и C1q-связывание можно

определять, например, с помощью ELISA. Кроме того, Fc-область можно модифицировать так, чтобы антитело опосредовало сниженную опосредуемую Fc пролиферацию Т-клеток по сравнению с немодифицированным антителом по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по 5 меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 99% или 100%, при количественной оценке пролиферации Т-клеток с помощью функционального анализа на основе РВМС.

Примеры аминокислотных положений, которые можно модифицировать, например, в антителе изотипа IgG1, включают положения L234 и L235. Так, в 10 одном из вариантов осуществления изобретения предложено антитело, которое содержит первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, и в нем в константной области как первой тяжелой цепи, так и второй тяжелой цепи аминокислотные остатки в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно Eu-нумерации, представляют собой F и E 15 соответственно.

Кроме того, аминокислотная замена D265A может снижать связывание со всеми Fcγ-рецепторами и предупреждать ADCC (Shields и др., JBC 276, 2001, сс. 6591-604). Таким образом, в другом варианте осуществления изобретения антитело содержит первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, в котором в 20 константной области и первой, и второй тяжелой цепи аминокислотный остаток в положении, соответствующем положению D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно Eu-нумерации, представляет собой A.

В другом варианте осуществления изобретения антитело содержит первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, и в нем в константных областях и первой, 25 и второй тяжелой цепи аминокислотные остатки в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно Eu-нумерации, представляют собой F, E и A соответственно. Таким образом, предложено антитело, которое имеет инертную Fc-область.

В другом варианте осуществления изобретения предложено антитело, 30 которое содержит первую тяжелую цепь и вторую тяжелую цепь, и в котором в константных областях и первой, и второй тяжелой цепи аминокислотные остатки в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно Eu-нумерации, представляют собой F, E и A

соответственно, и в котором константная область первой тяжелой цепи дополнительно содержит R в положении 409, и константная область второй тяжелой цепи дополнительно содержит L в положении 405. Таким образом, предложено антитело, где антитело индуцирует опосредуемую Fc эффекторную функцию в меньшей степени, чем идентичное немодифицированное антитело. Аминокислоты в положениях 409 и 405 являются ценными для осуществления процесса получения биспецифического антитела с использованием метода DuoBody®, известного также как метод контролируемого обмена Fab-плечей (см. пример 10). В настоящей заявке антитела, которые имеют комбинацию трех аминокислотных замен L234F, L235E и D265A в дополнение к мутации K409R или F405L, указанной выше в настоящем описании, обозначают с помощью индекса «FEAR» или «FEAL» соответственно.

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1 дикого типа представлена в настоящем описании в виде SEQ ID NO: 33. В соответствии с указанными выше вариантами осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, может содержать константную область тяжелой цепи IgG1 с заменой F405L и иметь аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, и/или константную область тяжелой цепи IgG1 с заменой K409R и иметь аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49.

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1, несущая замены L234F, L235E и D265A, представлена в настоящем описании в виде SEQ ID NO: 50. Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1, несущая замены L234F, L235E, D265A и F405L, представлена в настоящем описании в виде SEQ ID NO: 35. Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1, несущая замены L234F, L235E, D265A и K409R, представлена в настоящем описании в виде SEQ ID NO: 34.

Таким образом, в изобретении предложено антитело, которое содержит константные области первой и второй тяжелых цепей, которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 34 и 35 соответственно, или константные области первой и второй тяжелых цепей, которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 35 и 34 соответственно.

В другом варианте осуществления изобретения антитело представляет собой биспецифическое антитело, обладающее способностью связываться с человеческим ROR2 и человеческим CD3-эпсилон, в котором

а. первое связывающееся плечо, которое связывается с ROR2, содержит:

5 I. VH-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13,

II. VL-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19,

10 III. константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 (FEAR), и

IV. константную область человеческой легкой каппа-цепи; и

б. второе связывающееся плечо, которое связывается с CD3-эпсилон, содержит:

15 I. VH-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29,

II. VL-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30,

III. константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 (FEAL), и

20 IV. константную область человеческой легкой лямбда-цепи.

В другом варианте осуществления изобретения антитело представляет собой биспецифическое антитело, обладающее способностью связываться с человеческим ROR2 и человеческим CD3-эпсилон, в котором

а. первое связывающееся плечо, которое связывается с ROR2, содержит:

25 I. VH-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13,

II. VL-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19,

30 III. константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 (FEAR), и

IV. константную область человеческой легкой каппа-цепи; и

б. второе связывающееся плечо, которое связывается с CD3-эпсилон, содержит:

I. VH-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32,

5 II. VL-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30,

III. константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 (FEAL), и

IV. константную область человеческой легкой лямбда-цепи.

10 В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит легкую лямбда (λ)-цепь. В другом варианте осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, содержит легкую каппа-цепь. Человеческая легкая каппа-цепь предпочтительно имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36. Человеческая легкая лямбда-цепь предпочтительно имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело содержит легкую лямбда (λ)-цепь и легкую каппа (κ)-цепь; например, антитело с тяжелой цепью и легкой лямбда-цепью содержит связывающую область, обладающую 20 способностью связываться с CD3, и с тяжелой цепью и легкой каппа-цепью содержит связывающую область, обладающую способностью связываться с ROR2.

Способность биспецифических антител CD3xROR2 индуцировать активацию Т-клеток *in vitro* в присутствии экспрессирующих ROR2 опухолевых 25 клеток, таких как клетки HeLa, можно определять с помощью процедуры, включающей следующие стадии:

I) получение Т-клеток, выделенных из лейкоцитарных пленок здорового донора,

30 II) получение набора образцов, в которых каждый образец содержит указанные Т-клетки и экспрессирующие ROR2 опухолевые клетки и в которых соотношение Т-клетки : опухолевые клетки в указанных образцах составляет 8:1,

III) добавление антитела к набору образцов в концентрациях, находящихся в диапазоне от 0,0005 нг/мл до 10000 нг/мл (полученных путем 5-кратных разведений) и инкубация образцов в течение 72 ч при 37°C,

5 IV) сбор из каждого образца 150 мкл супернатанта, содержащего Т-клетки, и окрашивание Т-клеток с помощью флуоресцентно меченных антител против Т-клеточных маркеров, таких как CD3, CD4, CD8, и с помощью флуоресцентно меченных антител против маркеров активации Т-клеток, таких как CD69, CD25 и CD279/PD1-B, путем инкубации с указанными антителами в течение 30 мин при 4°C; и

10 V) анализ образцов с помощью проточной цитометрии.

Способность биспецифических антител CD3xROR2 индуцировать цитотоксичность в отношении экспрессирующих ROR2 опухолевых клеток, можно определять с помощью процедуры, включающей следующие стадии:

15 I) получение Т-клеток, выделенных из лейкоцитарных пленок здорового донора,

II) получение набора тестируемых образцов и контрольных образцов, при этом, каждый образец содержит указанные Т-клетки и опухолевые ROR2-клетки, которым дали прикрепиться к дну 96-луночного планшета для культуры ткани, и соотношение Т-клетки : опухолевые клетки в указанных образцах составляет 8:1,

20 III) добавление антитела к набору тестируемых образцов в концентрациях, находящихся в диапазоне от 0,0005 нг/мл до 10000 нг/мл (полученных путем 5-кратных разведений), в то время как контрольные образцы остаются без обработки или их инкубируют с 16 мкг/мл фениларзиноксида (РАО), и инкубация всех образцов в течение 72 ч при 37°C,

25 IV) инкубация прикрепленных клеток в 10 мас.% раствора alamarBlue в среде RPMI-1640, дополненной 10 мас.% донорской бычьей сыворотки с железом и пенициллином/стрептомицином, при 37°C в течение 4 ч,

30 V) измерение абсорбции клеток; принятие абсорбции клеток, инкубированных с РАО, за 0% жизнеспособности, а необработанных клеток за 100%-ную жизнеспособность и расчет процента жизнеспособных клеток, как

$$\text{жизнеспособных} \times 100 \% \text{ клеток} = \left(\frac{\text{[абсорбция в образце} - \text{абсорбция в обработанных РАО клетках]}}{\text{[абсорбция в необработанных клетках} - \text{абсорбция в обработанных РАО клетках]}} \right)$$

В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении:

а. обладает способностью связываться с экспрессирующими ROR2
5 человеческими опухолевыми клетками, такими как клетки HeLa, LCLC103-H, NCI-H1650, 786-O, NCI-H23 или ZR-75-1, что указано в примерах 3, 7 и 12 в настоящем описании,

б. обладает способностью опосредовать в зависимости от концентрации
10 цитотоксичность в отношении клеток HeLa при использовании очищенных РВМС или Т-клеток в качестве эффекторных клеток, например, при использовании анализов, указанных в примере 13 или 14 в настоящем описании,

в. обладает способностью опосредовать в зависимости от концентрации
15 цитотоксичность в отношении клеток 786-O, LCLC-103H, NCI-H23, NCH-H1650 или ZR-75-1 при использовании очищенных РВМС или Т-клеток в качестве эффекторных клеток, при использовании анализов, указанных в примере 14 в настоящем описании,

г. обладает способностью активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии
опухолевых клеток HeLa; например, при использовании анализов, указанных в
примере 16 в настоящем описании, и/или

д. обладает способностью индуцировать производство Т-клеточных
20 цитокинов при использовании опухолевых клеток, таких как клетки HeLa и 786-O, в качестве клеток-мишеней, например, при использовании анализов, указанных в примере 15 в настоящем описании.

Конструкции нуклеиновых кислот

25 В следующем объекте настоящего изобретения предложена конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая

а. нуклеотидную последовательность, которая кодирует
последовательность тяжелой цепи антитела, содержащую антигенсвязывающую
область, которая обладает способностью связываться с ROR2, указанную выше в
30 настоящем описании, и/или

б. нуклеотидную последовательность, которая кодирует
последовательность легкой цепи антитела, содержащую антигенсвязывающую

область, которая обладает способностью связываться с ROR2, указанную выше в настоящем описании.

Конструкция нуклеиновой кислоты может содержать также:

а. нуклеотидную последовательность, которая кодирует
5 последовательность тяжелой цепи антитела, содержащую антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с CD3, указанную выше в настоящем описании, и/или

б. нуклеотидную последовательность, которая кодирует
10 последовательность легкой цепи антитела, содержащую антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с CD3, указанную выше в настоящем описании.

В следующем объекте изобретения предложена(ы) одна или несколько нуклеиновых кислот, которая(ые) содержит(ат):

а. нуклеотидную последовательность, которая кодирует
15 последовательность тяжелой цепи антитела, содержащую антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с ROR2, указанную в SEQ ID NO: 13,

б. нуклеотидную последовательность, которая кодирует
20 последовательность легкой цепи антитела, содержащую антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с ROR2, указанную в SEQ ID NO: 19.

В следующем объекте изобретения указанная нуклеиновая кислота представляет собой РНК или ДНК.

Нуклеиновые кислоты, предлагаемые в изобретении, можно применять для
25 экспрессии в клетках млекопитающих.

Экспрессионные векторы

В другом объекте изобретения предложен экспрессионный вектор,
содержащий нуклеотидные последовательности, кодирующие
последовательности тяжелых и/или легких цепей антитела, предлагаемого в
30 изобретении. В частности, экспрессионный вектор может содержать:

а) нуклеотидную последовательность, которая кодирует
последовательность тяжелой цепи антитела, содержащую антигенсвязывающую

область, которая обладает способностью связываться с ROR2, указанную выше в настоящем описании, и/или

б) нуклеотидную последовательность, которая кодирует последовательность легкой цепи антитела, содержащую антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с ROR2, указанную выше в настоящем описании.

Экспрессионный вектор может содержать также:

а) нуклеотидную последовательность, которая кодирует последовательность тяжелой цепи антитела, содержащую антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с CD3, указанную выше в настоящем описании, и/или

б) нуклеотидную последовательность, которая кодирует последовательность легкой цепи антитела, содержащую антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с CD3, указанную выше в настоящем описании.

В следующем варианте осуществления изобретения экспрессионный вектор дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область легкой цепи, тяжелой цепи или и легкой, и тяжелой цепей антитела, например, человеческого моноклонального антитела IgG1,к.

В контексте настоящего изобретения экспрессионный вектор может представлять собой любой приемлемый вектор, включая хромосомные, нехромосомные и синтетические нуклеотидные векторы (нуклеотидную последовательность, которая содержит приемлемый набор контролирующих экспрессию элементов). Примеры указанных векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирус, плазмиды на основе дрожжей, векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, и векторы на основе вирусной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК). В одном из вариантов осуществления изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к ROR2, находится в векторе, представляющем собой голую ДНК или РНК, который содержит, например, элемент для линейной экспрессии (как описано, например, у Sykes и Johnston, Nat Biotech 17, 1997, с.с. 355-359 59), компактном нуклеотидном векторе (описанном, например, в US 6077835 и/или WO 00/70087), плазмидном векторе, таком как pBR322, pUC 19/18 или pUC

118/119, нуклеотидном векторе минимального размера, «мошке» (описанном, например, у Schakowski и др., Mol Ther 3, 2001, сс. 793-800 (2001)), векторной конструкции в виде осажденной нуклеиновой кислоты, такой как осажденная CaPO₄ конструкция (описанной, например, в WO 00/46147, у Benvenisty и Reshef, PNAS USA 83, 1986, сс. 9551-9555, Wigler и др., Cell 14, 1978, с. 725 и у Corago и Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 1981, с. 603). Указанные нуклеотидные векторы и их применение хорошо известны в данной области (см., например, US 5589466 и US 5973972).

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения вектор можно применять для экспрессии антитела к ROR2 в бактериальной клетке. Примеры указанных векторов включают такие экспрессионные векторы как BlueScript (фирма Stratagene), pIN-векторы, описанные у Van Heeke и Schuster, J Biol Chem 264, 1989, сс. 5503-5509, pET -векторы (фирма Novagen, Мэдисон, шт. Висконсин) и т.п.).

В другом или альтернативном варианте экспрессионный вектор может представлять собой вектор, пригодный для экспрессии в дрожжевой системе. Можно применять любой вектор, пригодный для экспрессии в дрожжевой системе. Приемлемые векторы включают, например, векторы, содержащие конститутивные или индуцибельные промоторы, такие как промоторы альфа-фактора, алкогольоксидазы и PGH (см., обзор в: Current Protocols in Molecular Biology, под ред. F. Ausubel и др., изд-во Greene Publishing and Wiley InterScience New York, 1987, и у Grant и др., Methods in Enzymol 153, 1987, сс. 516-544).

Нуклеотидная конструкция и/или вектор может содержать также нуклеотидную последовательность, которая кодирует последовательность секреции/локализации, которая может обеспечивать направленный перенос полипептида, такого как кодируемая полипептидная цепь, в периплазматическое пространство или в среды для культивирования клеток. Указанные последовательности известны в данной области и включают лидерные или сигнальные пептиды секреции, последовательности, обеспечивающие направленный перенос в органеллы (например, последовательности ядерной локализации, сигналы удержания в ER, транзитные последовательности митохондрий, транзитные последовательности хлоропластов),

последовательности мембранной локализации/якорные последовательности (например, последовательности останковки переноса, якорные GPI-последовательности) и т.п.

В экспрессионном векторе, предлагаемом в изобретении, кодирующие антитело к ROR2 нуклеиновые кислоты могут содержать или могут быть связаны с промотором, энхансером и другими облегчающими экспрессию элементами. Примеры указанных элементов включают сильные промоторы экспрессии (например, немедленно-ранний промотор/энхансер человеческого цитомегаловируса (CMV IE), а также промоторы RSV, SV40, SL3 3, MMTV и ВИЧ LTR), эффективные поли(A) терминирующие последовательности, сайт инициации репликации плазмидного продукта в *E. coli*, ген, обуславливающий устойчивость к антибиотикам в качестве селективируемого маркера и/или пригодный приемлемый сайт клонирования (например, полилинкер). Нуклеиновые кислоты могут содержать также индуцибельный промотор, отличающийся от конститутивного промотора, такого как CMV IE (специалисту в данной области должно быть очевидно, что указанные понятия применяют для описания уровня экспрессии генов в определенных условиях).

В одном из вариантов осуществления изобретения кодирующий антитело к ROR2 экспрессионный вектор может быть размещен в клетке-хозяине или животном-хозяине и/или доставлен к ним с помощью вирусного вектора.

Клетки и клетки-хозяева

В следующем объекте изобретения предложена клетка, содержащая нуклеотидную конструкцию, описанную выше, или экспрессионный вектор, описанный выше. Должно быть очевидно, что клетку можно получать путем трансфекции клетки-хозяина, такой как рекомбинантная клетка-хозяин, указанной нуклеотидной конструкцией или экспрессионным вектором.

Клетка-хозяин может иметь человеческое происхождение, например, представлять собой клетку почки человеческого эмбриона (НЕК), такую как клетка НЕК/Expi. Альтернативно этому, она может иметь происхождение из грызунов, например, представлять собой клетку яичника китайского хомячка, такую как клетка CHO/N50. Кроме того, клетка-хозяин может иметь бактериальное происхождение.

Клетка может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, предлагаемое в изобретении, или его части, стабильно интегрированные в клеточный геном. Альтернативно этому, клетка может содержать неинтегрированную нуклеиновую кислоту, такую как плаزمид, космида, фагмида или элемент линейной экспрессии, которые содержат последовательность, кодирующую экспрессию антитела к ROR2, предлагаемого в изобретении, или его часть. В частности, клетка-хозяин может содержать неинтегрированную нуклеиновую кислоту, такую как плазмид, космида, фагмида или элемент линейной экспрессии, которые содержат последовательность, кодирующую экспрессию антитела к ROR2, предлагаемого в изобретении, или его часть.

Композиции

В еще одном объекте изобретения предложена композиция, которая содержит антитело, например, биспецифическое антитело, описанное выше. Композиция может представлять собой фармацевтическую композицию, содержащую антитело или биспецифическое антитело и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции можно приготавливать с использованием носителя, эксципиента и/или разбавителя, а также любых других компонентов, пригодных для фармацевтических композиций, включая известные адъюванты, согласно общепринятым методам, таким как описанные у Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19-ое изд., под ред. Gennaro, изд-во, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Фармацевтически приемлемые носители или разбавители, а также любые известные адъюванты и эксципиенты должны быть пригодными для антитела или конъюгата антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, и выбранного пути введения. Приемлемость носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяют на основании отсутствия значительного негативного воздействия на желаемые биологические свойства выбранного соединения или фармацевтической композиции, предлагаемых в настоящем изобретении (например, менее существенного воздействия [10% или менее относительного ингибирования, 5% или менее относительного ингибирования и т.д.], на связывание с антигеном).

Фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может включать разбавители, наполнители, соли, буферы, поверхностно-активные вещества (например, неионогенное поверхностно-активное вещество, такое как Твин-20 или Твин-80), стабилизаторы (например, сахара или не
5 входящие в состав белков аминокислоты), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы и/или другие материалы, пригодные для включения в фармацевтическую композицию.

Фактические уровни доз действующих веществ в фармацевтических композициях, предлагаемых в настоящем изобретении, можно варьировать
10 таким образом, чтобы получить количество действующего вещества, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического действия для конкретного пациента, композиции и пути введения, не являясь токсичным для пациента. Выбранный уровень доз должен зависеть от целого ряда фармакокинетических факторов, включая активность применяемых конкретных
15 композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, или их амида, путь введения, время введения, скорость выведения применяемого конкретного соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в сочетании с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние
20 здоровья и предшествующая история болезни пациента, подлежащего лечению, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

Фармацевтически приемлемые носители включают любые и все приемлемые растворители, дисперсионные среды, материалы для абсорбции покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, придающие
25 изотоничность агенты, антиоксиданты и агенты, замедляющие всасывание, и т.п., которые физиологически совместимы с соединением, предлагаемым в настоящем изобретении.

Примеры пригодных водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях, предлагаемых в изобретении,
30 включают воду, физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор, этанол, декстрозу, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их приемлемые смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, кукурузное масло, арахисовое

масло, хлопковое масло и кунжутное масло, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовую камедь и применяемые для инъекций органические сложные эфиры, такие как этилолеат, и/или различные буферы. В области фармацевтики хорошо известны другие носители.

5 Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления при необходимости стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Применение указанных сред и агентов для фармацевтически активных субстанций известно в данной области. За исключением случаев, когда любая обычная среда или агент
10 несовместимы с действующим веществом, предполагается их применение в фармацевтических композициях, предлагаемых в настоящем изобретении.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, могут содержать также фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например
15 (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п. (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3)
20 хелатирующие металлы агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, могут содержать также придающие изотоничность агенты, такие как сахара,
25 многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, глицерин, или хлорид натрия в композициях.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, могут содержать также один или несколько адъювантов, пригодных для
выбранного пути введения, таких как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты, диспергирующие агенты, консерванты или буферы,
30 которые могут увеличить срок годности или эффективность фармацевтической композиции. Соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, можно приготавливать с носителями, которые должны защищать соединение от быстрого высвобождения, с получением препаратов с контролируемым

высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфиры и полимолочную кислоту индивидуально или с воском, или другие материалы, хорошо известные в данной области. Методы приготовления таких препаратов хорошо известны специалистам в данной области (см., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, под ред. J.R. Robinson, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

В одном из вариантов осуществления изобретения соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, можно приготавливать для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Фармацевтически приемлемые носители для парентерального введения включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления при необходимости стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Применение указанных сред и агентов для фармацевтически активных субстанций известно в данной области. За исключением случаев, когда любая обычная среда или агент несовместимы с действующим веществом, предполагается их применение в фармацевтических композициях, предлагаемых в настоящем изобретении. В композиции можно включать также другие активные или терапевтические соединения.

Фармацевтические композиции для инъекций, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композицию можно приготавливать в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, пригодной для включения лекарственного средства в высокой концентрации. Носитель может представлять собой водный или неводный растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их приемлемые смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и применяемые для инъекций органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и применения поверхностно-

активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию придающие изотоничность агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как глицерин, маннит, сорбит, или хлорид натрия. Пролонгированную абсорбцию инъеклируемых композиций можно обеспечивать путем включения в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина. Стерильные растворы для инъекций можно приготавливать путем введения действующего вещества в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним ингредиентом или их комбинацией, например, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем введения действующего вещества в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты, например, из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций примерами методов приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые позволяют получать порошок действующего вещества плюс любого дополнительного требуемого ингредиента из его предварительно стерилизованного фильтрацией раствора.

Стерильные инъеклируемые растворы можно приготавливать путем включения действующего вещества в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним ингредиентом или их комбинацией, например, из числа перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения действующего вещества в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты, например, из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций примерами методов приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые позволяют получать порошок действующего вещества плюс любого дополнительного требуемого ингредиента из его предварительно стерилизованного фильтрацией раствора.

Фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать одно антитело или биспецифическое антитело, предлагаемое в

настоящем изобретении, комбинацию антитела и биспецифического антитела, предлагаемого в изобретении, с другим терапевтическим соединением, или комбинацию соединений, предлагаемых в настоящем изобретении.

5 Фармацевтическую композицию можно вводить любым приемлемым путем и методом. Приемлемые пути введения соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, *in vivo* и *in vitro* хорошо известны в данной области и их могут выбирать обычные специалисты в данной области.

10 В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящему изобретении, вводят парентерально; т.е. методом введения, отличным от энтерального и местного введения; как правило, путем инъекции, включающей эпидермальную, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, подоболочечную, внутрикапсульную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, 15 внутрь сухожилия, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, внутричерепную, внутригрудную, эпидуральную и надчревную инъекцию и инфузию. В частности, фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно вводить путем внутривенной или подкожной инъекции или инфузии.

20 Использование и терапевтические применения

В настоящем изобретении предложено также антитело, такое как биспецифическое антитело, указанное в описании, предназначенное для применения в качестве лекарственного средства. Антитела к ROR2, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять для лечения или 25 предупреждения заболевания или нарушения, в которое вовлечены клетки, экспрессирующие ROR2, в частности, на поверхности клеток. В частности, биспецифические антитела, предлагаемые в изобретении, т.е. антитела, которые содержат антигенсвязывающие участки, обладающие способностью связываться с ROR2 и CD3, могут оказаться ценными в терапевтических условиях, в которых 30 желательны специфический таргетинг и опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих ROR2, и они могут оказаться более эффективными по сравнению с каноническими антителами к ROR2 при конкретных указанных показаниях и условиях.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, такое как биспецифическое антитело, указанное в описании, предназначено для применения для лечения рака. Антитело, такое как биспецифическое антитело, можно применять, в частности, для лечения рака, где рак отличается экспрессией ROR2 по меньшей мере в некоторых опухолевых клетках. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, предназначено для применения для лечения рака, который представляет собой солидную опухоль.

Рак можно выбирать, в частности, из группы, включающей саркомы, фибросаркому, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, липосаркому, рак матки, рак легких, рак поджелудочной железы, рак почек, колоректальный рак, рак шейки матки и рак молочной железы.

Кроме того, изобретение относится к применению антитела, предлагаемого в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака, например, рака, выбранного из группы, включающей саркомы, фибросаркому, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, липосаркому, рак матки, рак легких, рак поджелудочной железы, рак почек, колоректальный рак, рак шейки матки и рак молочной железы.

В следующем объекте изобретения предложен способ лечения заболевания, где способ включает введение антитела, такого как биспецифическое антитело, композиции, такой как фармацевтическая композиция, предлагаемые в изобретении, субъекту, который нуждается в этом.

В конкретных вариантах осуществления изобретения указанный способ предназначен для лечения рака. Способ, предлагаемый в изобретении, может, в частности, включать стадии, на которых:

а) отбирают субъекта, который страдает раком, содержащим опухолевые клетки, экспрессирующие ROR2, и/или раком, для которого известна экспрессия ROR2; и

б) вводят субъекту антитело, такое как биспецифическое антитело, или фармацевтическую композицию, предлагаемое/предлагаемую в настоящем изобретении.

Рак может представлять собой, в частности, рак, выбранный их группы, включающей саркомы, фибросаркому, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, липосаркому, рак матки, рак легких, рак поджелудочной железы, рак почек, колоректальный рак, рак шейки матки и рак молочной железы.

Режимы дозирования в указанных выше способах лечения и вариантах применения регулируют для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить один болюс, можно вводить несколько разделенных доз с течением времени, или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать в зависимости от требований терапевтической ситуации. Парентеральные композиции можно приготавливать в виде единичных доз для простоты введения и однородности дозировки.

Эффективные дозы и режимы дозирования антител зависят от подлежащего лечению заболевания или состояния и их может определять специалист в данной области. Приведенный в качестве примера не ограничивающий диапазон для терапевтически эффективного количества соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, составляет примерно 0,001 - 10 мг/кг, например, примерно 0,001 - 5 мг/кг, например, примерно 0,001 - 2 мг/кг, например, примерно 0,001 - 1 мг/кг, например, примерно 0,001, примерно 0,01, примерно 0,1, примерно 1 или примерно 10 мг/кг. Другим примером не ограничивающего диапазона для терапевтически эффективного количества антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, является примерно 0,1 - 100 мг/кг, например, примерно 0,1 - 50 мг/кг, например, примерно 0,1 - 20 мг/кг, например, примерно 0,1 - 10 мг/кг, например, примерно 0,5, примерно 0,3, примерно 1, примерно 3, примерно 5 или примерно 8 мг/кг.

Обычный врач, обладающий квалификацией в данной области, может легко определять и назначать требуемое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начинать вводить дозы антитела, применяемого в фармацевтической композиции, с уровней ниже, чем те, которые требуются для достижения желаемого терапевтического действия, и постепенно увеличивать дозировку до тех пор, пока не будет достигнуто желаемое действие. В целом, пригодной суточной дозой антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, должно являться такое количество

соединения, которое представляет собой наименьшую дозу, эффективную для получения терапевтического действия. Введение может быть, например, парентеральным, таким как внутривенное, внутримышечное или подкожное.

5 Антитело можно вводить также профилактически для снижения риска развития рака, отсрочки наступления события при прогрессировании рака и/или снижения риска рецидива, когда рак находится в стадии ремиссии.

10 Антитела, предлагаемые в изобретении, можно применять также в комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими терапевтическими средствами, релевантными для заболевания или состояния, подлежащего лечению. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения содержащее антитело лекарственное средство предназначено для объединения с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, такими как цитотоксический, химиотерапевтический или антиангиогенный агент.

Получение антител

15 В настоящем описании предложен также способ получения антитела, такого как биспецифическое антитело, предлагаемое в изобретении.

Таким образом, предложен способ получения антитела, предлагаемого в изобретении, включающий стадии, на которых

20 а. культивируют клетку-хозяина, которая содержит экспрессионный вектор, указанный в настоящем описании; и

б. очищают указанное антитело из культуральной среды.

В другом варианте осуществления изобретения, в котором антитело содержит связывающую область, которая обладает способностью связываться с ROR2, и связывающую область, которая обладает способностью связываться с CD3, антитело можно получать с помощью способа, включающего стадии, на которых

25 а. получают антитело, которое обладает способностью связываться с ROR2, где указанное антитело содержит антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с ROR2, указанную выше;

30 б. получают антитело, которое обладает способностью связываться с CD3, где указанное антитело содержит антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с CD3, указанную выше;

в. инкубируют указанное антитело, которое обладает способностью связываться с ROR2, вместе с указанным антителом, которое обладает способностью связываться с CD3, в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы цистеины в шарнирной области подвергались изомеризации дисульфидной связи, и

г. получают указанное антитело, обладающее способностью связываться с ROR2 и CD3.

В следующем варианте осуществления изобретения в способе получения антитела, обладающего способностью связываться с ROR2 и CD3, указанные выше стадии а) и/или б) дополнительно включают:

получение клеток, содержащих экспрессионные векторы для получения указанного антитела или указанных антител; и

обеспечение клеткам возможности продуцировать указанное антитело или указанные антитела, и, далее

получение указанного антитела или указанных антител, тем самым обеспечивая создание указанного антитела или указанных антител.

Наборы

В изобретении предложен также состоящий из частей набор, содержащий антитело, указанное выше, например, набор для применения в качестве вспомогательного диагностического средства для идентификации в популяции пациентов тех пациентов, которые могут давать ответ на лечение антителом, указанным выше в настоящем описании, или для прогнозирования эффективности или противоопухолевой активности указанного антитела или иммуноконъюга, или ADC при использовании для лечения пациента, набор содержит антитело, указанное выше; и инструкции по применению указанного набора.

Антиидиотические антитела

Следующим объектом изобретения является антиидиотическое антитело, которое связывается с антителом, содержащим по меньшей мере одну антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с ROR2, т.е. представленным в настоящем описании антителом, предлагаемым в изобретении. В конкретных вариантах осуществления изобретения

антиидиотическое антитело связывается с антигенсвязывающей областью, которая обладает способностью связываться с ROR2.

Антиидиотическое (Id) антитело представляет собой антитело, которое распознает уникальные детерминанты, ассоциированные с антигенсвязывающим центром антитела. Анти-Id антитело можно получать путем иммунизации 5 животного такого же вида и генетического типа, что и животное, применяемого в качестве источника моноклонального антитела к ROR2, моноклональным антителом, против которого образуются анти-Id. Иммунизированное животное, как правило, может распознавать и давать ответ на идиотипические 10 детерминанты применяемого для иммунизации антитела, в виде производства антитела к указанным идиотипическим детерминантам (анти-Id антитело). Указанные антитела описаны, например, в US 4699880. Указные антитела также являются отличительным признаком настоящего изобретения.

Анти-Id антитело можно применять также в качестве «иммуногена» для 15 индукции иммунного ответа уже у другого животного, продуцирующего так называемое антитело к анти-Id. Антитело к анти-Id может быть эпитопически идентичным исходному моноклональному антителу, которое индуцировало выработку анти-Id антитела. Таким образом, с использованием антител к идиотипическим детерминантам моноклонального антитела можно 20 идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела идентичной специфичности. Анти-Id антитела можно изменять (получая тем самым варианты анти-Id антител) и/или дериватизировать любым пригодным методом, таким как те, которые описаны в соответствующем месте в настоящем описании касательно ROR2-специфичных антител, предлагаемых в настоящем 25 изобретении. Например, моноклональное антитело анти-Id можно соединять с носителем, таким как гемоцианин лимфы улитки (KLH), и применять для иммунизации мышей BALB/c. Сыворотка из указанных мышей, как правило, должна содержать антитела к анти-Id, которые обладают связывающими свойствами сходными, если не идентичными, с исходным/родительским 30 антителом к ROR2.

Последовательности

Таблица 1

SEQ ID NO	Идентификатор	Домен	Аминокислотная последовательность
SEQ ID NO:1	ROR2 человека	ORF	MARGSALPRRPLLCIPAVWAAAALLLSVSRTSGEVEVLDPNDPGLG PLDGQDGIPTLKG YFLNFLEPVNNITIVQGQTAILHCKVAGNPPPN VRWLKNDAPVVQEPRIIRKTEYGSRLRIQDLDTTDTGYQCVAT NGMKTITATGVLFVRLGPTHSPNHNFDQDYHEDGFCQPYRGIACA RFIGNRTIYVDSLQMQGEIENRITAAFTMIGTSTHLSQDCSQFAIPSF CHFVFPLCDARSRTPKPRELCRDECEVLES DCRQEYTIARSNPLIL MRLQLPKCEALPMPESPDAANCMRIGIPAERLGRYHQCYNGSGM DYRGTA STTKSGHQCPWALQHPHSHLSSTDFPELGGGHAY CRNPGGQMEGPWCFTQKNV RMELCDVPSCSRPRDSSKMGILYI LVPSIAIPLVIACLFLLVCMCRNKQKASASTPQRRQLMASPSQDME MPLINQHKQAKLKEISLAVRFMEELGEDRF GKVYKGH LFGPAPG EQTQAVAIKTLKDKAEGPLREEFRHEAMLRARLQHPNVVCLLGV VTKDQPLSMIFSYCSHGDLHEFLVMRSPHSDV GSTDDDRYTKSAL EPPDFVHLVAQIAAGMEYLSHHV VHKDLATRNVLVYDKLVKIS DLGLFREYVAADYKLLGNSLLPIRWMAPEAIMYGKFSIDSDIWS YGVVLWEVFSYGLQPYCGYSNQDVVEMIRNRQVLP CPDDCPAWV YALMIECWNEFP SRRPRFKDIHSRLRAWGNLSNYNSSAQTSGASN TTQTSSLSTSPVSNVSNARYVGPQKQAPFPQPQFIPMKGQIRPMV PPPQLYVPNGYQVPAYGAYLPNFYPVQIPMQMAPQQVPPQMV PKPSSHHS GSGSTSTGYVTTAPSNTSMADRAALLSEGADDTQ NAP EDGAQSTVQEAEEEEEGSVPETELLGDCDTLQVDEAQVQLEA
SEQ ID NO:2	ROR2-A_VH	VH	QSVVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSG FSLS SYMSWVRQAPGKGLE WIGVIY VNSKT WYANWAKGRFTISK TSTTVDLKITSPTTEDTATY FCARGDAGYTTNSWL WGPGTLVTVSS
SEQ ID NO:3	ROR2-A_VH-CDR1	VH_CDR1	G FSLS SY
SEQ ID NO:4	ROR2-A_VH-CDR2	VH_CDR2	IYVNSKT
SEQ ID NO:5	ROR2-A_VH-CDR3	VH_CDR3	ARGDAGYTTNSWL
SEQ ID NO:6	ROR2-A_VL	VL	AFELTQTPASVSEPVGGT VTIKQASE ESIDNY CSWYQQKPGQPPKL LIY QAF KLASGVPSRFRGSGSGTQFTLTISDLESDDAATYYC QSYS GISTTA FGGGTEVVVK
SEQ ID NO:7	ROR2-A_VL-CDR1	VL_CDR1	ESIDNY
SEQ ID NO:8	ROR2-A_VL-CDR2	VL_CDR2	QAF
SEQ ID NO:9	ROR2-A_VL-CDR3	VL_CDR3	QSYSGISTTA
SEQ ID NO:10	ROR2-A_HC1	VH	QSVLES GGGLVQPGGSLRLSCTVSG FSLS SYMSWVRQAPGKGLE WIGVIY VNSKT WYANWAKGRFTISK TSTTVDLKITSPTAEDTATY FCARGDAGYTTNSWL WGQGLVTVSS
SEQ ID NO:11	ROR2-A_HC2	VH	QSVLES GGGLVQPGGSLRLSCTVSG FSLS SYMSWVRQAPGKGLE WIGVIY VNSKT WYANWAKGRFTISK TSTTVYLQMNSLRAEDTAT Y FCARGDAGYTTNSWL WGQGLVTVSS
SEQ ID NO:12	ROR2-A_HC3	VH	EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCTVSG FSLS SYMSWVRQAPGKGL EWIGVIY VNSKT WYANWAKGRFTISK TSTTVYLQMNSLRAEDTA TY YCARGDAGYTTNSWL WGQGLVTVSS
SEQ ID NO:13	ROR2-A_HC4	VH	EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCTVSG FSLS SYMSWVRQAPGKGL EWIGVIY VNSKT WYANWAKGRFTISK DNSKNTVYLQMNSLRAED TATYY CARGDAGYTTNSWL WGQGLVTVSS
SEQ ID NO:14	ROR2-A_HC5	VH	EVQLES GGGLVQPGGSLRLS CAAS G FSLS SYMSWVRQAPGKGL EWIGVIY VNSKT WYANWAKGRFTISK DNSKNTVYLQMNSLRAED TATYY CARGDAGYTTNSWL WGQGLVTVSS
SEQ ID	ROR2-A_	VH	EVQLES GGGLVQPGGSLRLSCTVSG FSLS SYMSWVRQAPGKGL

NO:15	HC6		EWIGV VIYVNSKT WYADSVKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAED TATYYC ARGDAGYTTNSWL WGQGLVTVSS
SEQ ID NO:16	ROR2-A_ HC7	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTLSSYS MSWVRQAPGKGL EWIGV VIYVNSKT WYADSVKGRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAED TATYYC ARGDAGYTTNSWL WGQGLVTVSS
SEQ ID NO:17	ROR2-A_ LC1	VL	AFELTQSPSSLSASVGDRTITCQASE ESIDNY CSWYQQKPGKAPKL LIY QAF KLASGVPSRFRGSGSGTDFLTISLQSEDFATYYC QSYSG ISTTAFGGGTEVVIK
SEQ ID NO:18	ROR2-A_ LC2	VL	AFELTQSPSSLSASVGDRTITCQASE ESIDNY LSWYQQKPGKAPKL LIY QAF KLASGVPSRFRGSGSGTDFLTISLQSEDFATYYC QSYSG ISTTAFGGGTEVVIK
SEQ ID NO:19	ROR2-A_ LC3	VL	AFELTQSPSSLSASVGDRTITCQASE ESIDNY LSWYQQKPGKAPKL LIY QAF KLASGVPSRFRGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC QSYSG ISTTAFGGGTEVVIK
SEQ ID NO:20	ROR2-A_ LC4	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCQASE ESIDNY LSWYQQKPGKAPKL LIY QAF KLASGVPSRFRGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC QSYSG ISTTAFGGGTEVVIK
SEQ ID NO:21	CD3ε (эпсилон) человека	Зрелый белок	QDNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIG GDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYWSKNRK AKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDIYPIRKGQRDLYS GLNQRI
SEQ ID NO:22	CD3- SP34_VH WT	VH	EVKLLLESGGGLVQPKGSLKLSAAS GFTFNTY AMNWVRQAPGKGL LEWVAR IRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDQSILYLQMNNLK TEDTAMYYC VRHGNFGNSYVSWFAY WGQGLVTVSA
SEQ ID NO:23	CD3- SP34_VH- CDR1	VH_CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:24	CD3- SP34_VH- CDR2	VH_CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:25	CD3- SP34_VH- CDR3	VH_CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:26	CD3- SP34_VL WT	VL	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCR SSTGAVTTSNY ANWVQEKPDH LFTGLIG GTN KRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNLWV FGGKLTVL
SEQ ID NO:27	CD3- SP34_VL- CDR1	VL_CDR1	TGAVTTSNY
Без номера (только 3 ак)	CD3- SP34_VL- CDR2 (GTN)	VL_CDR2	GTN
SEQ ID NO:28	CD3- SP34_VL- CDR3	VL_CDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:29	huCD3- H1L1_VH	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTY AMNWVRQAPGK GLEWVAR IRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMN LKTEDTAMYYC VRHGNFGNSYVSWFAY WGQGLVTVSS
SEQ ID NO:30	huCD3- H1L1_VL	VL	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCR SSTGAVTTSNY ANWVQQT AFRGLIG GTN KRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFC ALWYSNLWV FGGKLTVL
SEQ ID	huCD3-	CDR3	VRGGNFGNSYVSWFAY

NO:31	H1L1- H101G_VH CDR3		
SEQ ID NO:32	huCD3- H1L1- H101G_VH	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFNTY AMNWVRQAPGK GLEWVAR IRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMN LKTEDTAMYY VRGGNFGNSYVSWFAY WGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:33	IgG1-Fc человека	Константный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALH NHYTQKLSLSPGK
SEQ ID NO:34	IgG1-Fc- FEAR человека	Константный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALH NHYTQKLSLSPGK
SEQ ID NO:35	IgG1-Fc- FEAL человека	Константный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALH NHYTQKLSLSPGK
SEQ ID NO:36	LC каппа человека	Константный	RTVAAPSVFIFPSSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADYKHKVYACEVT HQLLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:37	LC лямбда человека	Константный	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:38	IgG1-F405L	Константный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALH NHYTQKLSLSPGK
SEQ ID NO:39	ROR2 обезьян циномолгус (<i>Macaca fascicularis</i>)	ORF	MARGSALPRRLLCIPAVWAAAALLSVSRTSGEVEVPDPNDPLG PLDGQDGIPTLKGFLNLEPVNNITIVQGQTAILHCKVAGNPPPN VRWLKNDAPVVQEPRIIRKTEYGSRLRIQDLDTTDTGYQCVA NGMKTITATGVLFVRLGPTHSPNHNFDQDDYHEDGFCQPYRGIACA RFIGNRTIYVDSLQMQGEIENRITAAFTMIGTSTHLSQCSQFAIPSF CHFVFPLCDARSRAPKPRELCRDECEVLESCLCRQEYTIARSNPLIL MRLQLPKCEALPMPESPAANCMRIGIPAERLGRYHQCYNGSGTD YRGTAATTKSGHQCPWALQHPHSHHLSSTDFPELGGGHAYCRNP GGQMEGPWCFTQKNVMEELCDVPSCSPRDSKMGILYILVPSIAI PLVIACLFFLVCMCRNKQKASASTPQRRLMASPSQDMEEMPLINQ HKQAKLKEISLAVRFMEELGEDRFKVKYKGLHFGPAPGEQTQAV AIKTLKDKAEGPLREEFRHEAMLRARLQHPNIVCLLGVVTKDQPL SMIFSYCSHSDLHEFLVMRSPHSDVGSDDDTRVKSVALEPDDFVHL VAQIAAGMEYLSSHVVHKDLATRNVLYVDKLVNPKISDLGLFRE VYAADYKLLGNSLLPIRWMAPEAIMYGKFSIDSDIWSYGVVLWE VFSYGLQPYCGYSNQDVVEMIRNRQVLPDPCPAWVYALMIEC WNEFPSRRPRFKDIHSRLRAWGNLSNYNSSAQTSGASNTTQTSSLS TSPVSNVSNARYMGPKQKAPFPQPFIPMKQIRPMVPPPQLYIP

			VNGYQVPAYGAYLPNFYVPQIPMQMAPQQVPPQMVPKPSHHS GSGSTSTGYVTTAPSNTSVADRAALLSEGTEDAQNAPEDGAQSPV QEAEEEEGSVPETELLGSDTLQVDEAQVQLEA
SEQ ID NO:40	ROR1 человека	ORF	MHRPRRRGTRPPLLALLAALLAARGAAAQETELSVSAELVPTSS WNISSELNKDSYLTLEPMNNTTSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRW FKNDAPVVQEPRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGK EVSSTGVLVFKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIG NRTVYMESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCH YAFPYCDETSSVPKPRDLRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMILM RLKLPNCEDLPQESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVVY RGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPENGGHSCYCRNPG NQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILYILVPSV AIPLAIALFFVICVCRNNQKSSAPVQRQPKHVRGQNVEMSMNLNA YKPKSKAKELPLSAVRFMEELGECAFGKIYKGHLYLPGMDHAQL VAIKTLKDYNNPQQWTEFQQEASLMAELHHPNIVCLLGAVTQEQP VCMLFEYINQGDLEFLIMRSPHSDVGCSSDEDGTVKSSLDHGDF LHIAIQIAAGMEYLSHFFVHKDLAARNLIGEQLHVKISDLGLSRE IYSADYYRVQSKSLLPIRWMPPEAIMYGKFSDDIWSFGVVLWEI FSFGLQPYYGFSNQEVIEVMVRKRQLLPCSEDCPPRMYSLMTECW EIPRRRPFKDIHVRLRSWEGLSSHTSSTTPSGGNATTQTTLSASP VSNLSNPRYPNYMFPSQGITPQGQIAGFIGPPIQNRQRFIPINGYPIPP GYAAFPAAHYQPTGPPRVIQHCPPPKSRSPPSSASGSTSTGHVTSPLS SGSNQEANIPLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQASL LGDANIHGHTESMISAE
SEQ ID NO:41	ROR2mf- T322M	ORF	MARGSALPRRLLCIPAVWAAAALLSVSRTSGEVEVPDNDPLG PLDGDGPIPTLKGFLNFLEPVNNITIVQGQTALHCKVAGNPPN VRWLKNDAPVVQEPRIIRKTEYGSRLRIQDLDTTDTGYFQCVAT NGMKTITATGVLVRLGPTHSPNHNFDQDYHEDGFCQPYRGIACA RFIGNRTIYVDSLQMQGEIENRITAAFTMIGTSTHLSQCSQFAIPSF CHFVFPLCDARSRAKPRELCRDECEVLESDLCRQEYTIARSNPLIL MRLQLPKCEALPMPESPDAANCMRIGIPAERLGRYHGNGSGM DYRGTAATTKSGHQCPWALQHPHSHHLSSTDFPELGGGHAYCR NPGGQMEGPWCFTQNKNVRMELCDVPSCSPRDSKMGILYILVPS IAIPLVIACLFFLVCMCRNKQKASASTPQRRQLMASPSQDMEMPLI NQHKQAKLKEISLSAVRFMEELGEDRFGKVYKGHLFGPAPGEQTQ AVAIKTLKDKAEGPLREEFRHEAMLRARLQHPNIVCLLGVVTKDQ PLSMIFSYSCHSDLEFLVMRSPHSDVGSTDDRTVKSALPEPDFV HLVAQIAAGMEYLSHHVVKDLATRNVLVYDKLVKISDLGLF REVYAADYYKLLGNSLLPIRWMAPEAIMYGKFSIDSDIWSYGVVL WEVFSYGLQPYCGYSNQDVVEMIRNRQVLPDPCPAWVYALMI ECWNEFPSRRRPFKDIHSRLRAWGNLSNYNSSAQTSGASNTTQTSS LSTSPVSNVSNARYMGPKQKAPFPQPFIPMKQQIRPMVPPPQY IPVNGYQVPAYGAYLPNFYVPQIPMQMAPQQVPPQMVPKPSHH GSGSTSTGYVTTAPSNTSVADRAALLSEGTEDAQNAPEDGAQSP VQEAEEEEGSVPETELLGSDTLQVDEAQVQLEA
SEQ ID NO:42	ROR112	Перетасованный	MHRPRRRGTRPPLLALLAALLAARGAAAQETELSVSAELVPTSS WNISSELNKDSYLTLEPMNNTTSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRW FKNDAPVVQEPRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGK EVSSTGVLVFKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIG NRTVYMESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCH YAFPYCDETSSVPKPRDLRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMILM RLKLPNCEDLPQESPEAANCIRIGIPMADPINKNVCYNSGMDYRG TASTTKSGHQCPWALQHPHSHHLSSTDFPELGGGHAYCRNPGG QMEGPWCFTQNKNVRMELCDVPSCSPRDSKMGILVPSVAIPLAI ALLFFVICVCRNNQKSSAPVQRQPKHVRGQNVEMSMNLNAYKPKS KAKELPLSAVRFMEELGECAFGKIYKGHLYLPGMDHAQLVAIKTL KDYNNPQQWTEFQQEASLMAELHHPNIVCLLGAVTQEQPVCMLF EYINQGDLEFLIMRSPHSDVGCSSDEDGTVKSSLDHGDFLHIAIQI AAGMEYLSHFFVHKDLAARNLIGEQLHVKISDLGLSREIYSADY YRVQSKSLLPIRWMPPEAIMYGKFSDDIWSFGVVLWEIFSGLQ PYYGFSNQEVIEVMVRKRQLLPCSEDCPPRMYSLMTECWNEIPRRP RFKDIHVRLRSWEGLSSHTSSTTPSGGNATTQTTLSASPVSNLSNP RYPNYMFPSQGITPQGQIAGFIGPPIQNRQRFIPINGYPIPPGYAAFP

			AAHYQPTGPPRVIQHCPPPKSRSPSSASGSTSTGHVTSLPSSGSNQE ANIPLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQASLLGDANI HGHTESMISAEAL
SEQ ID NO:43	ROR121	Перетасованный	MHRPRRRGTRPPLLALLAALLLAARGAAAQETELSVSAELVPTSS WNISSELNKDSYLTLEDEPMNITTSLGQTAEHLCKVSGNPPPTIRW FKNDAPVVQEPRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGK EVVSSSTGVLVFKFGPPPTASPGYSDEYHEDGFCQPYRGIACARFIG NRTIYVDSLQMQGEIENRITAAFTMIGTSTHLSQCSQFAIPSFCHF VFPLCDARSRTPKPRELCRDECEVLES DLCRQEYTIARSNPLILMRL QLPKCEALPMPESPDAANCMRIIPMADPINKNHKCYNSTGVDIRG TVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPENGGHSCRNPNQ KEAPWCFTLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILYILVPSVAI PLAIALFFFCVCRNNQKSSAPVQRQPKHVRGQNVEMSMNLAY KPKSKAKELPLSAVRFMEELGECAFGKIYKGHLYLPGMDHAQLV AIKTLKDYNNPQQWTEFQQEASLMAELHHPNIVCLLGAVTQEQPV CMLFEYINQDGLHEFLIMRSPHSDVGCSSDEDGTVKSSLDHGDFL HIAIQIAAGMEYLSHFFVHKDLAARNILIGEQLHVKISDLGLSREI YSADY YRVQSKSLLPIRWMPPEAIMYGKFSDDSIWSFGVVLWEIF SFGLPQYYGFSNQEVIEVMVRKRQLLPCSEDCPPRMYSLMTECWNE IPSRPRFKDIHVRLRSWEGLSSTSTTPSGGNATTQTTSLSASPV SNLSNPRYPNYMFPSQGITPQGQIAGFIGPPIPNQRFIPINGYPIPPG YAFPAAHYQPTGPPRVIQHCPPPKSRSPSSASGSTSTGHVTSLPSS GSNQEANIPLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQASLL GDANIHGHTESMISAEAL
SEQ ID NO:44	ROR122	Перетасованный	MHRPRRRGTRPPLLALLAALLLAARGAAAQETELSVSAELVPTSS WNISSELNKDSYLTLEDEPMNITTSLGQTAEHLCKVSGNPPPTIRW FKNDAPVVQEPRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGK EVVSSSTGVLVFKFGPPPTASPGYSDEYHEDGFCQPYRGIACARFIG NRTIYVDSLQMQGEIENRITAAFTMIGTSTHLSQCSQFAIPSFCHF VFPLCDARSRTPKPRELCRDECEVLES DLCRQEYTIARSNPLILMRL QLPKCEALPMPESPDAANCMRIGIPAERLGRYHQYNGSGMDYR GTASTKSGHQCPWALQHPHSHHLSSTDFPELGGGHAYCRNPNQ GQMEGPWCFTQKNVRMELCDVPSCDSKDSKEKNKMEILYILVP SVAIPLAIALFFFCVCRNNQKSSAPVQRQPKHVRGQNVEMSMNLAY KPKSKAKELPLSAVRFMEELGECAFGKIYKGHLYLPGMDHA QLVAIKTLKDYNNPQQWTEFQQEASLMAELHHPNIVCLLGAVTQE QPVCMLFEYINQDGLHEFLIMRSPHSDVGCSSDEDGTVKSSLDHG DFLHIAIQIAAGMEYLSHFFVHKDLAARNILIGEQLHVKISDLGLS REIYSADY YRVQSKSLLPIRWMPPEAIMYGKFSDDSIWSFGVVL WEIFSFGLPQYYGFSNQEVIEVMVRKRQLLPCSEDCPPRMYSLMTEC WNEIPSRPRFKDIHVRLRSWEGLSSTSTTPSGGNATTQTTSLSA SPVSNLSNPRYPNYMFPSQGITPQGQIAGFIGPPIPNQRFIPINGYPI PPGYAAFPAAHYQPTGPPRVIQHCPPPKSRSPSSASGSTSTGHVTSL PSSGSNQEANIPLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQA SLLGDANIHGHTESMISAEAL
SEQ ID NO:45	ROR211	Перетасованный	MARGSALPRRPLLCIPAVWAAAALLSVSRTSGEVEVLDPNDPLG PLDGGDGIPTLKGFLNFLEPVNITIVQGQTAILHCKVAGNPPPN VRWLKNDAPVVQEPRIIRKTEYGSRLRIQDLDTTDTGYFQCVAT VKFGPPPTASPGYSDEYEEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYMESLH MQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFYPCDETSS VPKPRDLRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLP QPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNSTGVDIRGTVSVTKSGR QCQPWNSQYPHTHTFTALRFPENGGHSCRNPNQKEAPWCFT LDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILYILVPSVAIPLAIALFFFC ICVCRNNQKSSAPVQRQPKHVRGQNVEMSMNLAYKPKSKAKEL PLSAVRFMEELGECAFGKIYKGHLYLPGMDHAQLVAIKTLKDYNN NPQQWTEFQQEASLMAELHHPNIVCLLGAVTQEQPVCMLEFEYINQ DGLHEFLIMRSPHSDVGCSSDEDGTVKSSLDHGDFLHIAIQIAAGM EYLSHFFVHKDLAARNILIGEQLHVKISDLGLSREIYSADY YRVQS KLLPIRWMPPEAIMYGKFSDDSIWSFGVVLWEIFSFGLPQYYGF SNQEVIEVMVRKRQLLPCSEDCPPRMYSLMTECWNEIPSRPRFKDI HVRLRSWEGLSSTSTTPSGGNATTQTTSLSASPVSNLSNPRYPN YMFPSQGITPQGQIAGFIGPPIPNQRFIPINGYPIPPGYAAFPAAHY

			QPTGPPRVIQHCPPPKSRSPSSASGSTSTGHVTSLPSSGSNQEANIP LPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQASLLGDANIHGHT SMISAEL
SEQ ID NO:46	ROR221	Перетасованный	MHRPRRRGTRPPLLALLAALLLAARGAAAQETELSVSAELVPTLK GYFLNFLEPVNNITIVQGQTAILHCKVAGNPPPNVRWLKNDAPVV QEPRRIIRKTEYGSRLRIQDLDTTDTGYYQCVATNGMKTITATGV LFVRLGPTHSPNHNFDQDDYHEDGFCQPYRGIACARFIGNRTIYVDS LQMGEIENRITAAFTMIGTSTHLSQCSQFAIPSFCHFVFPLCDAR SRTPKPRELCRDECEVLES DLCRQEYTIARSNPLILMRLQLPKCEAL PMPESDAANCMRIIPMADPINKNHKCYNSTGVDRGTVSVTKSG RQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCF TLDENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILYILVPSVAIPLAIALLF FFICVCRNNQKSSAPVQRQPKHVRGQNVEMSMNLNAYKPKSKAK ELPLSAVRFMEELGECFAFGKIYKGLYLPGMHAQLVAIKTLKDY NNPQQWTEFQQEASLMAELHHPNIVCLLGAVTQEQPVCMLFEYIN QGDLEHFLIMRSPHSVDVGCSSDEDGTVKSSLDHGDFLHIAIQIAAG MEYLSHFFVHKDLAARNILIGEQLHVKISDLGLSREIYSADYYRV QSKSLLPIRWMPPEAIMYGKFSDDIWSFGVVLWEIFSGLQPY GFSNQEVIEVMVRKRQLLPCSEDCPPRMYSMLMTECWNEIPSRFRK DIHVRLRSWEGLSSHTSSTTPSGGNATTQTSLASPVSNLSNPRYP NYMFPSQGITPQGQIAGFIGPPIPQNORFIPINGYPIPPGYA AFPAAH YQPTGPPRVIQHCPPPKSRSPSSASGSTSTGHVTSLPSSGSNQEANIP LPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQASLLGDANIHGHT ESMISAEL
SEQ ID NO:47	b12_VH	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQAS GYRFSNF VIHWVRQAPGQR FEWMGWIN PYNGNKE FSAKFQDRVTFTADTSANTAYMELRSLRS ADTAVYYC CARVGPYSWDDSPQDNYYMDV WGKTTVIVSS
SEQ ID NO:48	b12_VL	VL	EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSS HSIRSRRA WYQHKPGQAPR LVIHGVSNRAS GISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYC QVY GASSYTFGQGTKLERK
SEQ ID NO: 49	IgG1-K409R	Константный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 50	IgG1-FEA	Константный	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 51	CD3E27- GSKa	ORF	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPKGQAPRLIYD ASNRA TGIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPIT FGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

Примеры

Пример 1 – Создание химерных кроличьих-человеческих антител, специфических в отношении человеческого ROR2

Экспрессионные конструкции

5 Создавали конструкции, кодирующие различные полноразмерные варианты ROR2: человеческий (*Homo sapiens*) ROR2 (Uniprot, регистрационный № Q01974; SEQ ID NO: 1), ROR2 обезьян циномогус (*Macaca fascicularis*) (ROR2mf; Uniprot, регистрационный № A0A2K5UT30; SEQ ID NO: 39) и ROR2 обезьян циномогус, в котором треонин в положении 322 заменен на метионин (ROR2mf-T322M; ; SEQ ID NO: 41).

10 Кроме того, создавали конструкцию, кодирующую полноразмерный человеческий ROR1 (Uniprot, регистрационный № Q01973; SEQ ID NO: 40).

15 Кроме того, создавали конструкции, кодирующие перетасованные варианты Ig-подобного домена, frizzled-подобного богатого цистеинами домена (CRD) и kringle-домена ROR2 и ROR1:

- ROR112, содержащий Ig-подобный домен и CRD ROR1 и kringle-домен ROR2 (SEQ ID NO: 42),
- ROR121, содержащий Ig-подобный домен ROR1, CRD ROR2 и kringle-домен ROR1 (SEQ ID NO: 43),
- 20 • ROR122, содержащий Ig-подобный домен ROR1 и CRD- и kringle-домен ROR2 (SEQ ID NO: 44),
- ROR211, содержащий Ig-подобный домен ROR2 и CRD- и kringle-домен ROR1 (SEQ ID NO: 45),
- ROR221, содержащий Ig-подобный домен CRD ROR2 и kringle-домен ROR1 (SEQ ID NO: 45),

25 которые дополнительно проиллюстрированы в таблице 2.

Таблица 2. Перетасованные варианты Ig-подобного домена, frizzled-подобного домена, богатого цистеинами домена (CRD) и kringle-домена ROR2 и ROR1

Перетасованный вариант	Источник IgG-подобного домена	Источник CRD	Источник kringle-домена
112	ROR1	ROR1	ROR2
121	ROR1	ROR2	ROR1

Перетасованный вариант	Источник IgG-подобного домена	Источник CRD	Источник kringle-домена
122	ROR1	ROR2	ROR2
211	ROR2	ROR1	ROR1
221	ROR2	ROR2	ROR1

Конструкции содержали сайты рестрикции, пригодные для клонирования, и оптимальную последовательность Козак (GCCGCCACC) (Kozak M., Gene 234(2), 1999, сс. 187-208). Конструкции полноразмерного белка и ECD клонировали в экспрессионном векторе для клеток млекопитающих pSB, который содержал инвертированные концевые повторы «Спящая красавица» (Sleeping Beauty), фланкирующие кассету экспрессии, состоящую из промотора CMV и полиА-сигнала HSV-ТК.

Кратковременная экспрессия в клетках HEK-293F или CHO

Мембранными белками (полноразмерные ROR2 и ROR1, SEQ ID NO: 1, 39, 40 и 41) кратковременно трансфектировали клетки Freestyle 293-F (HEK293F, субклон HEK-293, адаптированный для роста в суспензии и среде Freestyle определенного химического состава; фирма Invitrogen, каталожный № R790-07), используя реагент 293fectin (фирма Invitrogen, каталожный № 12347-019), следуя в целом инструкции производителя, или клетки Freestyle CHO-S (CHO) (фирма Life technologies, каталожный № R800-07), используя реагент Freestyle Max (фирма Life technologies, каталожный №. 16447100), следуя в целом инструкции производителя.

Иммобилизация кроликов

Иммобилизацию кроликов осуществляли на фирме mAbDiscovery GmbH (Нойрид, Германия). Кроликов несколько раз иммунизировали смесью HEK-клеток, сверхэкспрессирующих либо человеческий ROR1 (SEQ ID NO; 40), либо человеческий ROR2 (SEQ ID NO: 1). Собирали кровь указанных животных и выделяли В-лимфоциты. Используя запатентованный процесс MAB Discovery, единичные В-клетки сортировали, распределяя по лункам титрационных микропланшетов, и затем размножали. Супернатанты указанных единичных В-клеток анализировали в отношении специфического связывания с клетками

CHO-S, кратковременно экспрессирующими ROR2 человека (CHO-ROR2) или ROR2 обезьян циномоглус (CHO-mfROR2).

Получение рекомбинантных химерных антител

5 После анализа результатов первичного скрининга отбирали первичные «хиты» (наилучшие совпадения) для секвенирования, получения и очистки рекомбинантных МАт. Синтезировали на уровне генов области, кодирующие вариабельную тяжелую цепь (VH) и легкую цепь (VL), и клонировали в экспрессионных векторах для клеток млекопитающих, содержащих последовательности, кодирующие человеческую константную область (каппа-
10 цепь Ig и тяжелая цепь аллотипа IgG1 G1m (f)).

Рекомбинантные кроличьи-человеческие химерные антитела, содержащие кроличьи вариабельные области и человеческие константные области, получали в клетках НЕК 293 путем кратковременной совместной трансфекции экспрессионными векторами, кодирующими тяжелую цепь (HC) и легкую цепь
15 (LC), используя автоматизированную процедуру на платформе Tecan Freedom Evo. Иммуноглобулины очищали из клеточного супернатанта с использованием аффинной очистки (белок А) в ЖХВП-системе Dionex Ultimate 3000.

Полученные химерные моноклональные антитела (МАт) повторно анализировали в отношении связывания с клетками CHO-ROR2 или CHO-
20 mfROR2. В целом, идентифицировали 51 антитело, которые связывались с ROR2 и человека, и обезьян циномоглус на CHO-трансфектантах. Их дополнительно анализировали в отношении связывания с позитивными по человеческому ROR2 клетками рака шейки матки линии HeLa (для этой цели использовали проточную цитометрию, применяя описанный ниже метод). Аффинность связывания ROR2
25 определяли с помощью ROR2ECD-His (для этой цели использовали биослойную интерферометрию, применяя описанный ниже метод), в результате получали панель, состоящую из 8 антител, которые обладали связыванием по меньшей мере в одном анализе. Указанные восемь антител перечислены ниже таблице 3 (пример 2) и таблице 4 примера 3.

30 Пример 2 – Определение аффинности связывания с ROR2 кроличьих-человеческих химерных антител с помощью биослойной интерферометрии

Аффинность связывания с мишенью кроличьих-человеческих химерных антител определили с помощью биослойной интерферометрии (BLI) без меток

на устройстве Octet HTX (фирма FortéBio). Эксперименты осуществляли при встряхивании при 1000 об/мин при 30°C.

Биосенсоры для захвата содержащего Fc-область античеловеческого IgG (Anti-Human IgG Fc Capture, (АНС) (фирма FortéBio, каталожный №. 18-5060) предварительно кондиционировали, обрабатывая 10мМ глициновым буфером (фирма Riedel-de Haën, каталожный №15527) с pH 1,7 в течение 5 с последующей нейтрализацией в разбавителе для образцов (фирма FortéBio, каталожный №18-1048) в течение 5 с; обе стадии повторяли 5 раз. Затем АНС-сенсоры загружали антителом (2,5 мкг/мл в разбавителе для образцов) в течение 600 с. После измерения исходного уровня с использованием разбавителя для образцов (300 с) определяли ассоциацию (1000 с) и диссоциацию (1000 с) поступающего в продажу внеклеточного домена ROR2, меченного his (ROR2-ECD, фирма G&P Biosciences, каталожный № FCL0192), используя диапазон концентраций 6,25-400нМ, полученный двукратным разбавлением в разбавителе для образцов. Для расчетов использовали рассчитанную на основе аминокислотных последовательностей молекулярную массу ROR2-ECD, составляющую 42,7 кДа. Для каждого антитела использовали эталонный сенсор, который инкубировали с разбавителем для образцов вместо антигена. АНС-сенсоры регенерировали, обрабатывая 10мМ глициновым буфером, pH 1,7 в течение 5 с, с последующей нейтрализацией в разбавителе для образцов в течение 5 с; обе стадии повторяли 2 раза. Затем сенсоры вновь загружали антителом для следующего цикла кинетических измерений.

Данные получали с помощью программного обеспечения для сбора данных, версия 8.1.0.42 (фирм FortéBio) и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных, версия 8.1 (фирма FortéBio). Трассировку данных корректировали для каждого антитела путем вычитания среднего ответа эталонных сенсоров. Ось Y устанавливали на последние 10 с исходной линии, применяли межэтапную коррекцию, выравнивание по диссоциации и фильтрацию Савицкого-Голея. Данные подгоняли с использованием глобальной модели полного соответствия 1:1 с использованием представляющего интерес окна для времени ассоциации и диссоциации, установленного на 1000 с и 200 с соответственно.

В таблице 3 представлены константа скорости ассоциации k_a (1/Мс), константа скорости диссоциации k_d (1/с) и константа равновесия диссоциации K_D (нМ) для человеческого ROR2-ECD панели из 8 кроличьих-человеческих химерных антител.

5 Таблица 3: Аффинности связывания кроличьих-человеческих химерных антител к ROR2 с рекомбинантным человеческим ROR2-ECD (фирма G&P Biosciences), определенные с помощью биослойной интерферометрии без меток

Антитело	Константа скорости ассоциации k_a (1/Мс)	Константа скорости диссоциации k_d (1/с)	K_D (нМ)
chIgG1-ROR2-A	6,1E+05	9,5E-04	1,6
chIgG1-ROR2-B	2,4E+05	7,9E-04	3,3
chIgG1-ROR2-C	5,5E+05	2,5E-03	4,5
chIgG1-ROR2-D	6,3E+05	4,1E-03	6,5
chIgG1-ROR2-E	5,7E+05	8,0E-03	14
chIgG1-ROR2-F	2,5E+05	5,5E-03	22
chIgG1-ROR2-G	1,5E+05	3,5E-03	22
chIgG1-ROR2-H	1,1E+05	3,3E-03	30

10 Пример 3 - Связывание кроличьих-человеческих химерных антител к ROR2 с ROR2, экспрессируемым на клетках рака шейки матки линии HeLa

Связывание кроличьих-человеческих химерных антител к ROR2 с ROR2, экспрессируемым на человеческих опухолевых клетках, определяли с помощью проточной цитометрии, используя экспрессирующие ROR2 клетки аденокарциномы шейки матки линии HeLa (ATCC, каталожный № CCL-2). Для подтверждения того, что связывание с клетками HeLa зависело от экспрессии ROR2, применяли клетки HeLa, в которых экспрессию ROR2 подавляли с помощью одной гидовой РНК, единственной мишенью которой был человеческий ген ROR2 (последовательность-мишень GAAGTGGCAGAAGGATGGGA), с использованием технологии редактирования генов на основе ассоциированной с CRISPR (расположенные регулярными кластерами короткие полиндромные повторы) нуклеазы Cas9 (фирма Celecta, США).

Клетки (1×10^5 клеток/лунку) инкубировали в 96-луночных круглодонных планшетах из полистирола (фирма Greiner bio-one, каталожный № 650180) с

серийными разведениями антител (диапазон от 0,01 до 10 мкг/мл, получен с помощью 3- или 4-кратных стадий разведения) в 100 мкл ЗФР/0,1% БСА/0,02% азида (FACS-буфер) при 4°C в течение 30-60 мин. Эксперименты осуществляли с техническим дублированием. После двукратной промывки в FACS-буфере клетки инкубировали с 50 мкл вторичного антитела (конъюгированное с R-фикоэритрином [PE] козье антитело к человеческому IgG F(ab')₂; разведенное в соотношении 1:200 в FACS-буфере; фирма Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Уэст-Гроув, шт. Пенсильвания, каталожный № 109-116-098) при 4°C в течение 30 мин. Клетки промывали дважды в FACS-буфере, ресуспендировали в 30 мкл FACS-буфера, содержащего Torqo-3 (разведение 1:10000) и анализировали с помощью устройства iQue Screener (фирма Intellicyt Corporation, США). Кривые связывания анализировали с использованием нелинейной регрессии (сигмоидная кривая доза-ответ с переменным наклоном), используя программное обеспечение GraphPad Prism V7.02 (фирма GraphPad Software, Сан-Диего, шт. Калифорния, США).

Из панели, включающей 8 кроличьих-человеческих химерных антител, у 7 антител обнаружено низкий уровень связывания (максимальная величина MFI менее 5000) в клетками HeLa, а у одного антитела, chIgG1-ROR2-A, обнаружен высокий уровень связывания (максимальная величина MFI выше 20000) с клетками HeLa (таблица 4). Антитело chIgG1-ROR2-A не связывалось с клетками HeLa, в которых ген *ROR2* был специфически инактивирован, что свидетельствует о том, что chIgG1-ROR2-A является ROR2-специфическим.

Таблица 4: Связывание кроличьих-человеческих химерных антител к ROR2 с клетками HeLa

Антитело	EC ₅₀ (ROR2)	Максимальное связывание (MFI)
chIgG1-ROR2-A	0,217	30,093
chIgG1-ROR2-B	0,228	3,818
chIgG1-ROR2-C	0,094	2,373
chIgG1-ROR2-D	0,001	1,943
chIgG1-ROR2-E	0,048	2,436
chIgG1-ROR2-F	0,178	4,310
chIgG1-ROR2-G	0,378	2,870
chIgG1-ROR2-H	0,384	1,714

Для chIgG1-ROR2-A обнаружено минимальное связывание с экспрессирующими ROR1 клетками линии Calu-1. На указанное связывание не влияло подавление экспрессии ROR1 с помощью одной гидовой РНК, единственной мишенью которой был человеческий ген ROR1

5 (последовательность-мишень: GGAGTCTTTGCACATGCAAG). Любое связывание chIgG1-ROR2-A снижалось при подавлении экспрессии ROR2, что свидетельствует о том, что низкий уровень экспрессии ROR2 в линии клеток Calu-1 ответствен за остаточное связывание chIgG1-ROR2-A с клетками линии Calu-1.

10 Таким образом, chIgG1-ROR2-A представляло собой единственное антитело из панели химерных ROR2-специфических антител, для которого обнаружен высокий уровень связывания с ROR2-позитивными опухолевыми клетками. Установлено, что связывание является ROR2-специфическим.

Пример 4 – Связывание chIgG1-ROR2-A с CHO-клетками.

15 экспрессирующими перетасованные белки ROR1/2

Для исследования вовлечения ROR2-домена в связывание ROR2-специфического антитела А оценивали связывание chIgG1-ROR2-A с CHO-клетками, трансфектированными для кратковременной экспрессии следующих перетасованных вариантов Ig-подобного домена, CRD и kringle-домена ROR2 и ROR1:

- ROR112, содержащий Ig-подобный домен и CRD ROR1 и kringle-домен ROR2,
- ROR121, содержащий Ig-подобный домен ROR1, CRD ROR2 и kringle-домен ROR1,
- 25 • ROR122, содержащий Ig-подобный домен ROR1 и CRD- и kringle-домен ROR2,
- ROR211, содержащий Ig-подобный домен ROR2 и CRD- и kringle-домен ROR1,
- ROR221, содержащий Ig-подобный домен CRD ROR2 и kringle-домен ROR1.
- 30

Связывание оценивали с помощью проточной цитометрии, используя систему скрининга изображений клеток (систему многопараметрического анализа) (CellInsight, фирма Thermo Fisher) согласно рекомендациям

производителя. В целом, метод состоял в следующем: CHO-клетки, экспрессирующие перетасованные конструкции ROR112, ROR121, ROR122, ROR211 или ROR221 (3000 клеток/лунку в 384-луночных планшетах), инкубировали с антителом или контрольными образцами в течение 18 ч при 37°C/5% CO₂, промывали и инкубировали с меченым с помощью Alexa488 идентифицирующим антителом в течение 4 ч. Добавляли краситель Хехста и собирали флуоресцентные изображения, измеряя общую интенсивность пятна (RFU). Как продемонстрировано в таблице 5, chIgG1-ROR2-A связывалось с клетками, экспрессирующими ROR112 и ROR122, но не с клетками, экспрессирующими ROR121, ROR211 или ROR221. Это свидетельствует о том, что kingle-домен ROR2 участвует в связывании chIgG1-ROR2-A.

Таблица 5: Связывание chIgG1-ROR2-A с CHO-клетками, экспрессирующими перетасованные белки ROR1/2. «Да»: RFU превышает 12000; «нет»: RFU=0

Экспрессирующие CHO-клетки	ROR112	ROR121	ROR122	ROR211	ROR221
Связывание (да/нет)	Да	Нет	Да	Нет	Нет

15

Пример 5 – Гуманизация кроличьих химерных антител

Создание гуманизированных последовательностей антител

Гуманизированные последовательности антител, полученные из антитела chIgG1-ROR2-A, создавали на фирме Abzena (Кэмбридж, Великобритания). Гуманизированные последовательности антител создавали с помощью технологии гуманизации зародышевой линии (CDR-трансплантация). Гены гуманизированной V-области создавали на основе последовательностей человеческих зародышевых линий, являющихся наиболее близкими гомологами аминокислотных последовательностей VH и V_κ кроличьего антитела. Создавали серию из семи гуманизированных генов V-области зародышевой линии VH и четырех гуманизированных генов V-области зародышевой линии V_κ (VL) и обозначали в соответствии с приведенной ниже таблицей 6:

25

VH	VL
ROR2-A-HC1	ROR2-A-LC1
ROR2-A-HC2	ROR2-A-LC2
ROR2-A-HC3	ROR2-A-LC3
ROR2-A-HC4	ROR2-A-LC4

VH	VL
ROR2-A-NC5	
ROR2-A-NC6	
ROR2-A-NC7	

Структурные модели V-областей кроличьего антитела получали с использованием системы Swiss PDB и анализировали с целью идентификации аминокислот в каркасных участках V-области, которые могут иметь важное значение для связывающих свойств антитела. Эти аминокислоты отбирали для включения в один или несколько вариантов антител с трансплантированными CDR.

Аминокислотные последовательности V-области тяжелых и легких цепей сравнивали с базой данных последовательностей V- и J-сегментов человеческой зародышевой линии для идентификации последовательностей человеческих тяжелых и легких цепей с наибольшей степенью гомологии с целью применения их в качестве каркасных участков человеческих вариабельных доменов. Последовательности зародышевых линий, которые применяли в качестве основы в гуманизированных конструкциях, представлены в таблице 7.

15 Таблица 7: Наиболее близко совпадающие последовательности V-сегмента и J-сегмента человеческой зародышевой линии

Тяжелая цепь		Легкая цепь (κ)	
Сегмент V-области человеческой зародышевой линии	Сегмент J-области человеческой зародышевой линии	Сегмент V-области человеческой зародышевой линии	Сегмент J-области человеческой зародышевой линии
IGHV3-23*03	IGHJ2	IGKV1-39*01	IGKJ4

Затем создавали серию гуманизированных V-областей тяжелых и легких цепей путем трансплантации CDR в каркасные участки и при необходимости путем обратной мутации остатков, которые могут иметь решающее значение для связывающих свойств антитела, идентифицированных при структурном моделировании, на кроличьи остатки. Затем отбирали варианты последовательностей с наименьшим количеством потенциальных Т-клеточных эпитопов с использованием запатентованных фирмой Abzenas технологий *in silico*, iTope™ и TCED™ (T Cell Epitope Database (база данных Т-клеточных эпитопов) (Perry L.C.A, Jones T.D. и Baker M.P. New Approaches to Prediction of Immune Responses to Therapeutic Proteins during Preclinical Development. Drugs in

R&D 9 (6), 2008, сс. 385-396; Bryson C.J., Jones T.D. и Baker, M.P. Prediction of Immunogenicity of Therapeutic Proteins. *Biodrugs* 24 (1), 2010, сс.1-8). И, наконец, осуществляли оптимизацию кодонов в нуклеотидных последовательностях созданных вариантов.

5 Последовательности переменных областей гуманизованных антител к ROR2 представлены в таблице 1.

Полученные последовательности переменных участков тяжелой и легкой цепей синтезировали на основе генов, и каждую возможную комбинацию тяжелой и легкой цепей клонировали в экспрессионном векторе, включающем
10 тяжелую цепь человеческого IgG1 со следующими аминокислотными мутациями: L234F, L235E, D265A (FEA-мутации для подавления связывания FcγR и C1q; Engelberts и др., *EBioMedicine* 52, 2020, с. 102625) и K409R (R), которые в совокупности обозначают как FEAR, где номер аминокислотного положения соответствует Eu-нумерации (соответствует SEQ ID NO: 34), и в
15 экспрессионных векторах, включающих легкую человеческую каппа- или лямбда-цепь.

Пример 6 – Определение аффинности связывания ROR2 гуманизованных вариантов chIgG1-ROR2-A с использованием биослойной интерферометрии

Для определения аффинности гуманизованных вариантов chIgG1-ROR2-
20 А к человеческому ROR2 в сравнении с аффинностью кроличьей-человеческой химерной версии, применяли процедуру BLI, аналогичную описанной в примере 2, со следующими изменениями: предварительное кондиционирование АНС-сенсоров повторяли 2 раза, концентрация антитела составляла 1 мкг/мл, продолжительность измерения ассоциации составляла 1500 с,
25 продолжительность измерения диссоциации составляла 1500 с, и аналит (ROR2-ECD) использовали в качестве аналита в диапазоне концентраций 1,56-100нМ. Трассировку данных корректировали для каждого антитела путем вычитания среднего ответа эталонных сенсоров. Данные анализировали с использованием программного обеспечения для анализа данных, версия 9.0.0.12 (фирма
30 FortéBio), используя модель 1:1, и подгоняли с помощью глобальной модели полного соответствия с использованием времени ассоциации 1500 с и времени диссоциации 200 с.

В таблице 8 представлены константы скорости ассоциации k_a (1/Мс), константа скорости диссоциации k_d (1/с) и константа равновесия диссоциации K_D (М), характеризующие связывание с человеческим ROR2-ECD кроличьего-человеческого химерного антитела chIgG1-ROR2-A (с FEAR-мутациями в Fc) и гуманизированных вариантов указанного антитела.

Таблица 8: Аффинности связывания кроличьего-человеческого химерного антитела chIgG1-ROR2-A и гуманизированных вариантов указанного антитела с рекомбинантным человеческим ROR2-ECD (фирма G&P Biosciences), определенные с помощью биослойной интерферометрии без метки

Антитело	Константа скорости ассоциации k_a (1/Мс)	Константа скорости диссоциации k_d (1/с)	K_D (нМ)
chIgG1-ROR2-A-FEAR	7,2E+05	7,9E-04	1,1
IgG1-ROR2-A-HC1LC1-FEAR	5,9E+05	9,6E-04	1,6
IgG1-ROR2-A-HC1LC2-FEAR	5,9E+05	1,1E-03	1,9
IgG1-ROR2-A-HC1LC3-FEAR	5,5E+05	9,7E-04	1,8
IgG1-ROR2-A-HC1LC4-FEAR	5,6E+05	1,2E-03	2,0
IgG1-ROR2-A-HC2LC1-FEAR	5,1E+05	8,5E-04	1,7
IgG1-ROR2-A-HC2LC2-FEAR	5,1E+05	8,9E-04	1,8
IgG1-ROR2-A-HC2LC3-FEAR	4,9E+05	1,0E-03	2,0
IgG1-ROR2-A-HC2LC4-FEAR	5,1E+05	1,1E-03	2,2
IgG1-ROR2-A-HC3LC1-FEAR	5,5E+05	8,8E-04	1,6
IgG1-ROR2-A-HC3LC2-FEAR	5,6E+05	1,0E-03	1,8
IgG1-ROR2-A-HC3LC3-FEAR	5,5E+05	1,0E-03	1,8
IgG1-ROR2-A-HC3LC4-FEAR	5,8E+05	8,7E-04	1,5
IgG1-ROR2-A-HC4LC1-FEAR	5,4E+05	1,1E-03	2,1
IgG1-ROR2-A-HC4LC2-FEAR	5,9E+05	9,5E-04	1,6
IgG1-ROR2-A-HC4LC3-FEAR	6,0E+05	6,8E-04	1,1
IgG1-ROR2-A-HC4LC4-FEAR	6,2E+05	9,2E-04	1,5
IgG1-ROR2-A-HC5LC1-FEAR	5,4E+05	8,8E-04	1,6

Антитело	Константа скорости ассоциации k_a (1/Мс)	Константа скорости диссоциации k_d (1/с)	K_D (нМ)
IgG1-ROR2-A-HC5LC2-FEAR	5,5E+05	9,7E-04	1,8
IgG1-ROR2-A-HC5LC3-FEAR	5,1E+05	8,4E-04	1,7
IgG1-ROR2-A-HC5LC4-FEAR	5,5E+05	1,1E-03	1,9
IgG1-ROR2-A-HC6LC1-FEAR	5,6E+05	1,7E-03	3,1
IgG1-ROR2-A-HC6LC2-FEAR	5,6E+05	2,2E-03	3,9
IgG1-ROR2-A-HC6LC3-FEAR	5,6E+05	2,3E-03	4,0
IgG1-ROR2-A-HC6LC4-FEAR	5,7E+05	2,5E-03	4,4
IgG1-ROR2-A-HC7LC1-FEAR	5,4E+05	2,1E-03	3,8
IgG1-ROR2-A-HC7LC2-FEAR	5,4E+05	2,5E-03	4,7
IgG1-ROR2-A-HC7LC3-FEAR	5,5E+05	2,8E-03	5,1
IgG1-ROR2-A-HC7LC4-FEAR	5,7E+05	3,2E-03	5,6

Из указанных данных видно, что вариант IgG1-ROR2-HC4LC3 обладал аффинностью связывания, очень близкой к аффинности родительского антитела chIgG1-ROR2-A.

5 Пример 7 - Связывание гуманизированных вариантов chIgG1-ROR2-A с ROR2, экспрессируемым на клетках рака шейки матки линии HeLa

10 Связывание гуманизированных вариантов chIgG1-ROR2-A с ROR2, экспрессируемым на человеческих опухолевых клетках, определяли с помощью проточной цитометрии, используя экспрессирующие ROR2 клетки аденокарциномы шейки матки линии HeLa. На фиг. 1 продемонстрировано, что кроличье-человеческое химерное антитело chIgG1-ROR2-A-FEAR и все гуманизированные варианты указанного антитела, обладали зависящим от дозы связыванием с клетками HeLa.

15 Пример 8 – Гуманизированные антитела к CD3, применяемые для создания биспецифических антител CD3xROR2

Создание гуманизированного антитела IgG1-huCD3-H1L1 (последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей которого

представлены в настоящем описании в SEQ ID NO: 29 и 30) описано в примере 1 WO 2015/001085. В настоящем описании IgG1-huCD3-H1L1 обозначали как «IgG1-huCD3». Антитело IgG1-huCD3-H1L1-FEAL является его вариантом с тремя аминокислотными заменами в Fc-области (L234F, L235E, D265A; FEA),
5 помимо аминокислотной замены, которая обеспечивает создание биспецифических антител посредством контролируемого обмена Fab-плечей (F405L), что указано ниже в настоящем описании. Установлено, что такие мутации не влияют на связывание с мишенями антител, в которые они интродуцированы (см., например, WO 2014/108483 и Engelberts и др.,
10 EBioMedicine 52, 2020, с. 102625). Fc-области с мутациями FEA представляют собой инертные Fc-области, т.е. они не обладают способностью индуцировать опосредуемые Fc эффекторные функции антител посредством связывания с FcγR или C1q.

Создание гуманизированного антитела IgG1-huCD3-H1L1-H101G
15 (последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей которого представлены в настоящем описании в SEQ ID NO: 32 и 30) описано в примере 2 WO 2017/009442. IgG1-huCD3-H1L1-H101G можно обозначать как «IgG1-huCD3-H101G». Указанный вариант содержит замену H101G (IMGT-нумерация) в последовательности переменной области тяжелой цепи (ср. SEQ ID NO: 29 и
20 32) и имеет такую же легкую цепь, что и IgG1-huCD3-H1L1. Антитело IgG1-huCD3-H101G-FEAL является его вариантом с аминокислотными заменами L234F, L235E, D265A (FEA) и F405L (Eu-нумерация) в константной области.

Пример 9 – Определение аффинности связывания CD3 с использованием биослойной интерферометрии

25 Аффинности связывания IgG1-huCD3-FEAL и IgG1-huCD3-H101G-FEAL определяли согласно методу, описанному в примере 7 в WO 2017/009442.

В целом, метод состоял в следующем: аффинности связывания отобранных антител к CD3 в формате IgG1-huCD3-FEAL к рекомбинантному растворимому CD3ε (CD3E27-GSKa) (зрелый белок, имеющий SEQ ID NO:21) определяли с
30 использованием биослойной интерферометрии на устройстве ForteBio Octet HTX (фирма ForteBio). Биосенсоры для захвата античеловеческой Fc (фирма ForteBio, каталожный № 18-5060) загружали в течение 600 с hlgG (1 мкг/мл). После измерения исходного уровня (200 с) определяли ассоциацию (1000 с) и

диссоциацию (2000 с) CD3E27-GSKa, используя диапазон концентраций CD3E27-GSKa 27,11 мкг/мл-0,04 мкг/мл (1000нМ-1,4нМ), полученный с помощью стадий трехкратного разведения. Для расчетов использовали рассчитанную на основе аминокислотных последовательностей теоретическую молекулярную массу CD3E27-GSKa, т.е. 27,11 кДа. Эксперименты осуществляли при встряхивании при 1000 об/мин при 30°C. Каждое антитело тестировали по меньшей мере в двух независимых экспериментах.

Данные анализировали с помощью программного обеспечения для анализа данных, версия 8.1. (фирма FortéBio), используя модель 1:1, и подгоняли с помощью глобальной модели полного соответствия с использованием времени ассоциации 1000 с и времени диссоциации 100 с. Трассировку данных корректировали для каждого антитела путем вычитания эталонной кривой (антитело на биосенсоре, измерение с использованием только разбавителя для образцов), ось Y устанавливали на последние 10 с исходной линии и применяли межэтапную коррекцию, выравнивание по диссоциации и фильтрацию Савицкого-Голея. Данные с ответом <0,05 нм исключали из анализа.

В таблице 9 представлены константа скорости ассоциации k_a (1/Мс), константа скорости диссоциации k_d (1/с) и константа равновесия диссоциации K_D (М) для рекомбинантного CD3ε, определенные с помощью биослойной интерферометрии. Для IgG1-huCD3-FEAL обнаружена относительно высокая аффинность связывания (K_D : 15нМ) с рекомбинантным CD3ε по сравнению с IgG1-huCD3-H101G-FEAL (K_D : 683нМ).

Таблица 9: Аффинности связывания моноспецифических двухвалентных антител к CD3 с рекомбинантным CD3ε, при определении с помощью биослойной интерферометрии без метки

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

Пример 10 - Создание биспецифических антител с помощью индуцированного 2-МЕА обмена Fab-плечей

Биспецифические антитела создавали *in vitro*, используя технологию на основе платформы DuoBody® , т.е. индуцированный 2-МЕА обмен Fab-плечей,

описанную в WO 2011/131746 и WO 2013/060867 (фирма Genmab) и у Labriijn с соавторами (Labriijn и др., PNAS 110, 2013, сс. 5145-5150; Gramer и др., MAbs 5, 2013, сс. 962- 973). Для того, чтобы получать биспецифические антитела с помощью этого метода, создавали молекулы IgG1, несущие специфические точечные мутации в CH3-домене: в одном родительском антителе IgG1 мутацию F405L (т.е. в антителе к CD3 в настоящей заявке), в другом родительском антителе IgG1 мутацию K409R (т.е. в гуманизованном антителе IgG1-ROR2 или контрольном ВИЧ-1 gp120-специфическом антителе в настоящей заявке). Помимо этих мутаций оба родительских антитела IgG1 включали замены L234F, L235E, D265A (FEA).

Для создания биспецифических антител два родительских антитела смешивали в одинаковых массовых количествах в ЗФР-буфере (забуренный фосфатом физиологический раствор; 8,7мМ HPO_4^{2-} , 1,8мМ H_2PO_4^- , 163,9мМ Na^+ и 140,3мМ Cl^- , рН 7,4). Добавляли 2-меркаптоэтиламин-НСl (2-МЕА) до конечной концентрации 75мМ и реакционную смесь инкубировали при 31°C в течение 5 ч. 2-МЕА удаляли путем диализа в ЗФР-буфере, используя картриджи Slide-A-Lyzer (фирма Thermo Fisher Scientific) с номинально отсекаемой молекулярной массой 10 кДа в соответствии с протоколом производителя для обеспечения повторного окисления межцепочечных дисульфидных связей и образования неповрежденных биспецифических антител.

Указанные ниже антитела к ROR2, основой которых являлось химерное кроличье антитело chIgG1-ROR2-A, или гуманизированный вариант IgG1-ROR2-A-HC4LC3, применяли в качестве родительских антител для создания биспецифических антител в приведенных ниже примерах:

Антитела к ROR2

chIgG1-ROR2-A-FEAR (имеет последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6),

IgG1-ROR2-A-HC4LC3-FEAR (имеет последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 19).

Обозначение IgG1 свидетельствует о создании полноразмерных антитела IgG1-изотипа, а обозначение FEAR свидетельствует о том, что константные области тяжелых цепей содержат аминокислотные замены L234F, L235E, D265A

и F409R (SEQ ID NO: 34). Константные области легких цепей относятся к каппа-типу (SEQ ID NO: 36).

Антитела к CD3

5 Следующие антитела к CD3 применяли в качестве родительских антител для создания биспецифических антител в приведенных ниже примерах:

IgG1-huCD3-FEAL (имеет последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30),

IgG1-huCD3-H101G-FEAL (имеет последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 30).

10 Обозначение IgG1 свидетельствует о создании полноразмерных антител IgG1-изотипа, а обозначение FEAL свидетельствует о том, что константные области тяжелых цепей содержат аминокислотные замены L234F, L235E, D265A и F405L (SEQ ID NO: 35). Константные области легких цепей относятся к лямбда-типу (SEQ ID NO: 37).

15 Биспецифические антитела

Антитела к CD3 и ROR2, описанные выше, объединяли для создания биспецифических антител, имеющих одну антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с человеческим CD3, и одну антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с

20 человеческим ROR2, получения биспецифических антител изотипа IgG1, которые обозначали как bsIgG1.

bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR (имеет кроличье-человеческое химерное ROR2-связывающее плечо),

bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-HC4LC3-FEAR (имеет гуманизированное

25 ROR2-связывающее плечо),

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR

bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxROR2-A-HC4LC3-FEAR.

Кроме того, создавали биспецифические контрольные антитела, имеющие одну антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с

30 человеческим CD3, и одну антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с gp120 ВИЧ (полученную из антитела b12; Barbas C.F. и др., J Mol Biol. 230(3), 1993, сс. 812-823). Поскольку белок gp120 ВИЧ не присутствовал ни в одном из указанных в настоящем описании анализов, Fab-

плечо, связывающееся с ВИЧ gp120-специфической антигенсвязывающей областью рассматривалось как несвязывающееся контрольное плечо.

bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR (b12-плечо имеет последовательности VH и VL, представленные в SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48),

5 bsIgG1-huCD3-H1010G-FEALxb12-FEAR.

Пример 11 - Связывание моноспецифического антитела А к ROR2 и биспецифических антител CD3xROR2 с CHO-клетками, экспрессирующими ROR2 человека или обезьян циномоглус или вариант ROR2 обезьян циномоглус, несущий мутацию T322M

10 Сначала связывание биспецифических антител CD3xROR2 либо с huCD3, либо с huCD3-H101G в качестве CD3-связывающего плеча и моноспецифических антител к ROR2 с CHO-клетками, экспрессирующими человеческий ROR2 (но не человеческий CD3), определяли с помощью проточной цитометрии в целом согласно описанному выше методу, используя 3×10^4 трансфектированных клеток /лунку и концентрацию антител в диапазоне от 0,00013 до 10 мкг/мл.

15 Установлено, что связывание всех антител chIgG1-ROR2-A-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR с CHO-клетками, экспрессирующими
20 человеческий ROR2, находилось в близком диапазоне.

Далее определяли связывание биспецифических антител CD3xROR2 и моноспецифических антител к ROR2 с CHO-клетками, экспрессирующими ROR2 человека или обезьян циномоглус, используя 5×10^4 трансфектированных клеток /лунку и концентрацию антител в диапазоне от 0,01 до 10 мкг/мл. На фиг. 2
25 продемонстрировано, что bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR, chIgG1-ROR2-A-FEAR и IgG1-ROR2-A-NC4LC3-FEAR все связывались с человеческим ROR2, экспрессированном в CHO. Антитела chIgG1-ROR2-A-FEAR и IgG1-ROR2-A-NC4LC3-FEAR связывались также с ROR2 обезьян циномоглус, экспрессированном на CHO-
30 клетках, однако связывание биспецифических антител bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR оказалось более низким. Таким образом, в то время как моноклональные двухвалентные антитела к ROR2 эффективно связывались с ROR2 человека и

обезьян циномолгус, биспецифические антитела, содержащие один ROR2-специфический связывающий домен, обладали пониженной связывающей способностью с ROR2 обезьян циномолгус, но не с человеческим ROR2.

Как продемонстрировано выше, связывающий домен chIgG1-ROR2-A включал домен, связывающийся с kringle-доменом. Последовательность kringle-домена ROR2 человека и обезьян циномолгус отличается одним аминокислотным положением 322: T322 в ROR2 обезьян циномолгус и M322 в человеческом ROR2. Связывание chIgG1-ROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR с CHO-клетками, экспрессирующими человеческий ROR2 (SEQ ID NO: 1), ROR2 обезьян циномолгус (ROR2mf, SEQ ID NO: 39) или RORmf-T322M (SEQ ID NO: 41) определяли с помощью проточной цитометрии. На фиг. 3 продемонстрировано, что chIgG1-ROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR оба связывались с человеческим ROR2, однако связывание bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR с ROR2mf оказалось более низким по сравнению со связыванием chIgG1-ROR2-A-FEAR. Связывание bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR восстанавливалось до диапазона связывания chIgG1-ROR2-A-FEAR с CHO-клетками, экспрессирующими ROR2mf-T322M. Это свидетельствует о том, что остаток 322 зрелого человеческого белка ROR2 участвует в связывании chIgG1-ROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR.

В дополнительном эксперименте продемонстрировано, что bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR, bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-HC4LC3-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxROR2-A-HC4LC3-FEAR все обладали сопоставимым связыванием с RORmf-T322M (фиг. 4).

Таким образом, на основе описанных выше опытов, в которых осуществляли анализ связывания, результаты, полученные с использованием химерного варианта антитела ROR2-A (chIgG1-ROR2-A или chIgG1-ROR2-A-FEAR) или биспецифических антител, полученных из химерного варианта (bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR or bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR), применимы также к гуманизированному варианту этого антитела (IgG1-ROR2-A-HC4LC3-FEAR) или биспецифическим антителам, полученным из гуманизированного варианта (bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-

HC4LC3-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxROR2-A-HC4LC3-FEAR).

Таким образом, аминокислотный остаток M322 kringle-домена зрелого человеческого белка ROR2 (SEQ ID NO: 1) участвует в связывании этих ROR2-связывающих антител.

5 Пример 12 - Связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR с экспрессирующими ROR2 человеческими линиями опухолевых клеток

Определяли *in vitro* связывание bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR с экспрессирующими ROR2 человеческими линиями опухолевых клеток HeLa, LCLC103-H (крупноклеточный рак легкого; DSMZ, каталожный №. ACC-10 384), NCI-H1650 (аденокарцинома легкого; ATCC, каталожный №. CRL-5883), 786-O (почечно-клеточная аденокарцинома; ATCC, каталожный №. CRL-1932), NCI-H23 (аденокарцинома легкого; ATCC, каталожный №. CRL-5800) и ZR-75-1 (протоковая карцинома молочной железы; ATCC, каталожный №. CRL-1500). Уровни экспрессии ROR2 определяли с помощью количественной проточной 15 цитометрии (калибратор для человеческого IgG, фирма BioCytex) согласно инструкциям производителя, используя bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR для детекции ROR2. Связывание анализировали с помощью описанной выше проточной цитометрии, используя 3×10^4 опухолевых клеток /лунку и концентрации антител в диапазоне от 0,014 до 30 мкг/мл. Антитело bsIgG1- 20 huCD3-H1010G-FEALxb12-FEAR, которое обладает способностью связываться с CD3, но не с ROR2, применяли в качестве антитела, представляющего собой отрицательный контроль.

На фиг. 5 продемонстрировано, что bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR связывалось в зависимости от дозы с опухолевыми линиями клеток с 25 самой высокой способностью к связыванию, определенной по величине MFI (фиг. 5А), соответствующей самому высокому уровню экспрессии мишени по данным полуколичественной цитометрии (фиг. 5Б).

30 Пример 13 – Индукция опосредуемой Т-клетками цитотоксичности *in vitro* биспецифическими антителами CD3xROR2 в совместных культурах ROR2-позитивных опухолевых клеток (HeLa) и Т-клеток здорового донора при различных соотношениях эффектор:мишень

Для определения эффективности опосредуемого Т-клетками цитолиза опухолевых клеток в присутствии биспецифических антител CD3xROR2 bsIgG1-

huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR осуществляли анализ *in vitro* цитотоксичности с использованием ROR2-позитивных клеток HeLa в качестве клеток-мишеней (Т) и очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток (Е), используя различные соотношения эффекторных клеток и клеток-мишеней (Е:Т).

Т-клетки получали из лейкоцитарных пленок здоровых доноров (фирма Sanquin, Амстердам, Нидерланды) и очищали с использованием обогащенного человеческими Т-клетками коктейля RosetteSep™ (фирма Stemcell Technologies, Франция, каталожный № 15061) согласно инструкциям производителя. Клетки HeLa (16000 клеток/лунку) высевали в плоскодонные 96-луночные планшеты (фирма Greiner-bio-one, Нидерланды, каталожный № 655180) и выдерживали для прикрепления в течение 4 ч при 37°C. К опухолевым клеткам добавляли Т-клетки в соотношении Е:Т, составляющем 1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 12:1 или 16:1. Добавляли серийные разведения bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR, bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR или bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR (конечная концентрация в диапазоне от 10000 до 0,0005 нг/мл; 5-кратные разведения) и планшеты инкубировали в течение 72 ч при 37°C. Планшеты промывали 3 раза 3ФР и прикрепившиеся клетки инкубировали с добавленным из расчета 150 мкл/лунку 10% раствора alamarBlue® (фирма Invitrogen, каталожный № DAL1100) в течение 4 ч при 37°C для определения жизнеспособности опухолевых клеток. В качестве положительного контроля для анализа цитотоксичности клетки инкубировали с взятым в концентрации 16 мкг/мл оксидом фениларсина (РАО; фирма Sigma-Aldrich, каталожный № P3075; растворенным в диметилсульфоксиде [ДМСО; фирма Sigma-Adrich, каталожный № D2438]). Испускаемую AlamarBlue флуоресценцию в качестве меры метаболической активности культур опухолевых клеток и, следовательно, жизнеспособности опухолевых клеток, измеряли при 615 нм (ОП615) с помощью планшет-ридера EnVision (фирма PerkinElmer). Абсорбцию обработанных РАО образцов опухолевых клеток принимали за 0% жизнеспособности, а абсорбцию образцов необработанных опухолевых клеток принимали за 100% жизнеспособности. «Процент жизнеспособных клеток» рассчитывали следующим образом:

% жизнеспособных клеток= ([абсорбция образца – абсорбция обработанных РАО-клеток-мишеней]/[абсорбция необработанных клеток-мишеней – абсорбция обработанных РАО клеток-мишеней]) × 100.

5 Кривые дозовой зависимости и величины IC_{50} получали, используя анализ нелинейной регрессии (сигмоидная кривая доза-ответ с переменным наклоном), используя программное обеспечение GraphPad Prism V7.02 (фирма GraphPad Software, Сан-Диего, шт. Калифорния, США).

10 На фиг. 6 продемонстрировано, что зависящая от дозы опосредуемая Т-клетками цитотоксичность обнаружена при всех соотношениях Е:Т, при этом максимальный цитолиз опухолевых клеток (менее 10% жизнеспособных опухолевых клеток) обнаружен при соотношениях Е:Т, превышающих 2:1. В то время как максимальная цитотоксическая активность (<10% жизнеспособных опухолевых клеток) достигалась при использовании обоих вариантов bsAb, это имело место при более низких концентрациях bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-
15 FEAR по сравнению с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR. Биспецифическое контрольное антитело bsIgG1-huCD3-FEALxb12-FEAR, которое не связывается с CD3, но связывается с ROR2, не индуцировало опосредуемую Т-клетками цитотоксичность. Кроме того, не обнаружено опосредуемой Т-клетками цитотоксичности при применении ROR2-негативной
20 клеточной линии (HT-29; колоректальная аденокарцинома; ATCC, каталожный № HTB-38) в качестве клеток-мишеней (данные не представлены). Эти данные свидетельствуют о том, что bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR обладают способностью индуцировать опосредуемый Т-клетками цитолиз экспрессирующих ROR2 клеток Hela. В то
25 время как для bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR обнаружено действие при применении в более низких концентрациях по сравнению с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR, при применении обоих антител обнаружено достижение одинакового максимального цитотоксического действия при данном соотношении Е:Т.

Пример 14 – Индукция цитотоксичности *in vitro* в различных ROR2-
позитивных линиях опухолевых клеток биспецифическими антителами
CD3xROR2 в присутствии Т-клеток здорового донора

Опосредуемый Т-клетками цитолиз, индуцируемый биспецифическими
5 антителами bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-
FEALxchROR2-A-FEAR, различных экспрессирующих ROR2 линий опухолевых
клеток определяли с помощью описанного выше анализа *in vitro*
цитотоксичности, используя соотношение Е:Т 8:1. Использовали следующие
клеточные линии: HeLa, LCLC103-Н, NCI-H1650, 786-О, NCI-H23 и ZR-75-1 (см.
10 выше дополнительную информацию о линиях опухолевых клеток).

На фиг. 7 продемонстрировано, что оба антитела bsIgG1-huCD3-
FEALxchROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR
индуцировали в зависимости от дозы опосредуемую Т-клетками
цитотоксичность клеток HeLa, LCLC103-Н, NCI-H1650, 786-О, NCI-H23 и ZR-
15 75-1 *in vitro*. Цитолиз опухолевых клеток происходил при более низких
концентрациях bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR по сравнению с bsIgG1-
huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR (таблица 10), что свидетельствует о том,
что bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR является более эффективным в
отношении цитолиза опухолевых клеток, чем bsIgG1-huCD3-H101G-
20 FEALxchROR2-A-FEAR. Максимальный цитолиз опухолевых клеток оказался
сопоставимым при применении bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR и bsIgG1-
huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR. Не обнаружено корреляции между
степенью опосредуемой Т-клетками цитотоксичностью и уровнем экспрессии
ROR2 в клеточной линии (фиг. 8) при использовании панели клеточных линий,
25 также как и при использовании Т-клеток из различных доноров.

Таблица 10: Индукция цитотоксичности *in vitro* в различных линиях
опухолевых клеток биспецифическими антителами CD3xROR2 в присутствии Т-
клеток здорового донора: величины IC₅₀ представляют собой средние
геометрические IC₅₀, оцениваемые на основе кривых дозовой зависимости
30 (указано количество доноров)

Клеточная линия	bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A- FEAR		bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR	
	IC ₅₀ (мкг/мл)	Количество доноров (n)	IC ₅₀ (мкг/мл)	Количество доноров (n)
ZR-75-1 (рак молочной	0,424	2	0,003	2

Клеточная линия	bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR		bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR	
	IC ₅₀ (мкг/мл)	Количество доноров (n)	IC ₅₀ (мкг/мл)	Количество доноров (n)
железы)				
NCI-H23 (рак легкого)	0,580	4	0,013	3
786-О (рак почки)	0,088	4	0,003	4
NCI-H1650 (рак легкого)	0,693	3	0,006	3
LCLC-103H (крупноклеточный рак легкого)	0,511	5	0,011	7
HeLa (рак шейки матки)	0,424	6	0,002	6

Пример 15 – Индукция производства цитокинов *in vitro* биспецифическими антителами CD3xROR2 в присутствии ROR2-позитивных опухолевых клеток

Указанный эксперимент проводили для демонстрации того, что биспецифические антитела CD3xROR2, предлагаемые в изобретении, активируют Т-клетки и индуцируют производство цитокинов в присутствии ROR2-экспрессирующих клеток-мишеней.

Из лунок, которые инкубировали для изучения опосредуемой Т-клетками цитотоксичности в присутствии биспецифических антител CD3xROR2 в отношении клеток HeLa и 786-О согласно описанному выше методу, 150 мкл супернатанта переносили в 96-луночные культуральные планшеты с U-образным дном (фирма CellStar, каталожный № 650180) для определения уровня цитокинов. Планшеты центрифугировали (300 × g) в течение 3 мин при 4°C для удаления клеток, затем 75 мкл супернатанта переносили в новый планшет для измерения производства цитокинов с помощью мультиплексного ELISA с использованием U-plex платформы Mesoscale Discovery (фирма MeSo Scale Discovery, США, каталожный № K15049K).

Из 10 проанализированных цитокинов значительное повышение обнаружено в первую очередь для IFN-гамма, IL-6, IL-8 и IL-10 (>100 пг/мл). Уровни IL-4, IL-13, IL-1бета, IL-2, IL-12p70 и TNFальфа, как правило, были ниже 100 пг/мл. На фиг. 9А продемонстрированы уровни IL-6 в супернатанте совместных культур Т-клеток-опухолевых клеток с возрастающими концентрациями антител bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR, при использовании Т-клеток из 2 доноров и клеток 786-О в качестве опухолевых клеток. На фиг. 9Б

продемонстрированы уровни IFN-гамма, IL-6, IL-8 и IL-10 при применении антител в концентрациях, которые индуцировали опосредуемую Т-клетками цитотоксичность 50% и 90% опухолевых клеток (IC₅₀ и IC₉₀), при использовании клеток HeLa или 786-О в качестве опухолевых клеток. Уровни производства цитокинов варьировались в зависимости от донора и линии опухолевых клеток-мишеней. При концентрациях, соответствующих 50%-ной или 90%-ной цитотоксичности, уровни цитокинов оказались сопоставимыми для bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR. Данные демонстрируют, что оба антитела bsIgG1-huCD3-FEALxchROR2-A-
5 FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxchROR2-A-FEAR индуцировали производство цитокинов *in vitro* в присутствии ROR2-позитивных опухолевых клеток.

Пример 16 – Способность биспецифических антител CD3xROR2 индуцировать цитотоксическую активность и активацию Т-клеток обезьян циномоглус *in vitro* в присутствии ROR2-позитивных опухолевых клеток линии HeLa

Для оценки эффективности цитолиза опухолевых клеток мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) из обезьян циномоглус в присутствии биспецифических антител CD3xROR2 bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-NC4LC3-
20 FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR, осуществляли анализ *in vitro* цитотоксичности, используя, в целом, описанный выше метод с применением клеток HeLa в качестве клеток-мишеней при соотношении PBMC:клетки-мишени 8:1. PBMC обезьян циномоглус получали от фирмы Zen-Bio (США). Осуществляли анализ методом проточной цитометрии, если
25 установлено, что в популяции PMBC примерно 65% клеток представляли собой CD3⁺ (Т)-клетки. Создавали план эксперимента для подтверждения того, что биспецифические антитела CD3xROR2 обладают способностью активировать и вовлекать в процесс Т-клетки обезьян циномоглус в качестве эффекторных клеток, и, как следствие, того, что обезьян циномоглус можно рассматривать в
30 качестве релевантного вида для оценки (доклинической) безопасности биспецифических антител, предлагаемых в изобретении.

Для оценки Т-клеточной активации 150 мкл супернатанта переносили в 96-лучночные планшета после инкубации в течение 72 ч и центрифугировали.

Клетки окрашивали для обнаружения Т-клеточных маркеров CD3 (1:100; фирма Miltenyi Biotech, клон 10D12, конъюгированный с APC; каталожный № 130-091-998), CD4 (1:50; фирма eBioscience, клон ОКТ4, конъюгированный с APC-Cy7; каталожный № 47-0048-42), CD8 (1:100; фирма Biolegend, клон RPA-T8, конъюгированный с AF700; каталожный № 301028) и маркеров Т-клеточной активации CD69 (1:50; фирма BD Biosciences, клон FN50, конъюгированный FITC; каталожный № 555530), CD25 (1:100; фирма eBioscience, клон BC96, конъюгированный с PE-Cy7; каталожный № 25-0259-42) и CD279/PD1 (1:50; фирма Biolegend, клон EH12.2H7, конъюгированный с BV605; каталожный № 340560). В опыт включали каждый из окрашенных образцов с гранулами Ultracom (5 мкл; фирма Invitrogen, каталожный № 01-2222-42), которые использовали для компенсационной настройки проточного цитометра. После инкубации в течение 30 мин при 4°C планшеты промывали трижды 3ФР/0,1% БСА/0,02% азида (буфер для окрашивания). Клетки ресуспендировали в 80 мкл буфера для окрашивания и анализировали с помощью устройства FACS Fortessa (фирма BD Biosciences). Данные обрабатывали, используя FlowJo (фирма BD Biosciences).

На фиг. 10 продемонстрировано, что и bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR, и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR индуцировали в зависимости от дозы индуцированный РВМС обезьян циномолгус цитолиз опухолевых клеток, экспрессирующих человеческий ROR2, при этом, цитолиз имел место при более низких концентрациях bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR по сравнению с bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR.

На фиг. 11 представлены данные об активации Т-клеток в популяции РМВС обезьян циномолгус в присутствии bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR или bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR и клеток HeLa, полученные при оценке экспрессии маркеров активации CD69, CD25 и PD-1 на CD8+ Т-клетках (определение с помощью проточной цитометрии). Примерно 80% (при применении антител в самых высоких концентрациях) CD8+ Т-клеток активировались и экспрессировали CD69 и CD25 в присутствии либо bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR, либо bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR, и примерно 40% CD8+ Т-клеток экспрессировали PD-1.

Активация Т-клеток, индуцированная bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR, происходила при более низких концентрациях по сравнению с активацией, индуцированной bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR. Эти результаты свидетельствуют о том, что bsIgG1-huCD3-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR и bsIgG1-huCD3-H101G-FEALxROR2-A-NC4LC3-FEAR обладали способностью вовлекать в процесс Т-клетки обезьян циномогус в качестве эффекторных клеток и активировать Т-клетки.

Пример 17 – Экспрессия ROR2 при различных видах рака у человека

Данные об уровнях мРНК ROR2 получали из базы данных Omicsoft TCGA и визуализировали с помощью программного обеспечения Oncoland (фирма Qiagen, США).

На фиг. 12 представлены результаты оценки уровней экспрессии мРНК ROR2 в отобранных первичных солидных опухолях, ранжированные в соответствии с медианой экспрессии. Уровни экспрессии мРНК варьировались в зависимости от каждого вида, при этом самая высокая медиана экспрессии обнаружена при саркоме, раке матки, поджелудочной железы, молочной железы и яичников, а также при плоскоклеточном раке легких.

Уровень экспрессии ROR2 при фибросаркоме, желудочно-кишечной стромальной опухоли (GIST), лейомиосаркоме, рабдомиосаркоме, липосаркоме, аденокарциноме яичника (серозно-сосочковая), эндометриоидной карциноме, плоскоклеточной саркоме легкого, аденокарциноме легкого, раке поджелудочной железы, светлоклеточной карциноме, переходноклеточной карциноме и аденокарциноме ободочной кишки анализировали с помощью иммуногистохимии (ИГХ) на иммуногистостейнере Leica Bond RX с использованием реагентов Leica Bond на тканевых матрицах (tissue microarrays) (ТМА; которые покупали у фирмы BioMax). Перед окрашиванием свежесрезанные срезы ТМА (5 мкм) депарафинизировали и инкубировали с раствором для извлечения мишени ER2. ИГХ ROR2 осуществляли с использованием антитела к мышиному ROR2 (клон ROR2 2535-2835, фирма QED Bioscience, каталожный № 34045) в конечной концентрации 10 мкг/мл. Затем срезы промывали и инкубировали с козым антимышиным IgG-HRP. HRP визуализировали с помощью усовершенствованной системы на основе хромогенного субстрата DAB (диаминобензидин). Гематоксилин применяли для

детекции клеток с ядрами. Окрашенные срезы ТМА оцифровывали при 20-кратном увеличении на слайд-сканере AxioScan (фирма Zeiss).

Интенсивность окрашивания ROR2 и процент ROR2-позитивных клеток определял и количественно оценивал сертифицированный патологоанатом.

5 Интенсивность окрашивания оценивали как отрицательная (0), слабая (1), умеренная (2) или сильная (3), и определяли процент клеток с окрашиванием в диапазоне 0-100% с шагом 10%. Исходя из интенсивности окрашивания и процентного содержания положительных клеток, гистологический балл (H-балл) определяли в соответствии с формулой:

10
$$\text{H-балл} = (0 \times [\% \text{ клеток с интенсивностью } 0]) + 1 \times [\% \text{ клеток с интенсивностью } 1+] + 2 \times [\% \text{ клеток с интенсивностью } 2+] + 3 \times [\% \text{ клеток с интенсивностью } 3+]$$
.

15 В таблице 11 представлены данные об экспрессии белка ROR2 (распространенность и H-балл), определенные с помощью ИГХ-анализа ТМА фирмы BioMax. Экспрессия ROR2 варьировалась в зависимости от вида рака. Самые высокие показатели распространенности и H-баллы ROR2 обнаружены при саркомах, GIST, раке яичников и эндометриоидном раке.

Таблица 11. Экспрессия белка ROR2 (распространенность и H-балл), определенная с помощью ИГХ-анализа ТМА фирмы BioMax

Тип опухоли	Распространенность ROR2 (% ROR2-позитивных биопсий опухолей на один вид рака)	Средний H-балл ROR2
Фибросаркома (n=20)	100%	97
GIST (n=79)	97%	147
Лейомиосаркома (n=92)	93%	86
Рабдомиосаркома (n=19)	79%	65
Липосаркома (n=17)	53%	16
Аденокарцинома яичника серозно-сосочковая (n=28)	67%	11
Эндометриоидная саркома (n=59)	64%	32
Плоскоклеточная саркома легкого (n=81)	38%	15
Аденокарцинома легкого (n=69)	25%	3
Рак поджелудочной железы (n=85)	30%	6

Тип опухоли	Распространенность ROR2 (% ROR2-позитивных биопсий опухолей на один вид рака)	Средний H-балл ROR2
Светлоклеточный карцинома (n=74)	15%	4
Переходноклеточная карцинома (n=17)	29%	11
Аденокарцинома ободочной кишки (n=58)	26%	5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, содержащее по меньшей мере одну антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с человеческим ROR2, где
5 указанное антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно.

10

2. Антитело по п. 1, где указанное антитело содержит две антигенсвязывающие области, которые обладают способностью связываться с человеческим ROR2, где указанное антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи (VL), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно.

15

3. Антитело по одному из п. 1 или п. 2, где указанное антитело получено
20 путем гуманизации из антитела, которое содержит VH-область, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и/или VL-область, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

20

4. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где указанное антитело
25 содержит VH-область, которая имеет последовательность, выбранную из группы, которая содержит:

25

- а. VH-область, представленную в SEQ ID NO: 10 (HC1);
- б. VH-область, представленную в SEQ ID NO: 11 (HC2);
- в. VH-область, представленную в SEQ ID NO: 12 (HC3);
- 30 г. VH-область, представленную в SEQ ID NO: 13 (HC4);
- д. VH-область, представленную в SEQ ID NO: 14 (HC5);
- е. VH-область, представленную в SEQ ID NO: 15 (HC6);
- ж. VH-область, представленную в SEQ ID NO: 16 (HC7) или

30

з. VH-область, последовательность которой по меньшей мере на 90% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

5 5. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где указанное антитело содержит VH-область, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

10 6. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где указанное антитело содержит VL-область, которая имеет последовательность, выбранную из группы, которая содержит:

а. VL-область, представленную в SEQ ID NO: 17 (LC1);

б. VL-область, представленную в SEQ ID NO: 18 (LC2);

в. VL-область, представленную в SEQ ID NO: 19 (LC3);

15 г. VL-область, представленную в SEQ ID NO: 20 (LC4); или

д. VL- область, последовательность которой по меньшей мере на 90% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 17, 18, 19 или 20.

20 7. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где указанное антитело содержит VL-область, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19.

25 8. А антитело по одному из предыдущих пунктов, где указанное антитело содержит VH- и VL-области, которые имеют последовательности, выбранные из группы, которая содержит:

а. VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 10, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 17;

б. VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 10, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 18;

30 в. VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 10, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 19;

г. VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 10, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 20;

х. VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 15, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 17;

ц. VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 15, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 18;

5 ч. VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 15, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 19;

ш. VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 15, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 20;

10 щ. VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 16, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 17;

э. VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 16, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 18;

а.а. VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 16, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 19; и

15 б.б. VH-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 16, и VL-область, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 20.

9. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где указанное антитело содержит VH- и VL-области, которые имеют последовательности SEQ ID NO: 13 и 19.

10. Антитело по одному из предыдущих пунктов, в котором VH- и VL-области гуманизированы.

25 11. Антитело по одному из предыдущих пунктов, в котором константная область тяжелой цепи представляет собой константную область человеческого IgG1.

30 12. Антитело по одному из предыдущих пунктов, в котором константная область легкой цепи представляет собой константную область человеческой каппа-цепи.

13. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело представляет собой полноразмерное антитело, такое как полноразмерное антитело изотипа IgG1.

5 14. Антитело по одному из предыдущих пунктов, представляющее собой одновалентное антитело.

15. Антитело по одному из предыдущих пунктов, представляющее собой двухвалентное антитело.

10 16. Антитело по одному из предыдущих пунктов, представляющее собой моноспецифическое антитело.

15 17. Антитело по одному из предыдущих пунктов, представляющее собой биспецифическое антитело.

18. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где указанный человеческий ROR2 представляет собой человеческий ROR2, имеющий SEQ ID NO: 1.

20 19. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело обладает способностью связываться с Kringle-доменом человеческого ROR2.

25 20. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где указанное антитело связывается с эпитопом или связывающей антитело областью на человеческом ROR2, который/которая включает аминокислотный остаток в положении 322 человеческого ROR2, а его нумерация соответствует положению в SEQ ID NO: 1.

30 21. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где указанное антитело обладает способностью связываться с внеклеточным доменом человеческого ROR2 с аффинностью связывания, которая соответствует величине KD, составляющей 100нМ или менее, такой как 50нМ или менее, 10нМ или менее, 6нМ или менее или такой как 3нМ или менее, например с аффинностью

связывания, которая соответствует величине KD , находящейся в диапазоне от 100нМ до 0,1нМ, например, в диапазоне от 100нМ до 1нМ, таком как от 50нМ до 1нМ, таком как менее чем примерно 2,5нМ или менее чем примерно 2,0нМ или менее чем примерно 1,5нМ, таком как примерно 1,1нМ.

5

22. Антитело по п. 21, аффинность связывания которого определяют с помощью биослойной интерферометрии, необязательно изложенной в пример 6 в настоящем описании.

10 23. Антитело по одному из п.п. 21 и 22, аффинность связывания которого определяют с помощью биослойной интерферометрии, которая включает следующие стадии:

а. иммобилизация антитела в количестве 1 мкг/мл в течение 600 с на биосенсоре для захвата содержащего Fc-область античеловеческого IgG;

15 б. определение ассоциации в течение периода времени, составляющего 1500 с, и диссоциации в течение периода времени, составляющего 1500 с, ROR2ECD-His, используя 2-кратные серийные разведения в диапазоне от 100нМ до 1,56нМ;

в. сравнение с данными для содержащего только буфер контроля (0нМ).

20

24. Антитело по одному из п.п. 21- 23, аффинность связывания которого определяют с использованием антитела, указанного в одном из предыдущих пунктов, которое представляет собой моноспецифическое двухвалентное антитело, такое как антитело, представляющее собой полноразмерный IgG1.

25

25. Антитело, содержащее первую антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с человеческим ROR2, указанную в одном из предыдущих пунктов, и содержащее вторую антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с другой мишенью.

30

26. Антитело по п. 25, в котором вторая антигенсвязывающая область обладает способностью связываться с человеческим CD3, таким как

человеческий CD3ε (эпсилон), таким как человеческий CD3ε (эпсилон),
представленный в SEQ ID NO: 21.

5 27. Антитело по п. 25 или п. 26, представляющее собой биспецифическое
антитело.

28. Антитело по п. 26 или п. 27, в котором антигенсвязывающая область,
которая связывается с CD3, содержит

10 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550 2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 2576 2577 2578 2579 2580 2581 2582 2583 2584 2585 2586 2587 2588 2589 2590 2591 2592 2593 2594 2595 2596 2597 2598 2599 2600 2601 2602 2603 2604 2605 2606 2607 2608 2609 2610 2611 2612 2613 2614 2615 2616 2617 2618 2619 2620 2621 2622 2623 2624 2625 2626 2627 2628 2629 2630 2631 2632 2633 2634 2635 2636 2637 2638 2639 2640 2641 2642 26

97% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29; и

б. необязательно вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность SEQ ID NO: 30, или последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30.

31. Антитело по одному из п.п. 26-30, в котором антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит

а. вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую последовательность SEQ ID NO: 29, и

б. вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую последовательность SEQ ID NO: 30.

32. Антитело по одному из п.п. 25-30, где указанное антитело обладает меньшей аффинностью связывания с человеческим CD3ε, чем антитело, которое имеет антигенсвязывающую область, содержащую последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 29, и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 30, предпочтительно указанная аффинность ниже по меньшей мере в 5 раз, например, ниже по меньшей мере в 10 раз, например, ниже по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере ниже в 30 раз, по меньшей мере ниже в 40 раз, по меньшей мере ниже в 45 раз или, например, по меньшей мере ниже в 50 раз, например, по меньшей мере ниже в 54 раза.

33. Антитело по одному из п.п. 26-32, в котором связывание указанной антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3, характеризуется величиной константы равновесия диссоциации KD, находящейся в диапазоне 200 – 1000нМ, например, в диапазоне 300 – 1000нМ, в диапазоне 400 – 1000нМ, в диапазоне 500 – 1000нМ, в диапазоне 300 – 900нМ, в диапазоне 400 – 900нМ, в диапазоне 400 – 700нМ, в диапазоне 500 – 900нМ, в диапазоне 500 – 800нМ, в диапазоне 500 – 700нМ, в диапазоне 600 – 1000нМ, в диапазоне 600 – 900нМ, в диапазоне 600 – 800нМ или, например, в диапазоне 600 – 700нМ.

34. Антитело по одному из п.п. 26-31, в котором связывание указанной антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3, характеризуется величиной константы равновесия диссоциации KD, находящейся в диапазоне 1 – 100нМ, например, в диапазоне 5–100нМ, в диапазоне 10 – 100нМ, в диапазоне 1 – 80нМ, в диапазоне 1 – 60нМ, в диапазоне 1 – 40нМ, в диапазоне 1 – 20нМ, в диапазоне 5 – 80нМ, в диапазоне 5 – 60нМ, в диапазоне 5 – 40нМ, в диапазоне 5 – 20нМ, в диапазоне 10 – 80нМ, в диапазоне 10 – 60нМ, в диапазоне 10 – 40нМ или, например, в диапазоне 10 – 20нМ.

10

35. Антитело по одному из п.п. 26-34, в котором антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит последовательность CDR1, последовательность CDR2 и последовательность CDR3,

15

вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая по сравнению с вариабельной областью тяжелой цепи (VH), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, имеет аминокислотную замену в одной из последовательностей CDR, где замена находится в положении, выбранном из группы, которая состоит из: T31, N57, H101, G105, S110 и Y114, где нумерация положений соответствует последовательности SEQ ID NO: 29; и

20

вариабельную область легкой цепи (VL) дикого типа, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 27, GTN и SEQ ID NO: 28 соответственно.

25

36. Антитело по одному из п.п. 26-35, в котором CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) антигенсвязывающей области, которая связывается с CD3, содержат, в целом максимум 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен по сравнению с CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29.

30

37. Антитело по одному из п.п. 26-35, в котором антигенсвязывающая область, которая связывается с CD3, содержит мутацию в VH-области, выбранную из группы, которая состоит из: T31M, T31P, N57E, H101G, H101N, G105P, S110A, S110G, Y114M, Y114R, Y114V.

5

38. Антитело по одному из п.п. 25-36, в котором антигенсвязывающая область, обладающая способностью связываться с CD3, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 31 соответственно, и переменную область легкой цепи (VL), которая содержит CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO: 27, в последовательности GTN и в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28 соответственно.

10

15

39. Антитело по одному из п.п. 26, 27, 29-38, в котором антигенсвязывающая область, обладающая способностью связываться с CD3, включает переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, переменную область легкой цепи (VL), которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

20

40. Антитело по одному из предыдущих пунктов, представляющее собой биспецифическое антитело, которое содержит первую антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с человеческим ROR2, и вторую связывающую область, обладающую способностью связываться с человеческим CD3, в котором указанная первая антигенсвязывающая область содержит:

25

CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3, 4 и 5 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области легкой цепи (VL), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;

30

и указанная вторая антигенсвязывающая область содержит:

CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно; [анти-CD3 (SP34/гуманизированное антитело SP34, WO 2015/001085 (фирма Genmab)) –последовательности CDR VH], и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи (VL), которые имеют последовательности SEQ ID NO: 27, GTN и 28 соответственно.

41. Антитело по одному из предыдущих пунктов, представляющее собой биспецифическое антитело, которое содержит первую антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с человеческим ROR2, и вторую связывающую область, обладающую способностью связываться с человеческим CD3, в котором указанная первая антигенсвязывающая область содержит:

CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3 , 4 и 5 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи (VL), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9 соответственно;

и указанная вторая антигенсвязывающая область содержит:

CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 23, 24 и 31 соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи (VL), которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 27, в последовательности GTN и в последовательности, представленной в SEQ ID NO: 28 соответственно.

42. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где указанное антитело содержит первую антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с человеческим ROR2, и вторую антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с человеческим CD3, в котором указанная первая антигенсвязывающая область содержит VH-область, которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и VL-область, которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и

указанная вторая антигенсвязывающая область содержит VH-область, которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, и VL-область, которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

5 43. Антитело по одному из п.п. 1-30, 32, 33, 35-39 и 41, где указанное антитело содержит первую антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с человеческим ROR2, и вторую антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с человеческим CD3, в котором указанная первая антигенсвязывающая область
10 содержит VH-область, которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и VL-область, которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, и указанная вторая антигенсвязывающая область содержит VH-область, которая содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и VL-область, которая содержит
15 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

44. Антитело по одному из предыдущих пунктов, в котором

а) антигенсвязывающая(ие) область(и), обладающая(ие) способностью связываться с ROR2, является(ются) гуманизированной(ими), и/или

20 б) антигенсвязывающая область, обладающая способностью связываться с CD3, если присутствует, является гуманизированной.

45. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где указанное антитело содержит константные области первой и второй тяжелых цепей, каждая из
25 указанных константных областей первой и второй тяжелых цепей содержит по меньшей мере шарнирную область, CH2- и CH3-участки, причем в указанной константной области первой тяжелой цепи по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, которая состоит из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409, в
30 тяжелой цепи человеческого IgG1, заменена, и в указанной константной области второй тяжелой цепи по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным их группы, которая состоит из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409, в тяжелой цепи человеческого IgG1,

заменена, в котором указанные замены в указанных первой и второй тяжелых цепях не находятся в одинаковых положениях и в котором аминокислотные положения в константных областях пронумерованы согласно Eu-нумерации.

5 46. Антитело по одному из предыдущих пунктов, в котором в указанной первой тяжелой цепи аминокислота в положении, соответствующем K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляет собой R, и аминокислота в указанной второй тяжелой цепи в положении, соответствующем F405 в тяжелой цепи человеческого IgG1, представляет собой L, или наоборот.

10 47. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где указанное антитело содержит первую и вторую тяжелые цепи и в котором первая и вторая тяжелые цепи модифицированы таким образом, чтобы антитело индуцировало опосредуемую Fc эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с
15 идентичным немодифицированным антителом.

 48. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело содержит первую и вторую тяжелые цепи и в котором в константной области и первой, и второй тяжелой цепи аминокислотные остатки в положениях, соответствующих
20 положениям L234 и L235 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно Eu-нумерации, представляют собой F и E соответственно.

 49. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело содержит первую и вторую тяжелые цепи и в котором в константной области и первой, и
25 второй тяжелой цепи аминокислотный остаток в положении, соответствующем положению D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно Eu-нумерации, представляет собой A.

 50. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело содержит
30 первую и вторую тяжелые цепи и в котором в константной области и первой, и второй тяжелой цепи аминокислотные остатки в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно Eu-нумерации, представляют собой F, E и A соответственно.

51. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело содержит первую и вторую тяжелые цепи и в котором в константной области и первой, и второй тяжелой цепи аминокислотные остатки в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи человеческого IgG1 согласно Eу-нумерации, представляют собой F, E и A соответственно, и в котором константная область первой тяжелой цепи дополнительно содержит замену K409R и константная область второй тяжелой цепи дополнительно содержит замену F405L.

10

52. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело содержит константные области первой и второй тяжелых цепей, которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 34 и 35 соответственно, константные области первой и второй тяжелых цепей, которые имеют последовательности, представленные в SEQ ID NO: 35 и 34 соответственно.

15

53. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело представляет собой биспецифическое антитело, обладающее способностью связываться с человеческим ROR2 и человеческим CD3 эпсилон, в котором

20 а. первое связывающее плечо, которое связывается с ROR2, содержит:

I. VH-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13,

II. VL-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19,

25 III. константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 (FEAR), и

IV. константную область человеческой легкой каппа-цепи; и

б. второе связывающееся плечо, которое связывается с CD3-эпсилон, содержит:

30 I. VH-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29,

II. VL-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30,

III. константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 (FEAL), и

IV. константную область человеческой легкой лямбда-цепи.

5 54. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где антитело представляет собой биспецифическое антитело, обладающее способностью связываться с человеческим ROR2 и человеческим CD3 эпсилон, в котором

а. первое связывающее плечо, которое связывается с ROR2, содержит:

10 I. VH-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13,

II. VL-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19,

III. константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 (FEAR), и

15 IV. константную область человеческой легкой каппа-цепи; и

б. второе связывающееся плечо, которое связывается с CD3-эпсилон, содержит:

I. VH-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32,

20 II. VL-область, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30,

III. константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 (FEAL), и

IV. константную область человеческой легкой лямбда-цепи.

25 55. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где указанное антитело содержит легкую лямбда (λ)-цепь.

30 56. Антитело по одному из предыдущих пунктов, где указанное антитело:
а. обладает способностью связываться с экспрессирующими ROR2 человеческими опухолевыми клетками, такими как клетки HeLa, LCLC103-H, NCI-H1650, 786-O, NCI-H23 или ZR-75-1, что указано в примерах 6 и 10 в настоящем описании,

б. обладает способностью опосредовать в зависимости от концентрации цитотоксичность в отношении клеток HeLa при использовании очищенных РВМС или Т-клеток в качестве эффекторных клеток, например, при использовании анализов, указанных в примере 11 или 12 в настоящем описании,

5 в. обладает способностью опосредовать в зависимости от концентрации цитотоксичность в отношении клеток 786-О, LCLC-103Н, NCI-H23, NCH-H1650 или ZR-75-1 при использовании очищенных РВМС или Т-клеток в качестве эффекторных клеток, например, при использовании анализов, указанных в примере 12 в настоящем описании,

10 г. обладает способностью активировать Т-клетки *in vitro* в присутствии опухолевых клеток HeLa, 786-О, LCLC-103Н, NCI-H23, NCH-H1650; например, при использовании анализов, указанных в примере 14 в настоящем описании, и/или

15 д. обладает способностью индуцировать производство Т-клеточных цитокинов при использовании опухолевых клеток, таких как клетки HeLa и 786-О, в качестве клеток-мишеней, например, при использовании анализов, указанных в примере 13 в настоящем описании.

57. Композиция, содержащая антитело по одному из п.п. 1-56.

20

58. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по одному из п.п. 1-56 и фармацевтически приемлемый носитель.

25 59. Антитело по одному из п.п. 1-56, предназначенное для применения в качестве лекарственного средства.

60. Антитело для применения в качестве лекарственного средства по п. 59, предназначенное для лечения заболевания.

30 61. Антитело для применения в качестве лекарственного средства по п. 60, где заболевание представляет собой рак.

62. Антитело для применения в качестве лекарственного средства по п. 61, где рак отличается экспрессией ROR2 на поверхности раковых клеток.

5 63. Антитело для применения в качестве лекарственного средства по п. 62, где указанную экспрессию ROR2 определяют в раковых клетках, полученных из организма пациента.

10 64. Антитело для применения в качестве лекарственного средства по одному из п.п. 61-63, где рак представляет собой солидную опухоль.

15 65. Антитело для применения по одному из п.п. 61-64, где рак выбирают из группы, включающей саркомы, фибросаркому, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, липосаркому, рак матки, рак легких, рак поджелудочной железы, рак почек, колоректальный рак, рак шейки матки и рак молочной железы.

20 66. Способ лечения заболевания, где способ включает введение антитела по одному из п.п. 1-56, композиции по п. 57 или фармацевтической композиции по п. 58 субъекту, который нуждается в этом.

67. Способ по п. 66, где указанный способ предназначен для лечения рака.

25 68. Способ по п. 67, в котором рак выбирают из группы, включающей саркомы, фибросаркому, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, липосаркому, рак матки, рак легких, рак поджелудочной железы, рак почек, колоректальный рак, рак шейки матки и рак молочной железы.

30 69. Нуклеиновая кислота, содержащая
а. нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность
вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающей области, которая
обладает способностью связываться с ROR2 по одному из п.п. 1-5, 8 и 9, и/или

б. нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность
вариабельной области соответствующей легкой цепи антигенсвязывающей
области, которая обладает способностью связываться с ROR2 по одному из п.п.
1-3 и 6-9.

5

70. Одна или несколько нуклеиновых кислот, содержащих

а. нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность
тяжелой цепи антитела, которая содержит антигенсвязывающую область,
обладающую способностью связываться с ROR2, по п. 9,

10

б. нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность
соответствующей легкой цепи антитела, которая содержит антигенсвязывающую
область, обладающую способностью связываться с ROR2 по п. 9.

71. Одна или несколько нуклеиновых кислот, содержащих

15

а. нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность
тяжелой цепи антитела, которая содержит антигенсвязывающую область,
обладающую способностью связываться с ROR2, представленную в SEQ ID NO:
13, и/или

20

б. нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность
легкой цепи антитела, которая содержит антигенсвязывающую область,
обладающую способностью связываться с ROR2, представленную в SEQ ID NO:
19

25

72. Нуклеиновая кислота или одна или несколько нуклеиновых кислот по
одному из п.п. 69-71, где указанная нуклеиновая кислота представляет собой
РНК или ДНК.

30

73. Нуклеиновая кислота или одна или несколько нуклеиновых кислот по
одному из п.п. 69-72, предназначенная(ые) для применения для экспрессии в
клетках млекопитающих.

74. Экспрессионный вектор, содержащий

а) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, которая содержит антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с ROR2, по одному из п.п. 69-73, и/или

5 б) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, которая содержит антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с ROR2, по одному из п.п. 69-73.

75. Экспрессионный вектор по п. 74, дополнительно содержащий

10 а) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, которая содержит антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с CD3, по одному из п.п. 28-31 и 35-39; и/или

15 б) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, которая содержит антигенсвязывающую область, обладающую способностью связываться с CD3, по одному из п.п. 28-31 и 35-39.

20 76. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту или содержащая одну или несколько нуклеиновых кислот по одному из п.п. 69-73 или экспрессионный вектор по п. 74 или п. 75.

25 77. Клетка по п. 76, где указанная клетка имеет происхождения из организма человека, например, представляет собой клетку почки человеческого эмбриона (НЕК-клетка), или имеет происхождение из организма грызунов, например, представляет собой клетку яичника китайского хомячка (СНО-клетка).

30 78. Способ получения антитела, которое обладает способностью связываться и с ROR2, и с CD3, по одному из п.п. 1-56, включающий стадии на которых

а. получают антитело, которое обладает способностью связываться с ROR2, где указанное антитело содержит антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с ROR2 по одному из п.п. 1-56;

б. получают антитело, которое обладает способностью связываться с CD3, где указанное антитело содержит антигенсвязывающую область, которая обладает способностью связываться с CD3 по одному из п.п. 26-56;

5 в. инкубируют указанное антитело, которое обладает способностью связываться с ROR2, вместе с указанным антителом, которое обладает способностью связываться с CD3, в восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы цистеины в шарнирной области подвергались изомеризации дисульфидной связи, и

10 г. получают указанное антитело, обладающее способностью связываться с ROR2 и CD3.

79. Способ получения антитела, которое обладает способностью связываться и с ROR2, и с CD3 по п. 78, в котором стадии а) и/или б) включают:

15 получение клеток, содержащих экспрессионные векторы для получения указанного антитела или указанных антител; и

обеспечение клеткам возможности продуцировать указанное антитело или указанные антитела, и затем

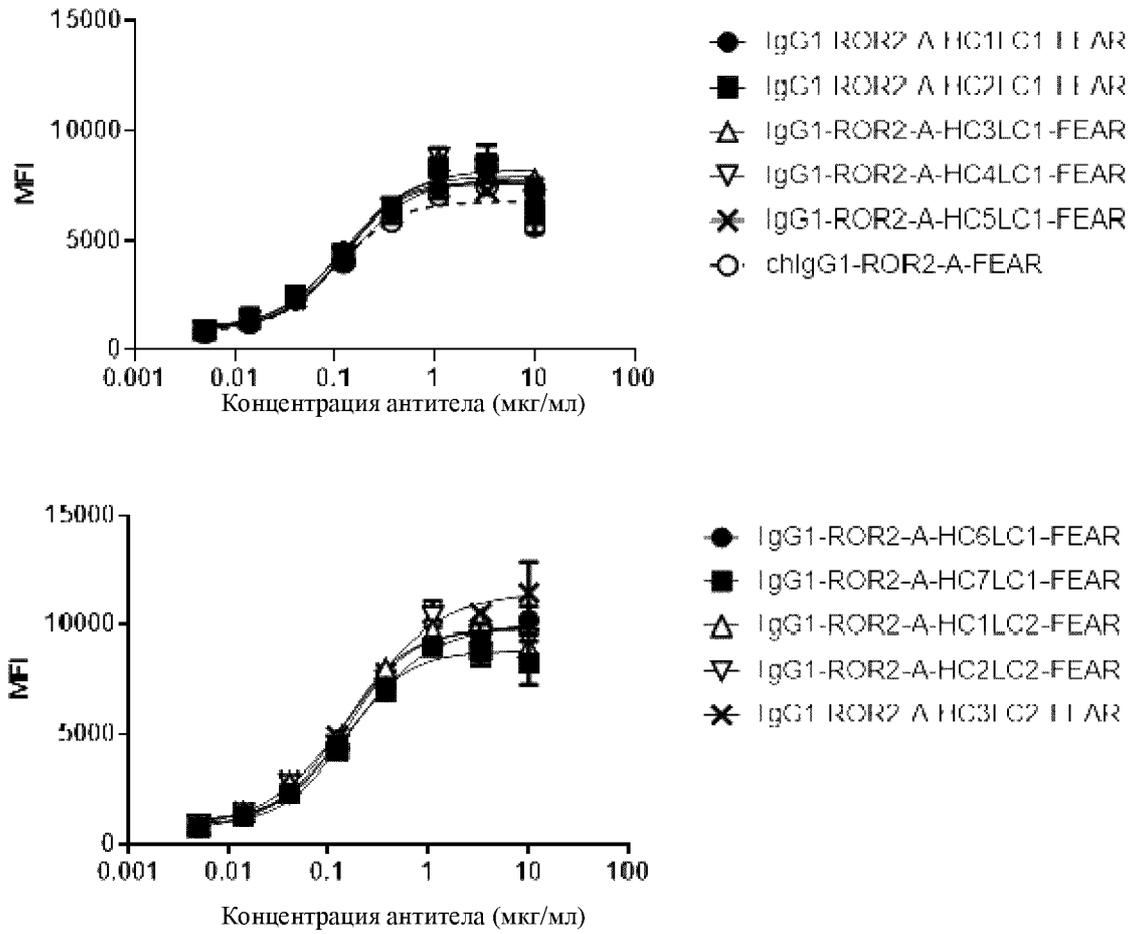
получение указанного антитела или указанных антител, тем самым обеспечивая создание указанного антитела или указанных антител.

20

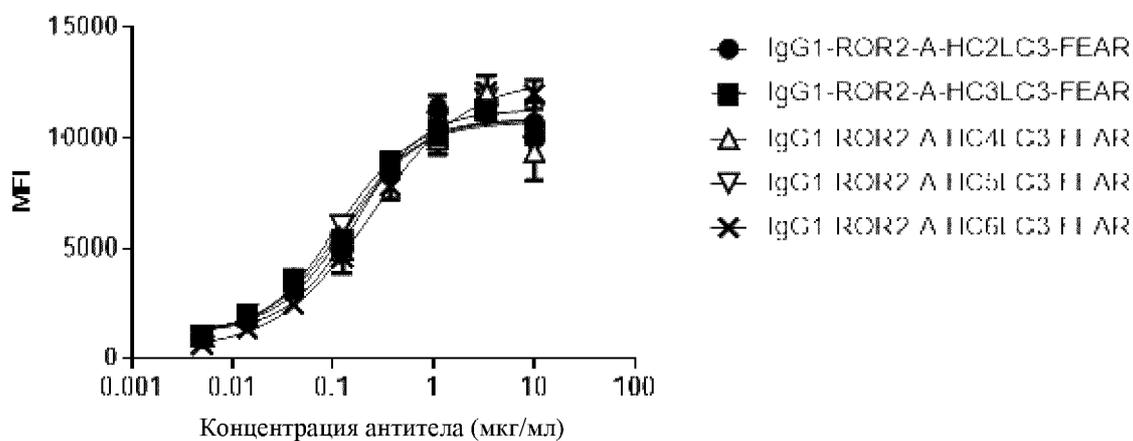
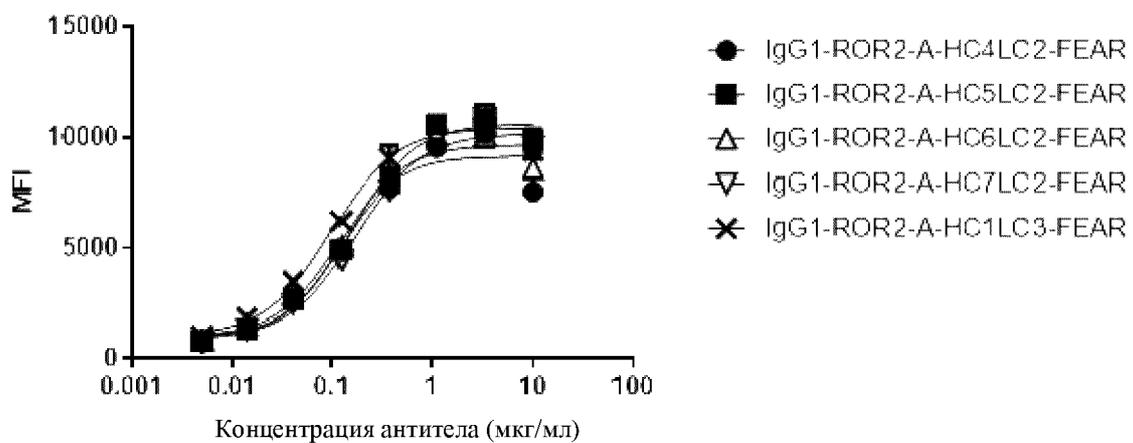
80. Состоящий из частей набор, такой как набор, предназначенный для применения в качестве вспомогательного диагностического средства для идентификации в популяции пациентов тех пациентов, которые могут давать ответ на лечение антителом по одному из п.п. 1-56, содержащий антитело по одному из п.п. 1-56 и инструкции по применению указанного набора.

25

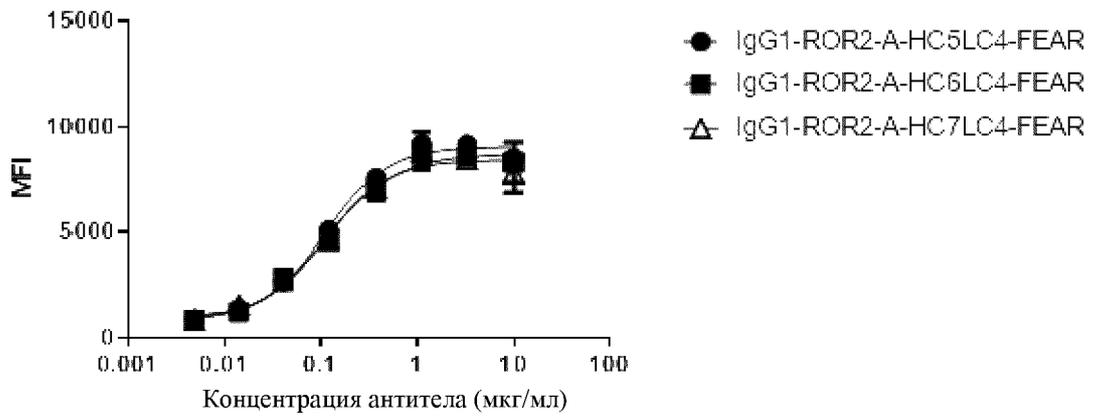
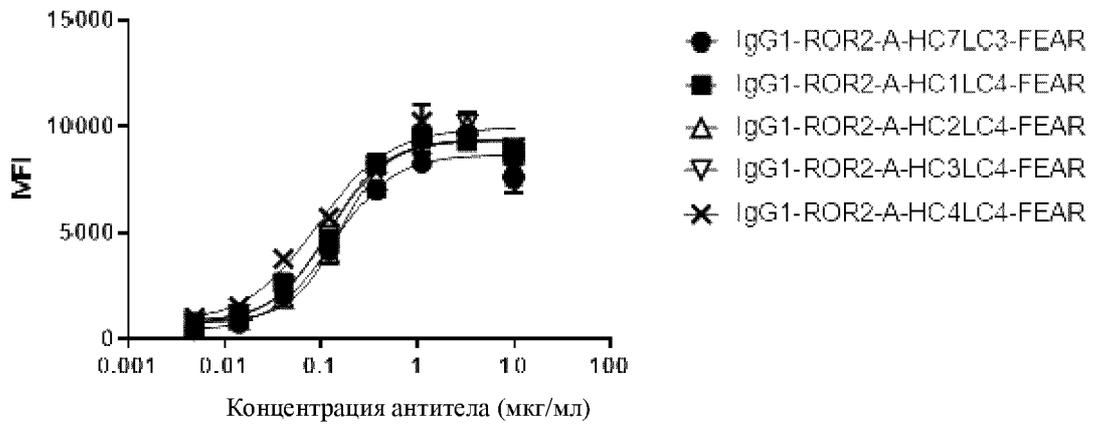
81. Антиидиотипическое антитело, которое связывается с антигенсвязывающей областью, которая обладает способностью связываться с ROR2 по одному из п.п. 1-56.



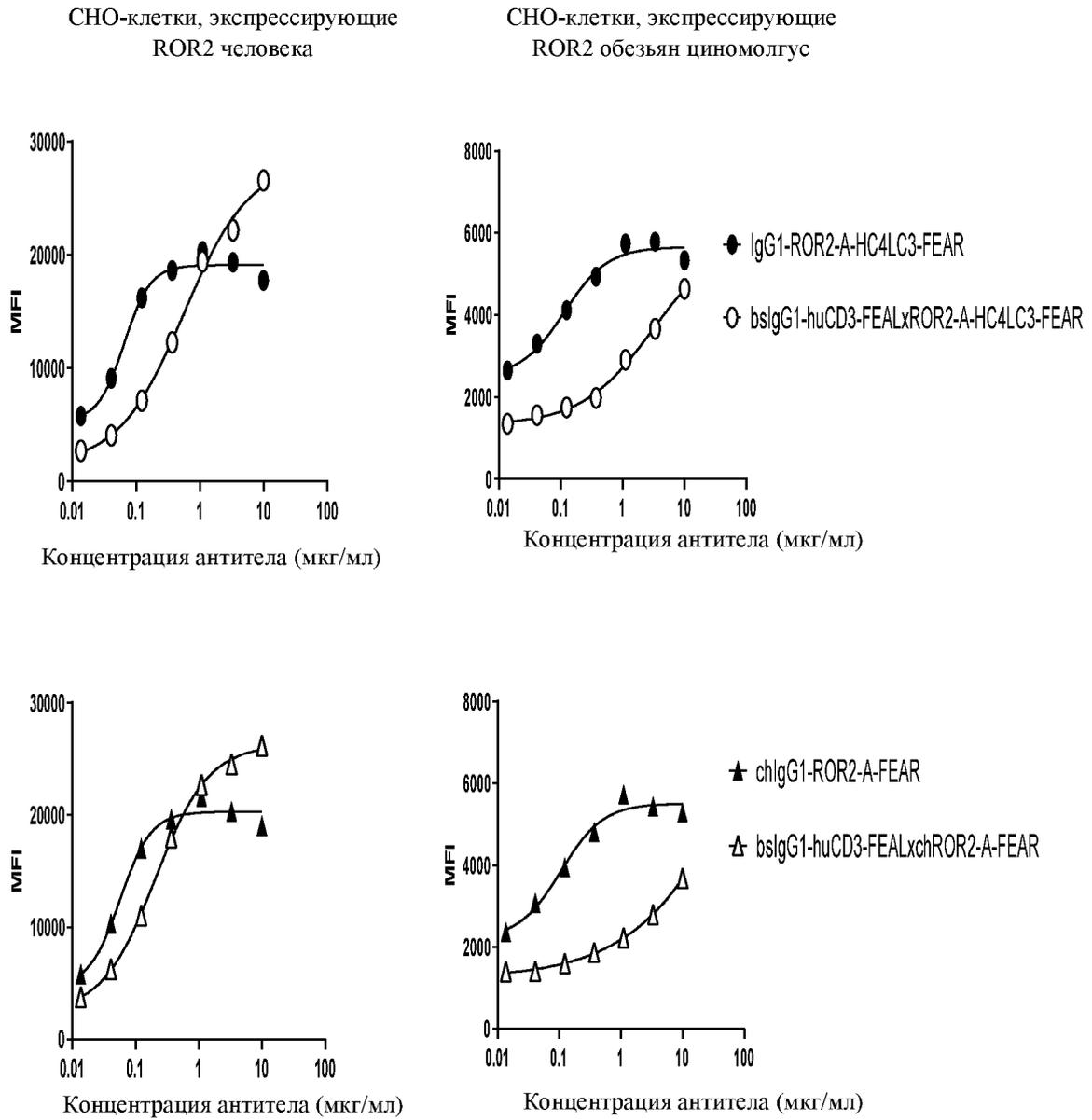
Фиг. 1



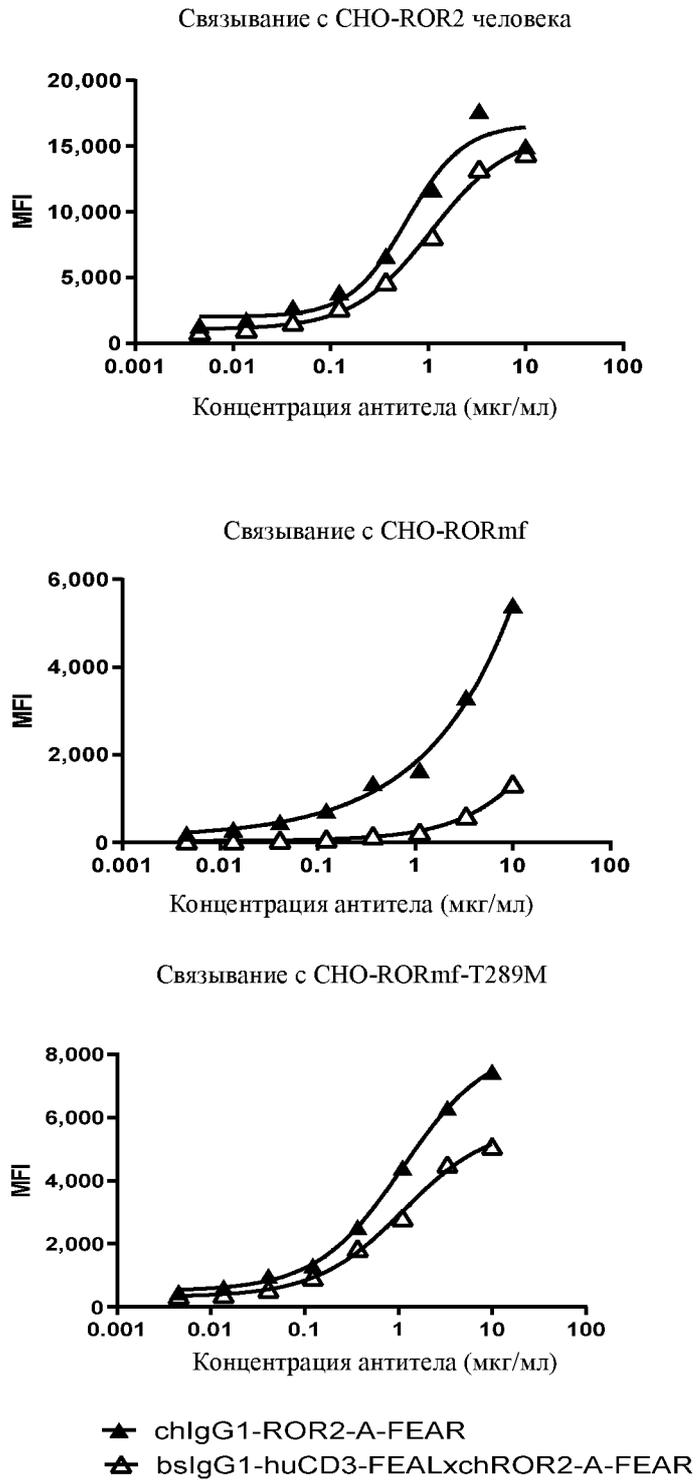
Фиг. 1 (продолжение)



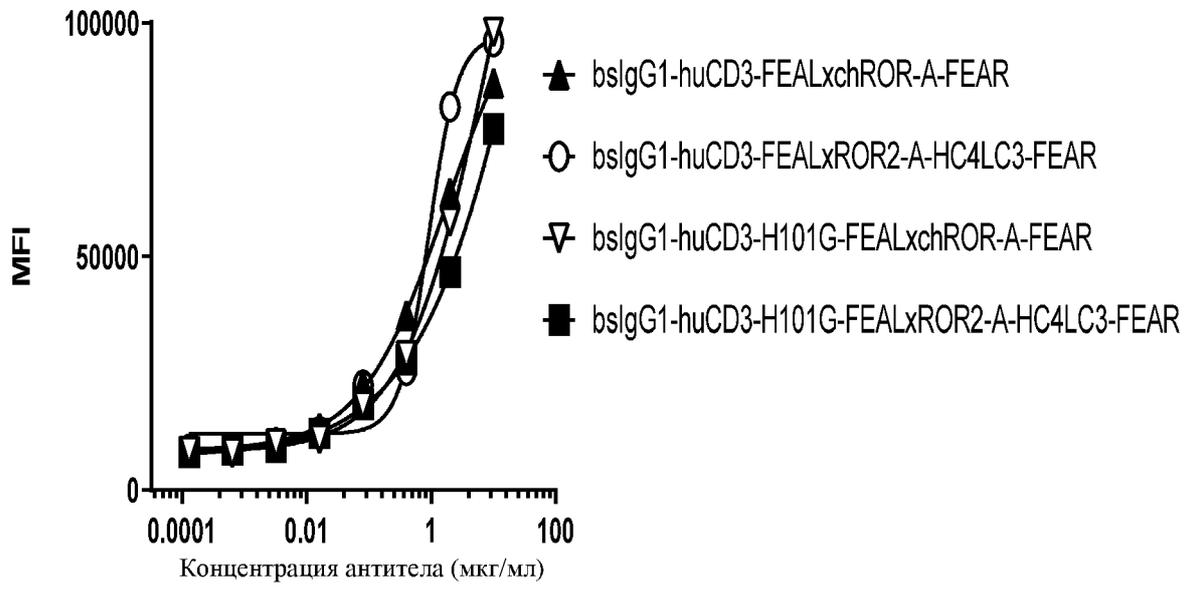
Фиг. 1 (продолжение)



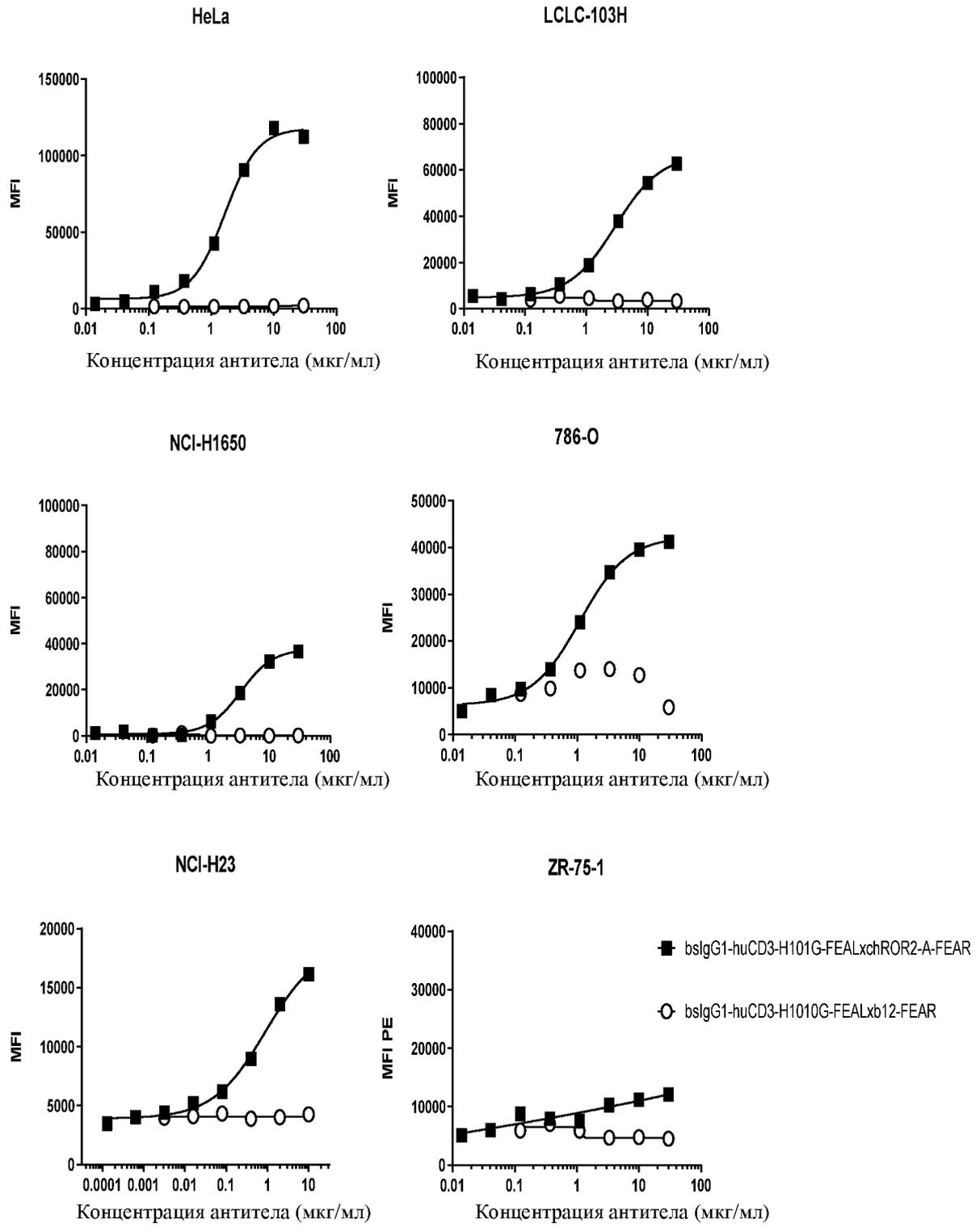
Фиг. 2



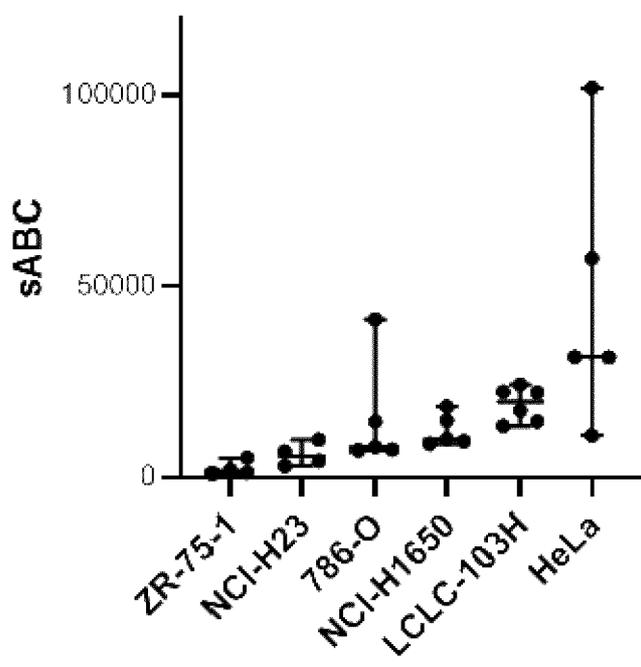
Фиг. 3



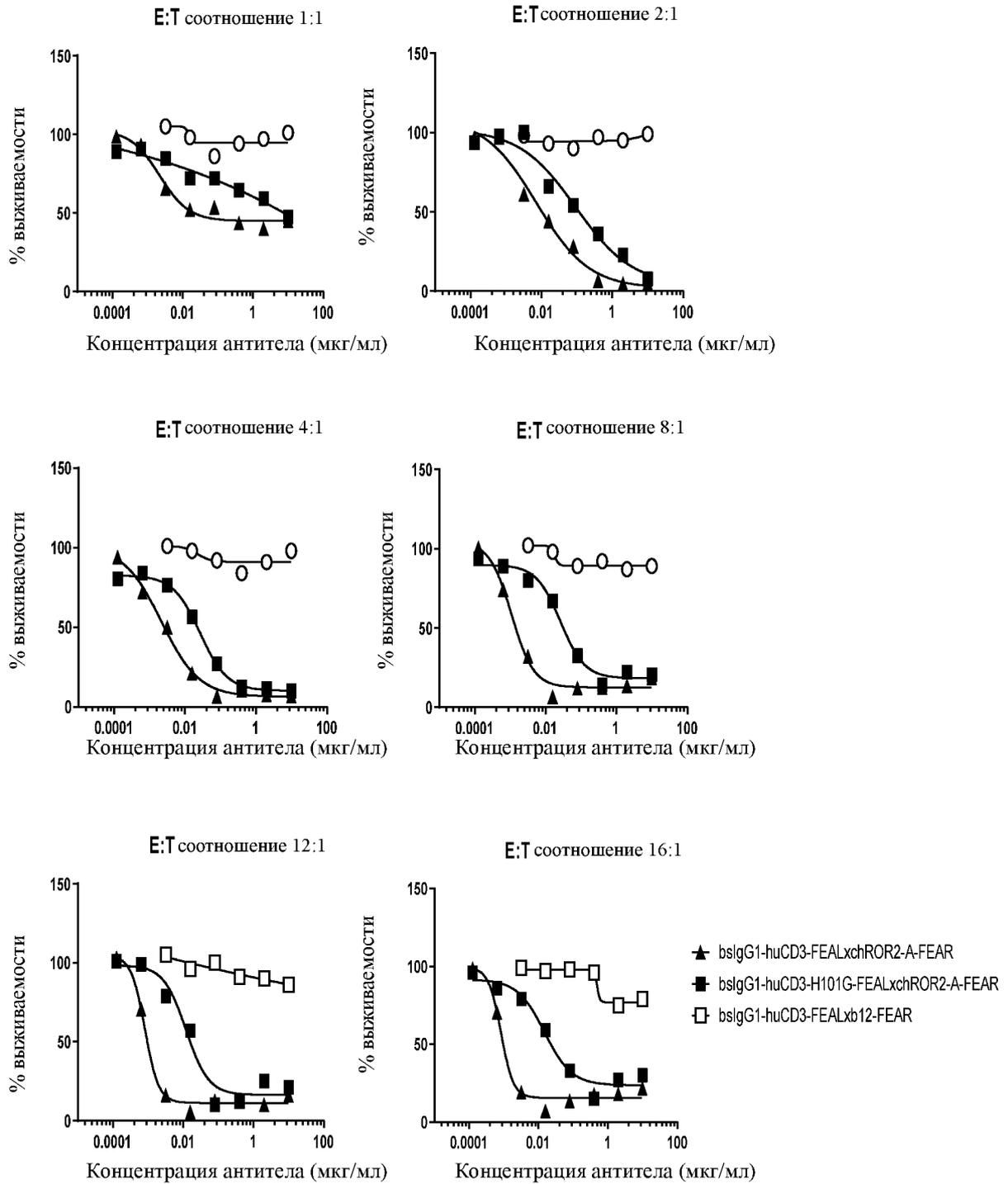
Фиг. 4



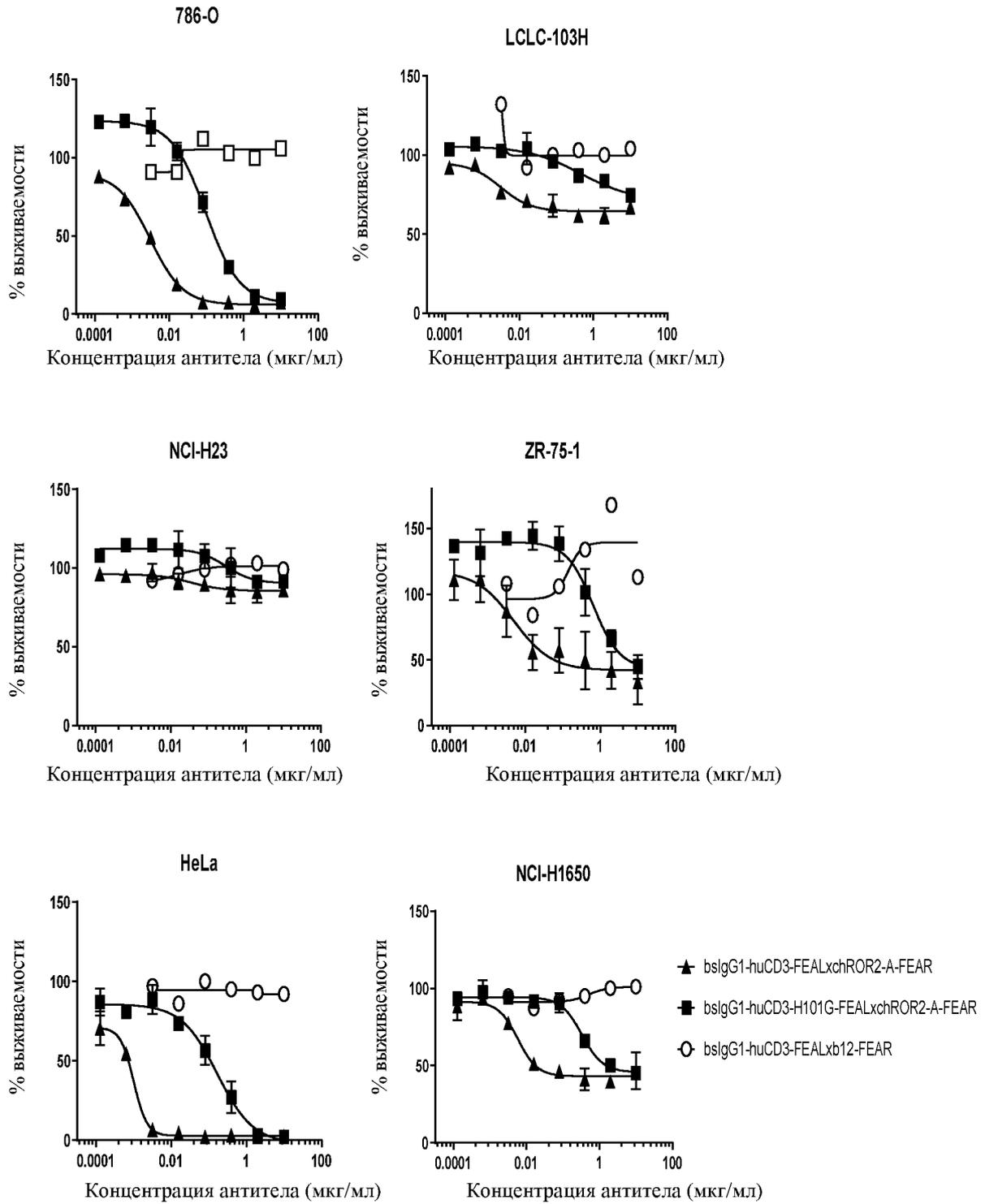
Фиг. 5А



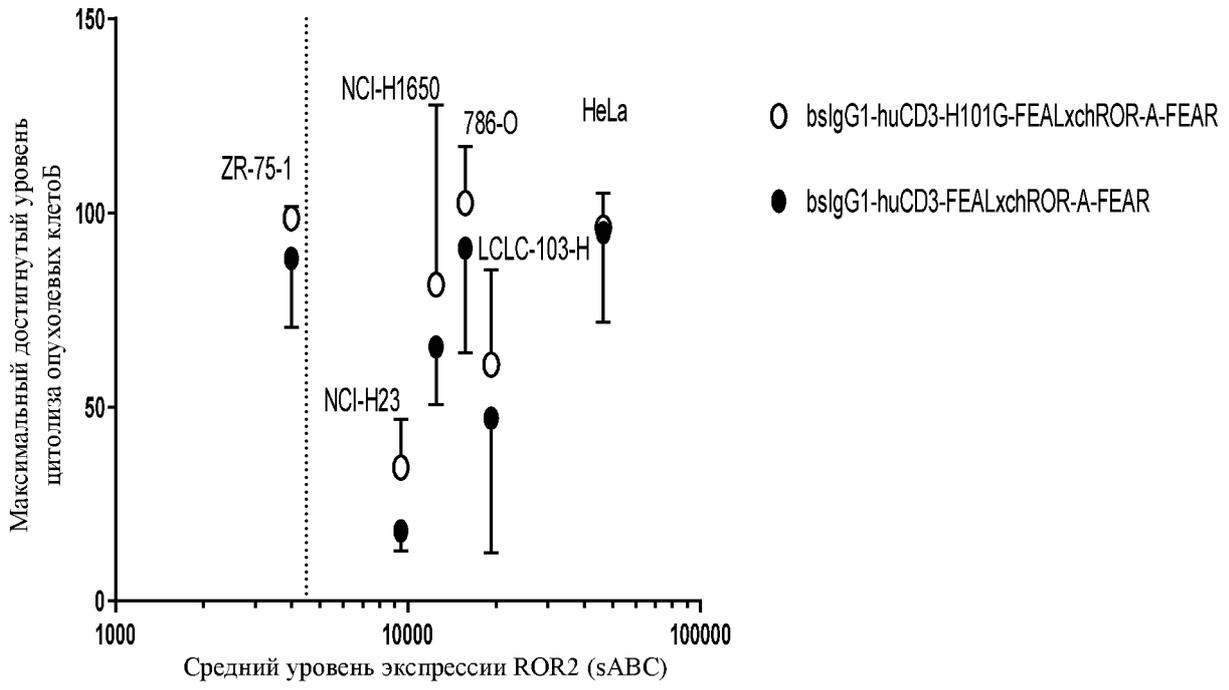
Фиг. 5Б (продолжение)



Фиг. 6

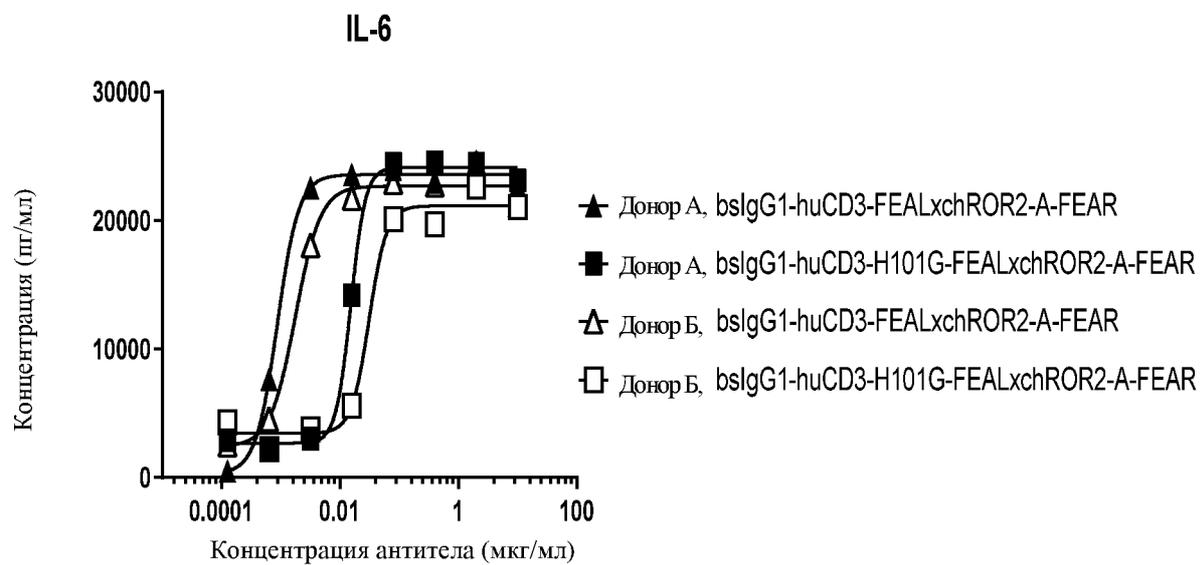


Фиг. 7



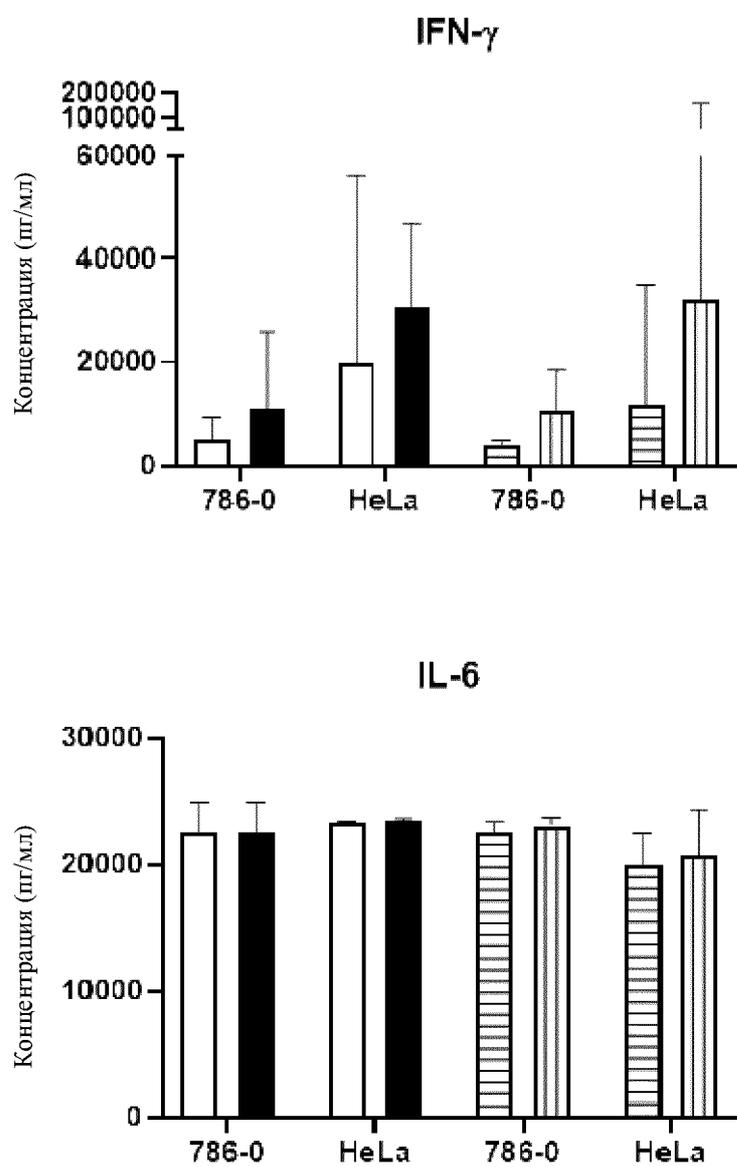
Фиг. 8

A

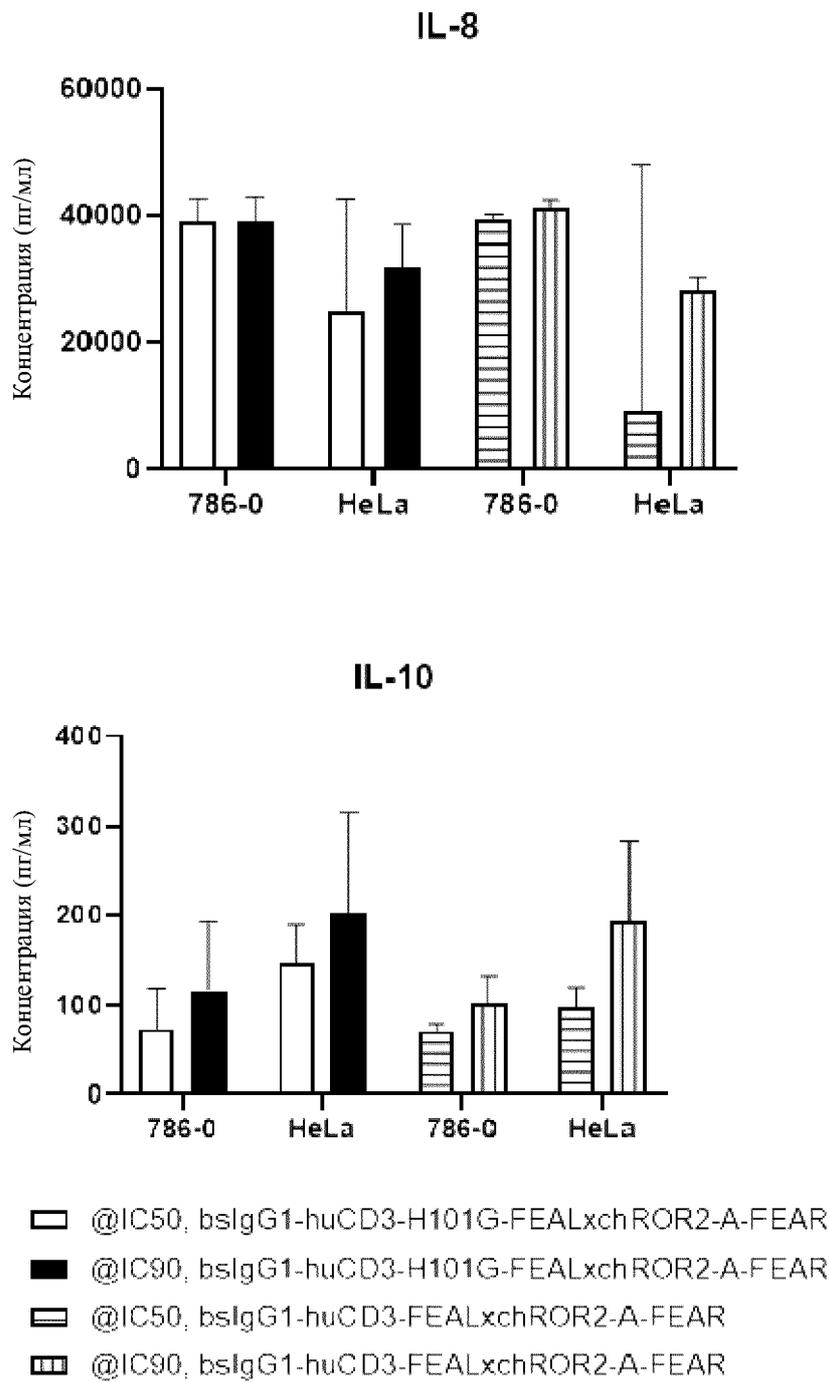


Фиг. 9

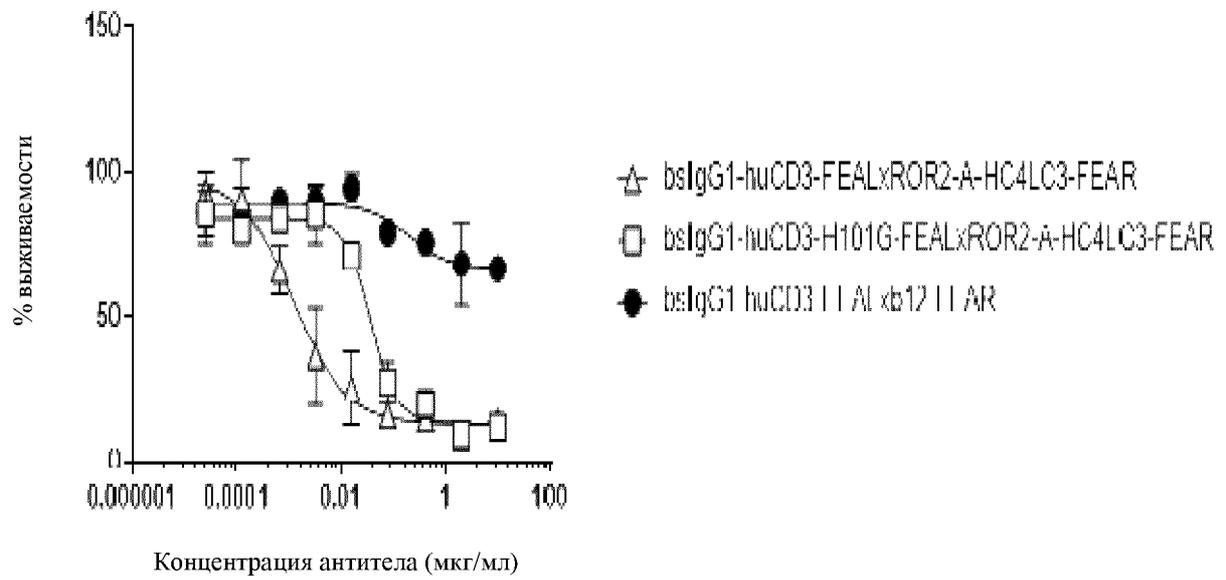
Б



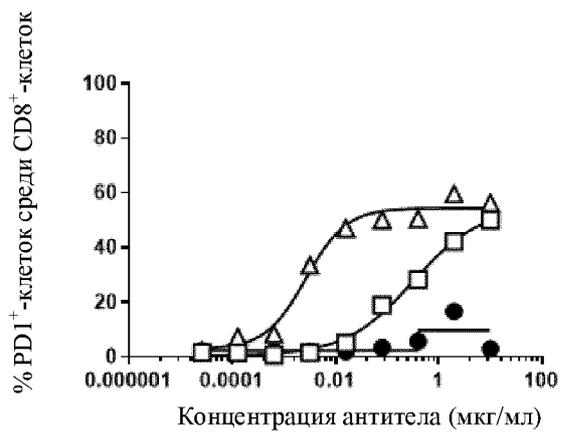
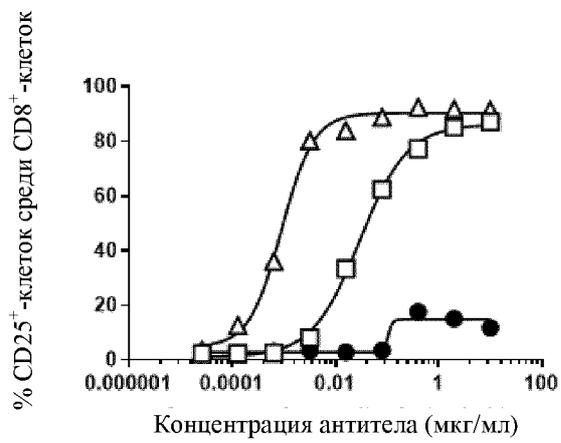
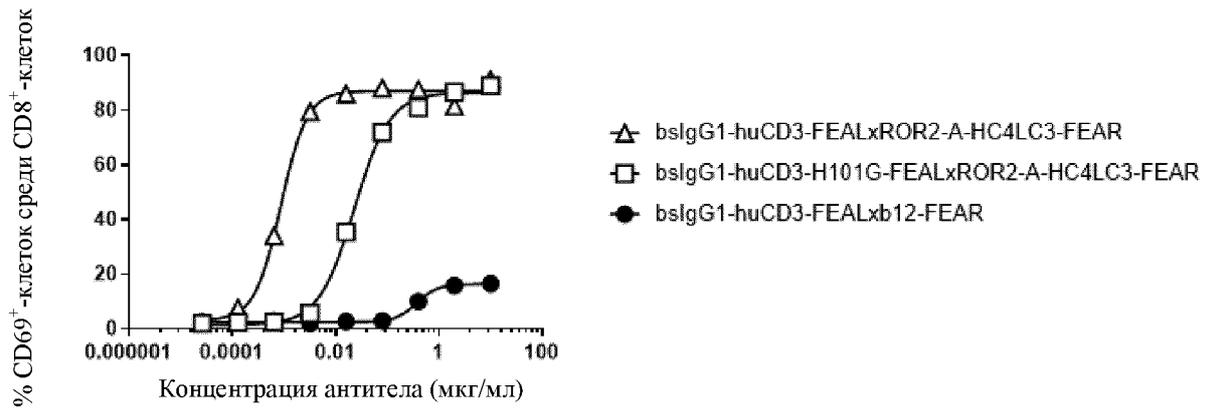
Фиг. 9 (продолжение)

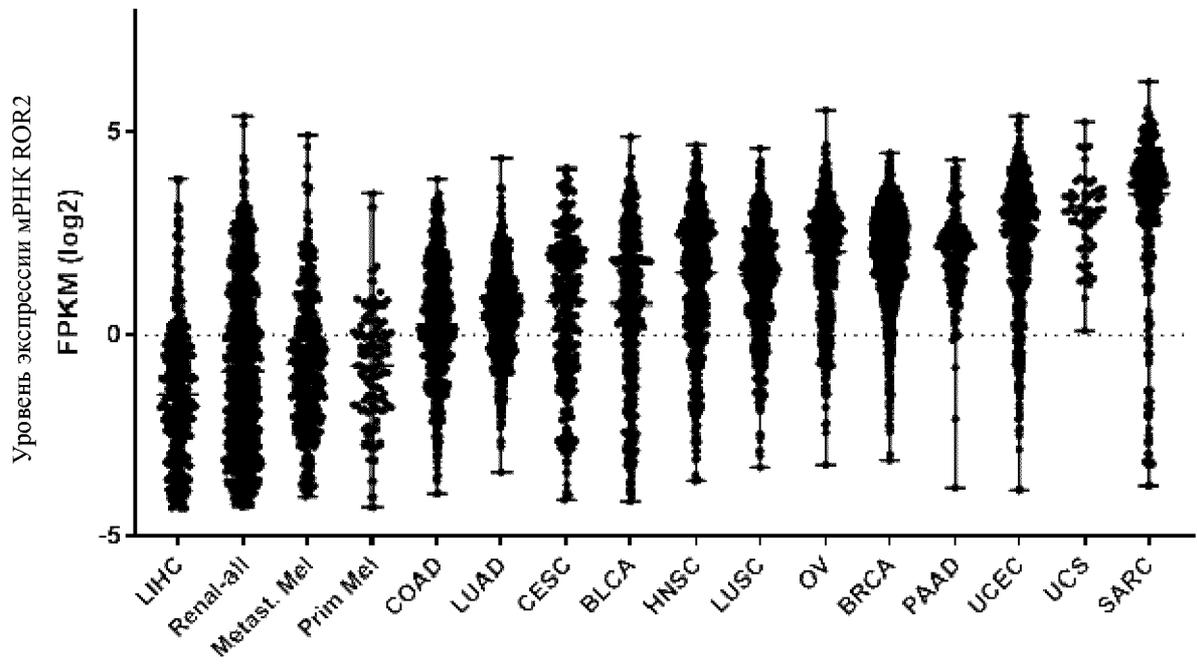


Фиг. 9 (продолжение)



Фиг. 10





Фиг. 12