



(51) МПК
C40B 50/06 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2016105962, 03.12.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
04.12.2009 US 61/267,006;
20.05.2010 US 61/346,566

(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2012127799 03.07.2012

(43) Дата публикации заявки: 23.11.2018 Бюл. №
33

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Большая Спасская, д. 25,
строение 3, ООО "Юридическая фирма
Городисский и Партнеры"**

(71) Заявитель(и):
ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(72) Автор(ы):
**ШЕЕР Джастин (US),
ВАНДЛЕН Ричард Л. (US)**

(54) МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, АНАЛОГИ АНТИТЕЛ, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ

(57) Формула изобретения

1. Способ синтеза мультиспецифического антитела, где проводят реакцию первого фрагмента антитела, полученного из первого исходного антитела, обладающего первой моноспецифичностью и свободной сульфидрильной группой, с тио-реактивным кросслинкером для получения группы фрагмент антитела-кросслинкер, и где проводят реакцию группы фрагмент антитела-кросслинкер со вторым фрагментом антитела, полученным из второго исходного антитела, обладающего второй моноспецифичностью и свободной сульфидрильной группой, для получения мультиспецифического антитела, и где первая моноспецифичность отличается от второй моноспецифичности.

2. Способ по п.1, где первое исходное антитело выбрано из анти-Her1 и анти-Her2.

3. Способ по п.2, где первое исходное антитело представляет собой анти-Her2, и второе исходное антитело представляет собой анти-Her1, или первое исходное антитело представляет собой анти-Her1, и второе исходное антитело представляет собой анти-Her2.

4. Способ по п.2, где анти-Her2 выбран из трастузумаба и пертузумаба.

5. Способ по п.2, где первое исходное антитело представляет собой анти-Her2, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:1, 2, 3, 6 и 7.

6. Способ по п.2, где первое исходное антитело представляет собой анти-Her2, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:4, 5 и 8.

2016105962 A

R U 2 0 1 6 1 0 5 9 6 2 A

R U 2 0 1 6 1 0 5 9 6 2 A

7. Способ по п.2, где первое исходное антитело представляет собой анти-Her2, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:1, 2, 3, 6 и 7, и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:4, 5 и 8.

8. Способ по п.2, где анти-Her1 выбрано из D1-5 и C3-101.

9. Способ по п.2, где первое исходное антитело представляет собой анти-Her1, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:18, 19, 21 и 22.

10. Способ по п.2, где первое исходное антитело представляет собой анти-Her1, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:17 и 20.

11. Способ по п.2, где первое исходное антитело представляет собой анти-Her1, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:18, 19, 21 и 22 и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:17 и 20.

12. Способ по п.3, где анти-Her2 выбрано из трастузумаба и пертузумаба, и анти-Her1 выбрано из D1-5 и C3-101.

13. Способ по п.3, где фрагмент антитела, полученный из анти-Her2, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:1, 2, 3, 6 и 7, и фрагмент антитела, полученный из анти-Her1, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:18, 19, 21 и 22.

14. Способ по п.3, где фрагмент антитела, полученный из анти-Her2, содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:4, 5 и 8, и фрагмент антитела, полученный из анти-Her1, содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:17 и 20.

15. Способ по п.3, где фрагмент антитела, полученный из анти-Her2, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:1, 2, 3, 6 и 7, и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:4, 5 и 8; и фрагмент антитела, полученный из анти-Her1, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:18, 19, 21 и 22, и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:17 и 20.

16. Способ по п.1, где первое исходное антитело выбрано из анти-Fc γ RIIb и анти-Fc ϵ RIa.

17. Способ по п.16, где первое исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RIIb, и второе исходное антитело представляет собой анти-Fc ϵ RIa, или первое исходное антитело представляет собой анти-Fc ϵ RIa, и второе исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RIIb.

18. Способ по п.16, где анти-Fc γ RIIb представляет собой 5A6.

19. Способ по п.16, где первое исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RIIb, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:11 и 12.

20. Способ по п.16, где первое исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RIIb, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:9 и 10.

21. Способ по п.16, где первое исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RIIb, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:11 и 12, и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:9 и 10.

22. Способ по п.16, где анти-Fc ϵ RIa представляет собой 22E7.

23. Способ по п.16, где первое исходное антитело представляет собой анти-Fc ϵ RIa,

R U 2 0 1 6 1 0 5 9 6 2 A

и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:15 и 16.

24. Способ по п.16, где первое исходное антитело представляет собой анти-FcεRIα, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:13 и 14.

25. Способ по п.16, где первое исходное антитело представляет собой анти-FcεRIα и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:15 и 16 и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:13 и 14.

26. Способ по п.17, где фрагмент антитела, полученный из анти-FcγRIIb, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:11 и 12, и фрагмент антитела, полученный из анти-FcεRIα, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:15 и 16.

27. Способ по п.17, где фрагмент антитела, полученный из анти-FcγRIIb, содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:9 и 10, и фрагмент антитела, полученный из анти-FcεRIα, содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:13 и 14.

28. Способ по п.17, где фрагмент антитела, полученный из анти-FcγRIIb, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:11 и 12, и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:9 и 10; и фрагмент антитела, полученный из анти-FcεRIα, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:15 и 16, и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:13 и 14.

29. Способ по п.1, где тио-реактивный кросслинкер выбран из бис-малеимидогалогенидов, бис-алкилгалогенидов, пиридилидсульфидов, бис-ртутных солей, опосредованного 5-тио-2-нитробензойной кислотой перекрестного связывания и бис-тиосульфонатов.

30. Способ по п.29, где тио-реактивный кросслинкер представляет собой бис-малеинимид.

31. Способ по п.1, где первый фрагмент антитела и/или второй фрагмент антитела получены из сконструированного антитела с цистeinовыми заменами.

32. Способ по п.31, где сконструированное антитело с цистeinовыми заменами содержит замену в положении 110 или в положении 205 легкой цепи, где нумерация остатков присутствует в соответствии с системой нумерации EU, и где замена представляет собой цистein.

33. Способ по п.31, где сконструированное антитело с цистeinовыми заменами содержит замену в положении 118 или в положении 121 тяжелой цепи, где нумерация остатков присутствует в соответствии с системой нумерации EU, и где замена представляет собой цистein.

34. Способ по п.1, где первый фрагмент антитела и/или второй фрагмент антитела получен из природного антитела, где природное антитело расщепляют пепсином для получения F(ab')₂ фрагмента, где F(ab')₂ фрагмент очищают и обрабатывают восстанавливающим средством, а затем окисляющим средством в условиях, при которых переформируется дисульфидный мостик между тяжелой цепью и легкой цепью Fab, и остатки цистеина в шарнирной области остаются неокисленными.

35. Способ синтеза аналога антитела, где проводят реакцию первого фрагмента антитела, обладающего свободной сульфидрильной группой, с тио-реактивным кросслинкером для получения группы фрагмент антитела-кросслинкер, и где проводят реакцию группы фрагмент антитела-кросслинкер со вторым фрагментом антитела, обладающим свободной сульфидрильной группой, для получения аналога антитела, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела получены из одного

R U 2 0 1 6 1 0 5 9 6 2 A

исходного антитела.

36. Способ по п.35, где исходное антитело выбрано из анти-Her1, анти-Her2, анти-Fc ϵ RI α и анти-Fc γ RII b .

37. Способ по п.36, где анти-Her2 выбрано из трастузумаба и пертузумаба.

38. Способ по п.36, где исходное антитело представляет собой анти-Her2, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:1, 2, 3, 6 и 7.

39. Способ по п.36, где исходное антитело представляет собой анти-Her2, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:4, 5 и 8.

40. Способ по п.36, где исходное антитело представляет собой анти-Her2, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи и одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:1, 2, 3, 6, и 7, и последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:4, 5 и 8.

41. Способ по п.36, где анти-Her1 выбрано из D1-5 и C3-101.

42. Способ по п.36, где исходное антитело представляет собой анти-Her1, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:18, 19, 21 и 22.

43. Способ по п.36, где исходное антитело представляет собой анти-Her1, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:17 и 20.

44. Способ по п.36, где исходное антитело представляет собой анти-Her1, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи и одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:18, 19, 21 и 22, и последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:17 и 20.

45. Способ по п.36, где анти-Fc γ RII b представляет собой 5A6.

46. Способ по п.36, где исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RII b , и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:11 и 12.

47. Способ по п.36, где исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RII b , и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:9 и 10.

48. Способ по п.36, где исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RII b , и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи и одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:11 и 12, и последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:9 и 10.

49. Способ по п.36, где анти-Fc ϵ RI α представляет собой 22E7.

50. Способ по п.36, где исходное антитело представляет собой анти-Fc ϵ RI α , и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:15 и 16.

R U 2 0 1 6 1 0 5 9 6 2 A

R U 2 0 1 6 1 0 5 9 6 2 A

51. Способ по п.36, где исходное антитело представляет собой анти-FcεRIα, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:13 и 14.

52. Способ по п.36, где исходное антитело представляет собой анти-FcεRIα, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи и одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:15 и 16 и последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:13 и 14.

53. Способ по п.35, где тио-реактивный кросслинкер выбран из бис-малеимидогалогенидов, бис-алкилгалогенидов, пиридилдисульфидов, бис-ртутных солей, опосредованного 5-тио-2-нитробензойной кислотой перекрестного связывания и бис-тиосульфонатов.

54. Способ по п.53, где тио-реактивный кросслинкер представляет собой бис-малеинimid.

55. Способ по п.35, где исходное антитело представляет собой сконструированное антитело с цистеиновыми заменами.

56. Способ по п.55, где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами содержит замену в положении 110 или в положении 205 легкой цепи, где нумерация остатков присутствует в соответствии с системой нумерации EU, и где замена представляет собой цистеин.

57. Способ по п.55, где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами содержит замену в положении 118 или в положении 121 тяжелой цепи, где нумерация остатков присутствует в соответствии с системой нумерации EU, и где замена представляет собой цистеин.

58. Способ по п.35, где исходное антитело представляет собой нативное антитело, где нативное антитело расщепляют пепсином для получения F(ab')₂ фрагмента, где F(ab')₂ фрагмент очищают и обрабатывают восстановливающим средством, а затем окисляющим средством в условиях, при которых переформируется дисульфидный мостик между тяжелой цепью и легкой цепью Fab, и остатки цистеина в шарнирной области остаются неокисленными.

59. Способ по п.35, где аналог антитела обладает антигенсвязывающей областью, структурно отличающейся от антигенсвязывающей области исходного антитела.

60. Способ по п.1 или 35, где кросслинкер представляет собой модифицированный кросслинкер, содержащий защищенную SH-группу.

61. Способ по п.60, где модифицированный кросслинкер представляет собой бис-малеимидоацетилацетат (BMata).

62. Способ по п.60, где проводят дополнительную реакцию антитела, содержащего модифицированный кросслинкер, со средством, содержащим функциональную группу.

63. Способ по п.62, где средство выбрано из полиэтиленгликоля (PEG), альбуминсвязывающего пептида (ABP), флуоресцентной метки, средства для радиовизуализации, цитотоксического средства и миРНК.

64. Способ по п.63, где средство представляет собой PEG, и PEG выбран из PEG с mw 2000 (2K), PEG с mw 12000 (12K) и PEG с mw 20000 (20K).

65. Способ синтеза панели мультиспецифических антител, где проводят реакцию первого фрагмента антитела, полученного из первого исходного антитела, обладающего первой моноспецифичностью и свободной сульфогидрильной группой, с тио-реактивным кросслинкером для получения группы фрагмент антитела-кросслинкер, и где проводят реакцию группы фрагмент антитела-кросслинкер попарно с каждым из двух или более дополнительных фрагментов антител, полученных из одного или нескольких исходных

антител с моноспецифичностью, отличной от первого фрагмента антитела, каждый из которых имеет свободную сульфогидрильную группу, для получения панели мультиспецифических антител.

66. Способ по п.65, где первое исходное антитело выбрано из анти-Her1, анти-Her2, анти-Fc ϵ RI α и анти-Fc γ RII b .

67. Способ по п.66, где первый фрагмент антитела получен из анти-Her2, и каждый из двух или более дополнительных фрагментов антител получен из анти-Her1, или первый фрагмент антитела получен из анти-Her1, и каждый из двух или более дополнительных фрагментов антител получен из анти-Her2, или первый фрагмент антитела получен из анти-Fc ϵ RI α и каждый из двух или более дополнительных фрагментов антител получен из анти-Fc γ RII b , или первый фрагмент антитела получен из анти-Fc γ RII b и каждый из двух или более дополнительных фрагментов антител получен из анти-Fc ϵ RI α .

68. Способ по п.66, где анти-Her2 выбрано из трастузумаба и пертузумаба.

69. Способ по п.66, где анти-Her1 выбрано из D1-5 и C3-101.

70. Способ по п.67, где анти-Her2 выбрано из трастузумаба и пертузумаба, и анти-Her1 выбрано из D1-5 и C3-101.

71. Способ по п.66, где анти-Fc γ RII b представляет собой 5A6.

72. Способ по п.66, где анти-Fc ϵ RI α представляет собой 22E7.

73. Способ по п.67, где анти-Fc γ RII b представляет собой 5A6, и анти-Fc ϵ RI α представляет собой 22E7.

74. Способ по п.65, где тио-реактивный кросслинкер выбран из бис-малеимидогалогенидов, бис-алкилгалогенидов, пиридилдисульфидов, бис-ртутных солей, опосредованного 5-тио-2-нитробензойной кислотой перекрестного связывания и бис-тиосульфонатов.

75. Способ по п.74, где тио-реактивный кросслинкер представляет собой бис-малеинимид.

76. Способ по п.65, где первый фрагмент антитела и/или каждый из двух или более дополнительных фрагментов антител получены из сконструированного антитела с цистeinовыми заменами.

77. Способ по п.76, где сконструированное антитело с цистeinовыми заменами содержит замену в положении 110 или в положении 205 легкой цепи, где нумерация остатков присутствует в соответствии с системой нумерации EU, и где замена представляет собой цистein.

78. Способ по п.76, где сконструированное антитело с цистeinовыми заменами содержит замену в положении 118 или в положении 121 тяжелой цепи, где нумерация остатков присутствует в соответствии с системой нумерации EU, и где замена представляет собой цистein.

79. Способ синтеза панели аналогов антител, где проводят реакцию первого фрагмента антитела, обладающего свободной сульфогидрильной группой, с тио-реактивным кросслинкером для получения группы фрагмент антитела-кросслинкер, и где проводят реакцию группы фрагмент антитела-кросслинкер попарно с каждым из двух или более дополнительных фрагментов антител, каждый из которых имеет свободную сульфогидрильную группу, для получения панели аналогов антител, где каждый из фрагментов антител получен из одного и того же исходного антитела.

80. Способ по п.79, где исходное антитело выбрано из анти-Her1, анти-Her2, анти-Fc ϵ RI α и анти-Fc γ RII b .

81. Способ по п.80, где анти-Her2 выбрано из трастузумаба и пертузумаба.

82. Способ по п.80, где анти-Her1 выбрано из D1-5 и C3-101.

83. Способ по п.80, где анти-Fc γ RII b представляет собой 5A6.

84. Способ по п.80, где анти-Fc ε RI α представляет собой 22E7.
85. Способ по п.79, где тио-реактивный кросслинкер выбран из бис-малеимидогалогенидов, бис-алкилгалогенидов, пиридилдисульфидов, бис-ртутных солей, опосредованного 5-тио-2-нитробензойной кислотой перекрестного связывания и бис-тиосульфонатов.
86. Способ по п.85, где тио-реактивный кросслинкер представляет собой бис-малеинimid.
87. Способ по п.79, где исходное антитело представляет собой сконструированное антитело с цистеиновыми заменами.
88. Способ по п.87, где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами содержит замену в положении 110 или в положении 205 легкой цепи, где нумерация остатков присутствует в соответствии с системой нумерации EU, и где замена представляет собой цистеин.
89. Способ по п.87, где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами содержит замену в положении 118 или в положении 121 тяжелой цепи, где нумерация остатков присутствует в соответствии с системой нумерации EU, и где замена представляет собой цистеин.
90. Мультиспецифическое антитело, синтезированное способом, включающим
- (i) реакцию первого фрагмента антитела, полученного из первого исходного антитела, обладающего первой моноспецифичностью и свободной сульфидрильной группой, с тио-реактивным кросслинкером для получения группы фрагмент антитела-кросслинкер, и
 - (ii) реакцию группы фрагмент антитела-кросслинкер со вторым фрагментом антитела, полученным из второго исходного антитела, обладающего второй моноспецифичностью и свободной сульфидрильной группой, для получения мультиспецифического антитела, и где первая моноспецифичность отличается от второй моноспецифичности.
91. Мультиспецифическое антитело по п.90, где первое исходное антитело выбрано из анти-Her1 и анти-Her2.
92. Мультиспецифическое антитело по п.91, где первое исходное антитело представляет собой анти-Her2 и второе исходное антитело представляет собой анти-Her1, или первое исходное антитело представляет собой анти-Her1 и второе исходное антитело представляет собой анти-Her2.
93. Мультиспецифическое антитело по п.91, где анти-Her2 выбрано из трастузумаба и пертузумаба.
94. Мультиспецифическое антитело по п.91, где первое исходное антитело представляет собой анти-Her2, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:1, 2, 3, 6 и 7.
95. Мультиспецифическое антитело по п.91, где первое исходное антитело представляет собой анти-Her2, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:4, 5 и 8.
96. Мультиспецифическое антитело по п.91, где первое исходное антитело представляет собой анти-Her2, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:1, 2, 3, 6 и 7, и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:4, 5 и 8.
97. Мультиспецифическое антитело по п.91, где анти-Her1 выбрано из D1-5 и C3-101.
98. Мультиспецифическое антитело по п.91, где первое исходное антитело представляет собой анти-Her1, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:18, 19, 21 и 22.
99. Мультиспецифическое антитело по п.91, где первое исходное антитело представляет собой анти-Her1, и где первый фрагмент антитела содержит

последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:17 и 20.

100. Мультиспецифическое антитело по п.91, где первое исходное антитело представляет собой анти-Her1, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:18, 19, 21 и 22, и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:17 и 20.

101. Мультиспецифическое антитело по п.92, где анти-Her2 выбрано из трастузумаба и пертузумаба, и анти-Her1 выбрано из D1-5 и C3-101.

102. Мультиспецифическое антитело по п.92, где фрагмент антитела, полученный из анти-Her2, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:1, 2, 3, 6 и 7, и фрагмент антитела, полученный из анти-Her1, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:18, 19, 21 и 22.

103. Мультиспецифическое антитело по п.92, где фрагмент антитела, полученный из анти-Her2, содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:4, 5 и 8, и фрагмент антитела, полученный из анти-Her1, содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:17 и 20.

104. Мультиспецифическое антитело по п.92, где фрагмент антитела, полученный из анти-Her2, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:1, 2, 3, 6 и 7, и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:4, 5 и 8; и фрагмент антитела, полученный из анти-Her1, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:18, 19, 21 и 22, и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:17 и 20.

105. Мультиспецифическое антитело по п.90, где первое исходное антитело выбрано из анти-Fc γ RIIb и анти-Fc ϵ RIa.

106. Мультиспецифическое антитело по п.105, где первое исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RIIb, и второе исходное антитело представляет собой анти-Fc ϵ RIa, или первое исходное антитело представляет собой анти-Fc ϵ RIa, и второе исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RIIb.

107. Мультиспецифическое антитело по п.105, где анти-Fc γ RIIb представляет собой 5A6.

108. Мультиспецифическое антитело по п.105, где первое исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RIIb, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:11 и 12.

109. Мультиспецифическое антитело по п.105, где первое исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RIIb, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:9 и 10.

110. Мультиспецифическое антитело по п.105, где первое исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RIIb, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:11 и 12, и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:9 и 10.

111. Мультиспецифическое антитело по п.105, где анти-Fc ϵ RIa представляет собой 22E7.

112. Мультиспецифическое антитело по п.105, где первое исходное антитело представляет собой анти-Fc ϵ RIa, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:15 и 16.

113. Мультиспецифическое антитело по п.105, где первое исходное антитело представляет собой анти-Fc ϵ RIa, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:13 и 14.

114. Мультиспецифическое антитело по п.105, где первое исходное антитело представляет собой анти-Fc ϵ RIa, и где первый фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:15 и 16, и последовательность

тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:13 и 14.

115. Мультиспецифическое антитело по п.106, где фрагмент антитела, полученный из анти-Fc γ RIIb, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 11 и 12, и фрагмент антитела, полученный из анти-Fc ϵ RIa, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:15 и 16.

116. Мультиспецифическое антитело по п.106, где фрагмент антитела, полученный из анти-Fc γ RIIb, содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:9 и 10, и фрагмент антитела, полученный из анти-Fc ϵ RIa, содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:13 и 14.

117. Мультиспецифическое антитело по п.106, где фрагмент антитела, полученный из анти-Fc γ RIIb, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 11 и 12, и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:9 и 10; и фрагмент антитела, полученный из анти-Fc ϵ RIa, содержит последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO:15 и 16, и последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:13 и 14.

118. Мультиспецифическое антитело по п.90, где тио-реактивный кросслинкер выбран из бис-малеимидогалогенидов, бис-алкилгалогенидов, пиридилидисульфидов, бис-ртутных солей, опосредованного 5-тио-2-нитробензойной кислотой перекрестного связывания и бис-тиосульфонатов.

119. Мультиспецифическое антитело по п.118, где тио-реактивный кросслинкер представляет собой бис-малеинимид.

120. Мультиспецифическое антитело по п.90, где первый фрагмент антитела и/или второй фрагмент антитела получены из сконструированного антитела с цистеиновыми заменами.

121. Мультиспецифическое антитело по п.120, где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами содержит замену в положении 110 или в положении 205 легкой цепи, где нумерация остатков присутствует в соответствии с системой нумерации EU, и где замена представляет собой цистеин.

122. Мультиспецифическое антитело по п.120, где сконструированное антитело с цистеиновыми заменами содержит замену в положении 118 или в положении 121 тяжелой цепи, где нумерация остатков присутствует в соответствии с системой нумерации EU, и где замена представляет собой цистеин.

123. Мультиспецифическое антитело по п.90, где первое исходное антитело специфически связывает мишень на Т-клетке, и второе исходное антитело специфически связывает мишень на клетке опухоли.

124. Мультиспецифическое антитело по п.123, где первое исходное антитело представляет собой анти-CD3, и второе исходное антитело выбрано из анти-BLR1, анти-BR3, анти-CD19, анти-CD20, анти-CD22, анти-CD72, анти-CD79A, анти-CD79B, анти-CD180, анти-CR2, анти-FCER2, анти-FcRH1, анти-FcRH2, анти-FcRH5, анти-FCRL4, анти-Her2, анти-HLA-DOB и анти-NAG14.

125. Мультиспецифическое антитело по п.124, где первое исходное антитело представляет собой анти-CD3, и второе исходное антитело представляет собой анти-CD19.

126. Мультиспецифическое антитело по п.124, где первое исходное антитело представляет собой анти-CD3, и второе исходное антитело представляет собой анти-CD20.

127. Мультиспецифическое антитело по п.124, где первое исходное антитело представляет собой анти-CD3, и второе исходное антитело представляет собой анти-CD22.

128. Мультиспецифическое антитело по п.124, где первое исходное антитело

представляет собой анти-CD3, и второе исходное антитело представляет собой анти-FcRH5.

129. Мультиспецифическое антитело по п.124, где первое исходное антитело представляет собой анти-CD3, и второе исходное антитело представляет собой анти-Her2.

130. Мультиспецифическое антитело по п.90, где мультиспецифическое антитело обладает одним или несколькими видами биологической активности, неотличимыми от активности каждого из исходных антител.

131. Мультиспецифическое антитело по п.90, где мультиспецифическое антитело обладает одним или несколькими видами биологической активности, отличными от активности по меньшей мере одного из исходных антител.

132. Способ лечения злокачественной опухоли, включающий введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела по любому из пп.90-104 или 118-131 индивиду, нуждающемуся в лечении.

133. Аналог антитела, синтезированный способом, включающим

(i) реакцию первого фрагмента антитела, обладающего свободной сульфогидрильной группой, с тио-реактивным кросслинкером для получения группы фрагмент антитела-кросслинкер, и

(ii) реакцию группы фрагмент антитела-кросслинкер со вторым фрагментом антитела, обладающим свободной сульфогидрильной группой, для получения аналога антитела,

и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела получены из одного исходного антитела.

134. Аналог антитела по п.133, где исходное антитело выбрано из анти-Her1, анти-Her2, анти-Fc ϵ RI α и анти-Fc γ RIIb.

135. Аналог антитела по п.134, где анти-Her2 выбрано из трастузумаба и пертузумаба.

136. Аналог антитела по п.134, где исходное антитело представляет собой анти-Her2, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:1, 2, 3, 6 и 7.

137. Аналог антитела по п.134, где исходное антитело представляет собой анти-Her2, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:4, 5 и 8.

138. Аналог антитела по п.134, где исходное антитело представляет собой анти-Her2, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи и одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:1, 2, 3, 6 и 7, и последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:4, 5 и 8.

139. Аналог антитела по п.134, где анти-Her1 выбрано из D1-5 и C3-101.

140. Аналог антитела по п.134, где исходное антитело представляет собой анти-Her1, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:18, 19, 21 и 22.

141. Аналог антитела по п.134, где исходное антитело представляет собой анти-Her1, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:17 и 20.

142. Аналог антитела по п.134, где исходное антитело представляет собой анти-Her1, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи и одинаковую последовательность тяжелой цепи, где

РУ 2016105962 А

последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:18, 19, 21 и 22, и последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:17 и 20.

143. Аналог антитела по п.134, где анти-Fc γ RIIb представляет собой 5A6.

144. Аналог антитела по п.134, где исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RIIb, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:11 и 12.

145. Аналог антитела по п.134, где исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RIIb, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:9 и 10.

146. Аналог антитела по п.134, где исходное антитело представляет собой анти-Fc γ RIIb, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи и одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:11 и 12 и последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:9 и 10.

147. Аналог антитела по п.134, где анти-Fc ϵ RIa представляет собой 22E7.

148. Аналог антитела по п.134, где исходное антитело представляет собой анти-Fc ϵ RIa, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:15 и 16.

149. Аналог антитела по п.134, где исходное антитело представляет собой анти-Fc ϵ RIa, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:13 и 14.

150. Аналог антитела по п.134, где исходное антитело представляет собой анти-Fc ϵ RIa, и где первый фрагмент антитела и второй фрагмент антитела содержат одинаковую последовательность легкой цепи и одинаковую последовательность тяжелой цепи, где последовательность легкой цепи выбрана из SEQ ID NO:15 и 16, и последовательность тяжелой цепи выбрана из SEQ ID NO:13 и 14.

151. Аналог антитела по п.133, где тио-реактивный кросслинкер выбран из бис-малеимидогалогенидов, бис-алкилгалогенидов, пиридилидисульфидов, бис-ртутных солей, опосредованного 5-тио-2-нитробензойной кислотой перекрестного связывания и бис-тиосульфонатов.

152. Аналог антитела по п.151, где тио-реактивный кросслинкер представляет собой бис-малеинимид.

153. Аналог антитела по п.133, где исходное антитело представляет собой сконструированное антитело с цистeinовыми заменами.

154. Аналог антитела по п.153, где сконструированное антитело с цистeinовыми заменами содержит замену в положении 110 или в положении 205 легкой цепи, где нумерация остатков присутствует в соответствии с системой нумерации EU, и где замена представляет собой цистein.

155. Аналог антитела по п.153, где сконструированное антитело с цистeinовыми заменами содержит замену в положении 118 или в положении 121 тяжелой цепи, где нумерация остатков присутствует в соответствии с системой нумерации EU, и где замена представляет собой цистein.

156. Аналог антитела по п.133, где исходное антитело представляет собой нативное антитело, где нативное антитело расщепляют пепсином для получения F(ab')₂ фрагмента, где F(ab')₂ фрагмент очищают и обрабатывают восстановляющим средством, а затем окисляющим средством в условиях, при которых переформируется дисульфидный

РУ 2016105962 А

R U 2 0 1 6 1 0 5 9 6 2 A

мостик между тяжелой цепью и легкой цепью Fab, и остатки цистеина в шарнирной области остаются неокисленными.

157. Аналог антитела по п.133, где аналог антитела обладает антигенсвязывающей областью, структурно отличающейся от антигенсвязывающей области исходного антитела.

158. Антитело по п.90 или п.133, где кросслинкер представляет собой модифицированный кросслинкер, содержащий защищенную SH-группу.

159. Антитело по п.158, где модифицированный кросслинкер представляет собой бис-малеимидоацетилат (BMata).

160. Антитело по п.158, где проводят дополнительную реакцию антитела, содержащего модифицированный кросслинкер, со средством, содержащим функциональную группу.

161. Антитело по п.160, где средство выбрано из полиэтиленгликоля (PEG), альбуминсвязывающего пептида (ABP), флуоресцентной метки, средства для радиовизуализации, цитотоксического средства и миРНК.

162. Способ по п.161, где средство представляет собой PEG, и PEG выбран из PEG с mw 2000 (2K), PEG с mw 12000 (12K) и PEG с mw 20000 (20K).

163. Аналог антитела по п.133, где аналог антитела обладает одним или несколькими видами биологической активности, неотличимыми от активности исходного антитела.

164. Аналог антитела по п.163, где биологическая активность представляет собой пролиферацию клеток.

165. Аналог антитела по п.164, где аналог антитела представляет собой антагонист Her2-экспрессирующих клеток, и исходное антитело представляет собой трастузумаб.

166. Аналог антитела по п.165, где аналог антитела выбран из бис-Fab 1324, бис-Fab 1328 и бис-Fab 1329.

167. Аналог антитела по п.133, где аналог антитела обладает одним или несколькими видами биологической активности, отличными от активности исходного антитела.

168. Аналог антитела по п.167, где биологическая активность аналога антитела является антагонистической, и биологическая активность исходного антитела является агонистической.

169. Аналог антитела по п.167, где биологическая активность аналога антитела является агонистической, и биологическая активность исходного антитела является антагонистической.

170. Аналог антитела по п.169, где биологическая активность представляет собой пролиферацию клеток.

171. Аналог антитела по п.170, где аналог антитела представляет собой агонист пролиферации Her2-экспрессирующих клеток, и исходное антитело представляет собой трастузумаб.

172. Аналог антитела по п.171, где аналог антитела выбран из бис-Fab 1188, бис-Fab 1321, бис-Fab 1322, бис-Fab 1323 и бис-Fab 1325.

173. Композиция, содержащая одно или несколько мультиспецифических антител, выбранных из бис-Fab 1187, бис-Fab 1189, бис-Fab 1190, бис-Fab 1191, бис-Fab 1192, бис-Fab 1193, бис-Fab 1299, бис-Fab 1300, бис-Fab 1301, бис-Fab 1302, бис-Fab 1303, бис-Fab 1304, бис-Fab 1305, бис-Fab 1306 и бис-Fab 1307.

174. Композиция, содержащая один или несколько аналогов антител, выбранных из бис-Fab 1188, бис-Fab 1204, бис-Fab 1321, бис-Fab 1322, бис-Fab 1323, бис-Fab 1324, бис-Fab 1325, бис-Fab 1326, бис-Fab 1327, бис-Fab 1328, бис-Fab 1329, бис-Fab 1400 и бис-Fab 1401.