

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033677**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.15

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)

(21) Номер заявки
201391735

(22) Дата подачи заявки
2012.05.16

(54) **CD3-СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, СПОСОБНЫЕ К СВЯЗЫВАНИЮ С CD3 ЧЕЛОВЕКА И CD3, НЕ ЯВЛЯЮЩИМСЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ**

(31) **61/488,716; 61/530,353**

(56) **US-A1-20090252683
US-A1-20100150918**

(32) **2011.05.21; 2011.09.01**

(33) **US**

(43) **2014.03.31**

(86) **PCT/US2012/038219**

(87) **WO 2012/162067 2012.11.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МАКРОДЖЕНИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Хуан Лин, Джонсон Лесли С. (US)

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

(57) Изобретение относится к CD3-связывающим молекулам, способным связываться с эпитопом CD3 человека и эпитопом CD3 млекопитающего, не являющегося человеком. Изобретение также относится к диаталам DART™, содержащим две полипептидные цепи, где первая полипептидная цепь включает домен (A), включающий указанный CD3-специфический VL-домен; домен (B), включающий VH2 второго иммуноглобулина; и домен (C); вторая полипептидная цепь включает домен (D), включающий VL2 второго иммуноглобулина; домен (E), включающий CD3-специфический VH-домен; и домен (F); причем домены (A) и (E) ассоциируются с образованием указанного антигенсвязывающего домена, который способен к иммуноспецифическому связыванию CD3; домены (B) и (D) ассоциируются с образованием сайта связывания, который иммуноспецифически связывается со вторым эпитопом, при этом указанный второй эпитоп отличен от эпитопа CD3; и домены (C) и (F) ковалентно связаны вместе. Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей такие молекулы и их антигенсвязывающие фрагменты, и находит применение для лечения злокачественного новообразования, аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний.

B1

033677

033677

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет заявки на патент США № 61/488716 (поданной 21 мая 2011 г.; находящейся на рассмотрении) и заявки на патент США № 61/530353 (поданной 1 сентября 2011 г.; находящейся на рассмотрении), каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Ссылка на список последовательностей

Заявка включает один или более списков последовательностей в соответствии в § 1.821 и далее раздела 37 Свода федеральных правил, которые представлены как на бумажном носителе, так и на машиночитаемом носителе, и эти представления на бумажном и машиночитаемом носителях включены в настоящее описание в качестве ссылки в их полном объеме.

Предпосылки создания изобретения

Область техники

Настоящее изобретение относится к CD3-связывающим молекулам, способным связываться с CD3 человека и CD3, не являющимся человеческим, и, в частности, к таким молекулам, которые обладают перекрестной реактивностью с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком (например, яванского макака). Настоящее изобретение также относится к применению таких антител и антигенсвязывающих фрагментов для лечения злокачественных новообразований, аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний и других состояний.

Описание области техники

Иммунная система организма служит защитой ряда состояний, в том числе, например, повреждения, инфекции и неоплазии, и ее медиаторами являются две отдельные, но взаимосвязанные системы: клеточная и гуморальная иммунные системы. В общем, медиаторами гуморальной системы являются растворимые продукты (антитела или иммуноглобулины), которые обладают способностью к объединению с продуктами, распознаваемыми этой системой как чужеродные для организма, и к их нейтрализации. Напротив, клеточная иммунная система включает активацию определенных клеток, названных Т-клетками, которые исполняют ряд терапевтических ролей. Т-клетки представляют собой лимфоциты, которые происходят из вилочковой железы и циркулируют между тканями, лимфатической системой и сердечно-сосудистой системой. Они действуют против, или в ответ на ряд(а) чужеродных структур (антигенов). Во многих случаях эти чужеродные антигены представлены на клетках-хозяевах в результате неоплазии или инфекции. Хотя сами Т-клетки не секретируют антитела, они обычно требуются для секреции антител вторым классом лимфоцитов, В-клетками (которые происходят из костного мозга). Немаловажно, что Т-клетки проявляют исключительную иммунологическую специфичность, чтобы быть способными отличить один антиген от другого.

Не подвергнутая воздействию Т-клетка, например Т-клетка, которая еще не столкнулась со специфическим для нее антигеном, активируется, когда она впервые сталкивается с комплексом специфический пептид:МНС на антигенпрезентирующей клетке. Антигенпрезентирующей клеткой может быть В-клетка, макрофаг или дендритная клетка. Когда не подвергнутая воздействию Т-клетка сталкивается с комплексом специфический пептид:МНС на антигенпрезентирующей клетке, через Т-клеточный рецептор доставляется сигнал, который приводит к изменению конформации молекул, связанных с функционированием лимфоцитов - Т-клеток антигенов (LFA), и увеличивает их сродство к молекулам межклеточной адгезии (ICAM), присутствующим на поверхности антигенпрезентирующей клетки. Сигнал, порождаемый при взаимодействии Т-клетки с антигенпрезентирующей клеткой, является необходимым, но недостаточным, для активации не подвергнутой воздействию Т-клетки. Необходим второй костимулирующий сигнал. Не подвергнутую воздействию Т-клетку может активировать только антигенпрезентирующая клетка, несущая как комплекс специфический пептид:МНС, так и костимулирующую молекулу на своей поверхности. Распознавание антигена не подвергнутой воздействию Т-клеткой в отсутствие костимуляции приводит к тому, что Т-клетка становится анергической. Необходимость двух сигналов для активации Т-клеток и В-клеток, так что они достигают адаптивных иммунных ответов, может обеспечить механизм избегания реакций на аутоантигены, которые могут присутствовать на антигенпрезентирующей клетке в местах в системе, в которых она может быть распознана Т-клеткой. Если контактирование Т-клетки с антигенпрезентирующей клеткой приводит к порождению лишь одного из двух необходимых сигналов, Т-клетка не становится активированной, и адаптивный иммунный ответ не имеет места.

Эффективность, с которой у людей и других млекопитающих развивается иммунологическая реакция на патогены и чужеродные вещества, зависит от двух характеристик: высокой специфичности иммунной реакции в отношении распознавания антигена и иммунологической памяти, которая создает возможность для более быстрых и более сильных ответов после повторной активации с помощью того же антигена (Portoles, P. et al. (2009) "The TCR/CD3 Complex: Opening the Gate to Successful Vaccination", Current Pharmaceutical Design 15: 3290-3300; Guy, C.S. et al. (2009) "Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR: CD3 Complex", Immunol Rev. 232(1): 7-21). Специфичность реакции Т-клеток опосредуется распознаванием антигена (представленного на антигенпрезентирующих клетках (APC)) молекулярным комплексом, включающим Т-клеточный рецептор ("TCR") и лиганд рецептора клеточной поверхно-

сти, CD3. TCR представляет собой ковалентно связанный гетеродимер из α - и β -цепей ("TCR $\alpha\beta$ "). Эти цепи являются мембранными полипептидами класса I длиной 259 (α) и 296 (β) аминокислот. Молекула CD3 представляет собой комплекс, содержащий γ -цепь CD3, δ -цепь CD3 и две ϵ -цепи CD3, связанных в виде трех димеров ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, $\zeta\zeta$,) (Guy, C.S. et al. (2009) "Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex", *Immunol Rev.* 232(1): 7-21; Call, M.E. et al. (2007) "Common Themes In The Assembly And Architecture Of Activating Immune Receptors", *Nat. Rev. Immunol.* 7: 841-850; Weiss, A. (1993) "T Cell Antigen Receptor Signal Transduction: A Tale Of Tails And Cytoplasmic Protein-Tyrosine Kinases", *Cell* 73: 209-212). Комплекс TCR и CD3, наряду с дзета-цепью - ζ -цепью CD3 (также известной как дзета-цепь Т-клеточного рецептора Т3 или CD247), включает TCR-комплекс (van der Merwe, P.A. etc. (epub Dec. 3, 2010) "Mechanisms For T Cell Receptor Triggering", *Nat. Rev. Immunol.* 11: 47-55; Wucherpfennig, K.W. et al. (2010) "Structural Biology of the T-cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation of Signaling", *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a005140). Этот комплекс особенно важен, поскольку он содержит большое число (десять) иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITAM).

В случае зрелых Т-клеток активация TCR/CD3 с помощью чужеродных антигенных пептидов, связанных с молекулами собственного МНС, является первой стадией, необходимой для размножения антигенспецифических Т-клеток и их дифференциации в эффекторные Т-лимфоциты или Т-клетки памяти. Эти процессы включают фосфорилирование иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITAM) TCR-комплекса. Поскольку TCR-комплекс содержит такое большое число ITAM (всего 10), и эти ITAM расположены последовательно один за другим (благодаря димеризации являющихся составными частями цепей), фосфорилирование соответствующих остатков тирозина в результате лигирования TCR создает спаренные места присоединения белков, которые содержат домены, гомологичные участкам Src-белка 2 (SH2), таких как связанный с ζ -цепью белок с М.м. 70 кДа (ZAP-70), и тем самым инициирует усилительный каскад передачи сигналов, который приводит к активации Т-клеток и их дифференциации (Guy, C.S. et al. (2009) "Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex", *Immunol Rev.* 232 (1):7-21).

Результат этих процессов регулируется интенсивностью и качеством антигенного стимула, а также природой сопроводительных сигналов, передаваемых корецептором и костимулирующими поверхностными молекулами, или рецепторами цитокинов (Portoles, P. et al. (2009) "The TCR/CD3 Complex: Opening the Gate to Successful Vaccination", *Current Pharmaceutical Design* 15: 3290-3300; Riha, P. et al. (2010) "CD28 Co-Signaling In The Adaptive Immune Response", *Self/Nonself* 1(3): 231-240). Хотя стимуляция TCR является необходимым условием для активации Т-клеток, общепризнано, что вхождение в контакт с костимулирующими молекулами, такими как CD28, необходимо для полной активации Т-клеток и их дифференциации (Guy, C.S. et al. (2009) "Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex", *Immunol Rev.* 232 (1):7-21).

Вследствие фундаментальности CD3 в инициации ответов на антигены были предложены моноклональные антитела против этого рецептора, которые способны к блокированию или, по крайней мере, модулированию иммунного процесса, и, таким образом, в качестве средств для лечения воспалительного и/или аутоиммунного заболевания. В самом деле, антитела против CD3 были первым антителом, разрешенным для лечения людей (St. Clair E.W. (2009) "Novel Targeted Therapies for Autoimmunity", *Curr. Opin. Immunol.* 21(6): 648-657). Антитело против CD3 (продаваемое Janssen-Cilag как ORTHOCLONE™ ОКТ3™) вводили для уменьшения острого отторжения у пациентов с трансплантатами органов и в качестве лечения лимфобластного лейкоза (Cosimi, A.B. et al. (1981) "Use Of Monoclonal Antibodies To T-Cell Subsets For Immunologic Monitoring And Treatment In Recipients Of Renal Allografts", *N. Engl. J. Med.* 305: 308-314; Rung, P. et al. (1979) Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens", *Science* 206: 347-349; Vigerl, P. et al. (1986) "Prophylactic Use Of OKT3 Monoclonal Antibody In Cadaver Kidney Recipients. Utilization Of OKT3 As The Sole Immunosuppressive Agent", *Transplantation* 41: 730-733; Midtvedt, K. et al. (2003) "Individualized T Cell Monitored Administration Of ATG Versus OKT3 In Steroid-Resistant Kidney Graft Rejection", *Clin. Transplant.* 17(1): 69-74; Gramatzki, M. et al. (1995) "Therapy With OKT3 Monoclonal Antibody In Refractory T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Induces Interleukin-2 Responsiveness", *Leukemia* 9(3): 382-390; Herold, K.C. et al. (2002) "Anti-CD3 Monoclonal Antibody In New-Onset Type I Diabetes Mellitus", *N. Engl. J. Med.* 346: 1692-1698; Cole, M.S. et al. (1997) "Human IgG2 Variants Of Chimeric Anti-CD3 Are Nonmitogenic to T cells", *J. Immunol.* 159(7): 3613-3621; Cole, M.S. et al. (1999) "Hum291, A Humanized Anti-CD3 Antibody, Is Immunosuppressive To T Cells While Exhibiting Reduced Mitogenicity in vitro", *Transplantation* 68: 563-571; патенты США №№ 6491916, 5585097 и 6706265).

Однако лечение такими антителами против CD3 не было признано в достаточной степени специфическим во избежание побочных эффектов (Ludvigsson, J. (2009) "The Role of Immunomodulation Therapy in Autoimmune Diabetes", *J. Diabetes Sci. Technol.* 3(2): 320-330). Многократное ежедневное введение ОКТ3 приводит к сильной иммуносупрессии и обеспечивает эффективное лечение отторжения после трансплантации почки. In vivo введение ОКТ3 приводит как к активации Т-клеток, так и к подавлению иммунных ответов. Однако применению ОКТ3 препятствовал синдром реакции на первую токсическую

дозу, который связан с событиями первоначальной активации Т-клеток и с обеспечением выброса цитокинов, который имеет место до иммуносупрессии Т-клеточных реакций. Описанные в литературе побочные эффекты, которые следуют за первой, а иногда второй инъекцией этого мышинового моноклонального антитела, включают "гриппоподобный" синдром, состоящий из высокой температуры, озноба, головной боли и желудочно-кишечных симптомов (рвоты и диареи), а в тяжелых случаях отмечается отек легких в пределах часов лечения (Thistlethwaite, J.R. Jr. et al. (1988) "Complications and Monitoring of OKT3 Therapy", *Am. J. Kidney Dis.* 11:112-119). Этот синдром, как полагают, служит отражением ОКТ3-опосредуемого перекрестного сшивания комплекса TCR/CD3 на поверхности Т-клеток и результирующего выброса цитокинов (например, фактора альфа некроза опухолей (TNF α), интерферона- γ , интерлейкинов IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10 и гранулоцитарно-макрофагального колоннестимулирующего фактора (Masharani, U.B. et al. (2010) "Teplizumab Therapy For Type I Diabetes", *Expert Opin. Biol. Ther.* 10(3): 459-465; Abramowicz, D. et al. (1989) "Release Of Tumor Necrosis Factor, Interleukin-2, And Gamma-Interferon In Serum After Injection Of OKT3 Monoclonal Antibody In Kidney Transplant Recipients", *Transplantation* 47: 606-608; Ferran, C. et al. (1990) "Cytokine-Related Syndrome Following Injection Of Anti-CD3 Monoclonal Antibody: Further Evidence For Transient In Vivo T Cell Activation", *Eur. J. Immunol.* 20: 509-515; Hirsch, R. et al. (1989) "Effects Of In Vivo Administration Of Anti-CD3 Monoclonal Antibody On T Cell Function In Mice. II. In Vivo Activation Of T Cells", *J. Immunol.* 142: 737-743)). Применение антител против CD3 описано в патентах США №№ 7883703, 7728114, 7635472, 7575923 и 7381903 и в публикациях заявок на патенты США №№ 2010/0150918, 2010/0209437, 2010/0183554, 2010/0015142, 2008/0095766, 2007/0077246 и публикации РСТ-заявки № WO2008/119567.

Особым недостатком прежних антител является их специфичность в отношении только CD3 человека. Этот недостаток является значительной помехой в разработке таких антител, как терапевтические средства для лечения заболеваний у человека. Для получения разрешения на сбыт любое новое лекарственное средство-кандидат должно пройти тщательную проверку. Эту проверку можно подразделить на преклиническую и клиническую фазы. Тогда как клиническую проверку, дополнительно подразделяемую на общеизвестные клинические фазы I, II и III, выполняют на являющихся людьми пациентах, преклиническую проверку выполняют на животных. Целью преклинической проверки является подтверждение того, что лекарственное средство-кандидат обладает желаемой активностью и, самое важное, является безопасным. Только в случае установления при преклинической проверке безопасности для животных и возможной эффективности лекарственного средства-кандидата соответствующим регулирующим органом будет разрешена клиническая проверка на людях этого лекарственного средства-кандидата. Безопасность лекарственных средств-кандидатов может быть проверена на животных тремя следующими путями: (i) на релевантном виде, т.е. виде, в котором лекарственные средства-кандидаты могут распознать ортологичные антигены, (ii) на трансгенном животном, содержащем антигены человека, и (iii) посредством использования заменителя лекарственного средства-кандидата, который может связываться с ортологичными антигенами, присутствующими у животного. Недостатками трансгенных животных является то, что эта технология типично приурочена к грызунам. Однако грызуны и люди имеют значительные различия в физиологии, которые могут затруднять экстраполяцию полученных на грызунах данных, относящихся к безопасности, для предсказания безопасности для людей. Недостатками заменителя лекарственного средства-кандидата является отличное химическое соединение по сравнению с фактическим лекарственным средством-кандидатом, и часто используемыми животными являются грызуны с обсуждавшимися выше недостатками. Следовательно, преклинические данные, полученные на грызунах, обладают ограниченной прогнозирующей способностью, что касается лекарственного средства-кандидата.

Предпочтительным подходом к проверке безопасности является использование релевантного вида, предпочтительно низшего примата. Теперь недостатком CD3-связывающих молекул, подходящих для терапевтического воздействия на человека, описанных в данной области техники, является то, что релевантными видами являются высшие приматы, в частности яванские макаки. Соответственно в высокой степени желательным является антитело против CD3, способное связываться как с CD3 человека, так и с CD3 примата. Такие антитела описаны в публикации заявки на патент США с № 20100150918 и в публикации РСТ-заявки с № WO2008/119567.

Несмотря на такие успехи, сохраняется потребность в антителах против CD3 человека и их антигенсвязывающих фрагментах, которые способны перекрестно реагировать с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком (например, яванского макака). Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность и потребность в улучшенных терапевтических средствах от злокачественного новообразования, аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к CD3-связывающим молекулам, способным к связыванию с CD3 человека и CD3, не являющимся человеческим, и, в частности, к таким молекулам, которые обладают перекрестной реактивностью с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком (например, яванского макака). Настоящее изобретение также имеет отношение к применениям таких антител и антигенсвязывающих фрагментов для лечения злокачественных новообразований, аутоиммунных и/или воспа-

лительных заболеваний и других состояний.

Подробно, настоящим изобретением обеспечивается CD3-связывающая молекула, включающая антигенсвязывающий фрагмент антитела, причем антигенсвязывающий фрагмент включает CD3-специфический VL-домен антитела и CD3-специфический VH-домен антитела, причем CD3-специфический VL-домен и CD3-специфический VH-домен образуют антигенсвязывающий домен, способный к иммуноспецифическому связыванию как с эпитопом CD3 человека, так и с эпитопом CD3 млекопитающего, не являющегося человеком, причем:

(I) CD3-специфический VL-домен выбирают из группы, состоящей из VL-4 h-mab2 (SEQ ID NO: 22), VL-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 26), VL-7 h-mab2 (SEQ ID NO: 28), VL-8 h-mab2 (SEQ ID NO: 30), VL-9 h-mab2 (SEQ ID NO: 32) и VL-10 h-mab2 (SEQ ID NO: 34), а указанный CD3-специфический VH-домен выбирают из группы, состоящей из VH-1 h-mab2 (SEQ ID NO: 36), VH-2 h-mab2 (SEQ ID NO: 38), VH-3 h-mab2 (SEQ ID NO: 40), VH-4 h-mab2 (SEQ ID NO: 42), VH-5 h-mab2 (SEQ ID NO: 44), VH-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 46), VH-7 h-mab2 (SEQ ID NO: 48), VH-8 h-mab2 (SEQ ID NO: 50).

Настоящее изобретение, в частности, имеет отношение к варианту осуществления описанной выше CD3-связывающей молекулы, в котором CD3-специфическим VL-доменом является VL-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 26).

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанной выше CD3-связывающей молекулы, в котором CD3-специфическим VH-доменом является VH-8 h-mab2 (SEQ ID NO: 50) или VH-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 46).

Настоящее изобретение, в частности, имеет отношение к варианту осуществления описанной выше CD3-связывающей молекулы, в котором молекулой является антитело и, в частности, в котором в антителе отсутствует Fc-область, или оно включает Fc-область, которая:

(A) испытывает недостаток эффекторной функции либо обладает уменьшенной эффекторной функцией или

(B) подвергнута модифицированию, которое ослабляет способность Fc-области антитела к связыванию с Fc-рецептором; причем уменьшение эффекторной функции и ослабление связывающей способности имеет место относительно таковой Fc-области дикого типа.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул, в котором молекулой является CD3-связывающее диатело, которое включает первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, при этом цепи ковалентно связаны друг с другом, причем:

I. первая полипептидная цепь включает amino-конец и карбоксильный конец и от N-конца к C-концу:

(i) домен (A), включающий CD3-специфический VL-домен;

(ii) домен (B), включающий связывающую область переменного домена тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2); и

(iii) домен (C);

причем домены (A) и (B) не ассоциируются друг с другом с образованием эпитопсвязывающего сайта; и

(II) вторая полипептидная цепь включает amino-конец и карбоксильный конец и от N-конца к C-концу:

(i) домен (D), включающий связывающую область переменного домена легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2);

(ii) домен (E), включающий CD3-специфический VH-домен; и

(iii) домен (F);

причем домены (D) и (E) не ассоциируются друг с другом с образованием эпитопсвязывающего сайта;

причем:

(1) домены (A) и (E) ассоциируются с образованием антигенсвязывающего домена, который способен к иммуноспецифическому связыванию как с CD3 человека, так и с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком;

(2) домены (B) и (D) ассоциируются с образованием сайта связывания, который иммуноспецифически связывается со вторым эпитопом, при этом второй эпитоп отличен от эпитопа CD3, с которым связывается антигенсвязывающий домен, образованный вследствие ассоциации доменов (A) и (E); и

(3) домены (C) и (F) ковалентно связаны вместе. Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул, в котором вторым эпитопом не является эпитоп CD3.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул, в котором вторым эпитопом является эпитоп CD3, который отличен от эпитопа CD3, с которым связывается антигенсвязывающий домен, образованный вследствие ассоциации доменов (A) и (E).

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше

CD3-связывающих молекул или антител или диател, в котором такая молекула является гуманизированной.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул или антител или диател, в котором такая молекула способна к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и флуоресцеином.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул или диател, в котором такая молекула способна к иммуноспецифическому связыванию как с (i) CD3, так и с (ii) (a) опухолеспецифическим антигеном, или (ii)(b) антигеном клеточной поверхности, рецептором или лигандом рецептора клеточной поверхности.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул или диател, в котором молекула или диатело способны к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и опухолеспецифическим антигеном, представленным на опухолевой клетке, причем опухолевой клеткой является клетка злокачественного новообразования, выбираемого из группы, состоящей из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака желудка, рака легкого, рака желудка, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичника, рака ротовой полости, рака глотки, рака пищевода, рака гортани, рака кости, рака кожи, меланомы, рака матки, рака яичек, рака мочевого пузыря, рака почки, рака головного мозга, глиобластомы, рака щитовидной железы, лимфомы, миеломы и лейкоза.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул или диател, в котором молекула или диатело способны к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и антигеном клеточной поверхности, рецептором или лигандом рецептора клеточной поверхности, причем антигеном клеточной поверхности, рецептором или лигандом рецептора клеточной поверхности является HER2/neu, B7-H3, CD20, PSMA, IGF-1R, Ep-CAM, или является молекула, которая вовлечена в ассоциацию Т-клетки с В-клеткой, которая приводит к активации Т-клетки или В-клетки в ходе адаптивного иммунного ответа.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул или диател, в котором молекула или диатело способны к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и с молекулой, которая вовлечена в ассоциацию Т-клетки с В-клеткой, и молекулу, которая вовлечена в ассоциацию Т-клетки с В-клеткой, выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD32B, CD38, CD40, CD79a, CD79b, CD80, CD86, LFA-I, LFA-3 и CFA-I.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к фармацевтической композиции, включающей любую из описанных выше CD3-связывающих молекул, антител или диател и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к описанной выше фармацевтической композиции для применения для лечения злокачественного новообразования или аутоиммунного или воспалительного заболевания.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к описанной выше фармацевтической композиции для применения для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, выбираемого из группы, состоящей из инсулинозависимого диабета типа I, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, рассеянного склероза, воспалительного заболевания кишечника, злокачественной миастении, глютеновой болезни, синдрома Гужеро-Шегрена, болезни Грейвса, болезни Крона, аутоиммунного гепатита, псориаза, псориатического артрита, астмы, аллергического ринита, эффектов вследствие трансплантации органа или гомологичной болезни (GVHD). Настоящее изобретение, в частности, имеет отношение к описанной выше фармацевтической композиции для применения для лечения инсулинозависимого диабета типа I.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A-1B представлены результаты ELISA с захватом, в случае которого способность антитела против CD3 mAB1 (фиг. 1A) или химерного производного антитела mAB1 (ch-mAb1) (фиг. 1B) оценивали, используя растворимый CD3 человека ("shCD3").

На фиг. 2A-2B представлены результаты ELISA с захватом, в случае которого способность антитела против CD3 mAB2 (фиг. 2A) или химерного производного антитела mAB2 (ch-mAb2) (фиг. 2B) оценивали, используя растворимый CD3 человека ("shCD3") или растворимый CD3 яванского макака ("scCD3").

На фиг. 3 представлены результаты анализов для определения эффекта вариаций пронумерованных согласно Kabat остатков 41-46 каркасных областей легкой цепи mAB2.

На фиг. 4 представлены результаты анализов для определения эффекта вариаций пронумерованных согласно Kabat остатков 36, 38, 44 и 46 каркасных областей легкой цепи mAB2.

На фиг. 5 представлены результаты анализов для определения эффекта вариаций пронумерованных согласно Kabat остатков 36, 38 и 46 каркасных областей легкой цепи mAB2.

На фиг. 6 представлены результаты анализов для определения эффекта вариаций пронумерованных согласно Kabat остатков 30, 49 и 93 каркасных областей тяжелой цепи mAB2.

На фиг. 7 представлены результаты дополнительных анализов, проведенных для определения эффекта вариаций пронумерованных согласно Kabat остатков 30, 49 и 93 каркасных областей тяжелой цепи

mAB2.

На фиг. 8А-8В представлены результаты анализов, проведенных для определения способности химерного и гуманизированного mAB2 к связыванию с CD3, не являющимся человеческим.

На фиг. 9А-9D представлены записи сенсограмм анализов BIACORE™, выполненных для определения кинетики связывания ch-mAB2 или h-mAb2 с scCD3 или scCD3.

На фиг. 10А-10D представлены результаты ELISA с захватом выполненных на диателах DART™, содержащих способный к связыванию с CD3 первый эпитопсвязывающий сайт и второй эпитопсвязывающий сайт, который связывается с или Her2/neu, или CD19, или EGFR, или B7-H3.

На фиг. 11А-11В показана способность B7H3×CD3-биспецифических диател DART™ к опосредованию перенаправленного уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих B7H3.

На фиг. 12А-12Е показана способность A33×CD3-биспецифических диател DART™ к опосредованию перенаправленного уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих A33.

На фиг. 13А и 13В представлены результаты сравнения способности диатела DART™ CD19-h-mAb2 и CD19×CD3-биспецифического диатела к вызову перенаправленного, опосредованного Т-клетками уничтожения. Диатело DART™ CD19-h-mAb2 проявляет специфичность в отношении CD3 человека, а также CD3, не являющимся человеческим; CD19×CD3-биспецифическое диатело DART™ проявляет специфичность в отношении только CD3 человека. Фиг. 13А: перенаправленное уничтожение клеток В-клеточной лимфомы человека Raji; фиг. 13В: перенаправленное уничтожение клеток лимфомы из клеток ткани JeRo-1.

На фиг. 14А и 14В показано, что диатело DART™ CD19-h-mAb2 по настоящему изобретению было способно к опосредованию цитолиза в присутствии Т-клеток-эффикторов или человека, или яванского макака.

На фиг. 15А и 15В показана способность диатела DART™ ERBITUX™-h-mAb2 по настоящему изобретению или (ERBITUX™-Т-клеточный рецептор)-биспецифического диатела DART™ к опосредованию увеличения MFI CD69 после инкубации с CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетками. Контрольное диатело ERBITUX™-CD3 FN18 DART™ (способное к связыванию с EGFR и с CD3 яванского макака) не вызывало увеличение MFI CD69.

На фиг. 16А-16D представлены результаты исследований в отношении связывания или диатела DART™ ERBITUX™-h-mAb2, диатела DART™ ERBITUX™-m-mAb2, или диатела DART™ 4420-h-mAb2 (в качестве отрицательно контроля) или контрольного второго антитела с клетками A498 или A431 (фиг. 16А и 16С соответственно) и в отношении опосредования перенаправленного уничтожения таких клеток (фиг. 16В и 16D соответственно).

Подробное описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам против CD3 человека и их антигенсвязывающим фрагментам и, в частности, к таким антителам, которые обладают перекрестной реактивностью с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком (например, яванского макака). Настоящее изобретение также имеет отношение к применениям таких антител и антигенсвязывающих фрагментов для лечения злокачественных новообразований, аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний и других состояний.

I. Определения.

Используемый здесь термин "CD3-связывающая молекула" означает молекулу, способную к иммуноспецифическому связыванию как с CD3 человека, так и с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком, благодаря по крайней мере одному сайту распознавания антигена (например, антигенсвязывающему домену антитела), находящемуся в варибельной области молекулы. Как здесь используется, такая способность к иммуноспецифическому связыванию как с CD3 человека, так и с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком, как предполагается, не означает способность одного антигенсвязывающего домена к одновременному связыванию обеих таких молекул CD3, а точнее означает, что такой антигенсвязывающий домен проявляет перекрестную реактивность, так что он будет иммуноспецифически связываться с CD3 человека при инкубации в присутствии CD3 человека и будет иммуноспецифически связываться с CD3 не являющегося человеком млекопитающего при инкубации в присутствии такого CD3 не являющегося человеком млекопитающего.

Используемый здесь термин "CD3-связывающая молекула" охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂Fv), одиночную цепь (ScFv), их мутанты, встречающиеся в природе варианты, слитые белки, включающие часть белка с сайтом распознавания антигена требуемой специфичности, гуманизированные антитела, химерные антитела, "BiTE®", молекулы диател "DART™" и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает сайт распознавания антигена требуемой специфичности. Термин "BiTE" (биспецифические рекрутеры Т-клеток) относится к одноцепочечной полипептидной молекуле, которая имеет два антигенсвязывающих домена, один из которых связывается с Т-клеточным антигеном, а второй из которых связывается с антигеном, присутствующим на поверхности мишени (WO 05/061547; Baeuerle, P. et al. (2008) "BiTE®: A New Class Of Antibodies That Recruit T Cells",

Drugs of the Future 33: 137-147; Bargou, et al. 2008) "Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody Science 321: 974-977).

Термин диатело "DART™" (перенаправляющий реагент с двумя аффинностями) относится к молекуле иммуноглобулина, которая включает по крайней мере две полипептидные цепи, которые ассоциируются (главным образом посредством ковалентной взаимосвязи) с образованием по крайней мере двух эпитопсвязывающих сайтов, которые могут распознавать один и тот же эпитоп или отличные эпитопы. Каждая из полипептидных цепей диатела DART™ включает вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина и вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, но эти области не взаимодействуют с образованием эпитопсвязывающего сайта. Точнее, вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина одной (например, первой) из полипептидных цепей диатела DART™ взаимодействует с вариабельной областью легкой цепи иммуноглобулина отличной (например, второй) полипептидной цепи DART™ с образованием эпитопсвязывающего сайта. Аналогично, вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина одной (например, первой) из полипептидных цепей диатела DART™ взаимодействует с вариабельной областью тяжелой цепи иммуноглобулина отличной (например, второй) полипептидной цепи DART™ с образованием эпитопсвязывающего сайта. Диатела DART™ могут быть моноспецифическими, биспецифическими, триспецифическими и т.д., таким образом, обладая способностью к одновременному связыванию одного, двух, трех или более различных эпитопов (которые могут быть из одинаковых или различных антигенов). Диатела DART™ могут быть, кроме того, одновалентными, двухвалентными, трехвалентными, четырехвалентными, пятивалентными, шестивалентными и т.д., таким образом, обладая способностью к одновременному связыванию одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или более молекул. Эти две характеристики диател DART™ (т.е. степень специфичности и валентности) могут быть объединены, например, с получением биспецифических антител (т.е. способных к связыванию двух эпитопов), которые являются четырехвалентными (т.е. способными к связыванию четырех рядов эпитопов), и т.д. Молекулы диател DART™ описаны в публикациях PCT-заявок №№ WO 2006/113665, WO 2008/157379 и WO 2010/080538.

Биспецифические (или триспецифические, или полиспецифические) молекулы по настоящему изобретению будут способны к связыванию как с CD3 человека, так и с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком (например, яванского макака), а также со вторым (или дополнительным) и отличным антигеном(ами) и эпитопом(ами). Вторым антигеном или эпитопом предпочтительно является опухолеспецифический антиген, представленный на опухолевой клетке. Такие опухолевые клетки могут быть из злокачественных новообразований, например рака молочной железы, рака предстательной железы, рака желудка, рака легкого, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичника, рака ротовой полости, рака глотки, рака пищевода, рака гортани, рака кости, рака кожи, меланомы, рака матки, рака яичек, рака мочевого пузыря, рака почки, рака головного мозга, глиобластомы, рака щитовидной железы, лимфомы, миеломы или лейкоза. Дополнительными антигенами или эпитопами предпочтительно являются опухолеспецифические антигены или эпитопы на клеточной поверхности (такие как 17-1A, A33, основной антиген I эндодермального происхождения на эритроцитах взрослого человека, альфа-фетопротеин, антиген оболочки РНК-вируса опухоли, онкоэмбриональный антиген, специфический для опухоли мочевого пузыря, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6, специфический для лимфомы Беркитта антиген-38.13, CA125, CD18, CD19, специфический для В-клеточной лимфомы человека антиген-CD20, CD22, CD33, CD44, CD52, CEA, CO17-1A, CTA-1, CTLA-4, рецептор эпидермального фактора роста, Ep-CAM, EphA2, антиген I на эритроцитах новорожденного, антиген фибросаркомы, ганглиозид GD2, ганглиозид GD3, ганглиозид GM2, ганглиозид GM3, GICA 19-9, gp IIIb/IIIa, gp72, HER1, HER-2/neu, HER3, HER4, специфический для меланомы антиген с большой молекулярной массой, антиген HLA-DR, специфический для лейкоза человека Т-клеточный антиген-Gp37, специфический для карциномы легкого человека антиген L20, специфический для карциномы легкого человека антиген L6, антиген в виде глобулярной частицы молочного жира человека, IgE, специфический для карциномы KS 1/4 рап антиген, LEA, специфический для аденокарциномы антиген F3, специфический для злокачественных лимфоцитов человека антиген-APO-1, специфический для меланомы антиген gp75, связанный с меланомой антиген p97, неогликопротеин, puC242, специфический для полиморфного эпителия антиген муцинового типа, специфический для предстательной железы антиген, специфический для предстательной железы мембранный антиген, специфический для предстательной железы кислый фосфат, антиген SK-1, TAG-72, Т-антиген, опухолеспецифический антиген CA125, опухолеспецифический антиген MUC1, опухолеспецифический трансплантационный антиген клеточной поверхности, фактор роста сосудистого эндотелия, рецептор фактора роста сосудистого эндотелия и $\alpha\beta 3$). Альтернативно, такие дополнительные антигены или эпитопы могут быть связаны с патогеном, таким как вирус гепатита типа А, вирус гепатита типа В, вирус гепатита типа С, вирус гриппа, вирус ветряной оспы, аденовирус, вирус простого герпеса типа I (HSV-I), вирус простого герпеса типа II (HSV-II), возбудитель чумы рогатого скота, риновирус, ECHO-вирус, ротавирус, респираторно-синцитиальный вирус, папилломавирус, паповавирус, цитомегаловирус, эхиновирус, арбовирус, хантавирус, коксаки-вирус, вирус эпидемического паротита, вирус кори, вирус краснухи, полиовирус, возбудитель натуральной оспы, вирус Эпштейна-

Барра, вирус иммунодефицита человека типа I (HIV-I), вирус иммунодефицита человека типа II (HIV-II), возбудитель вирусного менингита, возбудитель вирусного энцефалита, возбудитель денге, возбудитель натуральной оспы; микобактерии, рикеттсии, микопlasма, нейссерии, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, возбудитель столбняка, возбудитель коклюша, возбудитель холеры, возбудитель чумы, возбудитель дифтерии, хламидии и легионеллы; лейшмания, возбудитель кокцидиоза, трипаносома или возбудитель малярии; хламидии и рикеттсии.

Термин "моноклональное антитело" относится к гомогенной совокупности антител, причем моноклональное антитело состоит из аминокислот (встречающихся в природе и не встречающихся в природе), которые участвуют в избирательном связывании антигена. Моноклональные антитела являются в высокой степени специфическими, будучи направленными против одной области детерминанты. Термин "моноклональное антитело" охватывает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂Fv), одиночную цепь (ScFv), их мутанты, слитые белки, включающие часть антитела, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает сайт распознавания антигена требуемой специфичности и со способностью связываться с антигеном. Оно, как предполагается, не ограничивается источником антитела или способом, которым его получают (например, с использованием гибридомы, отбора фагов, экспрессии рекомбинантных молекул, трансгенных животных и т.д.). Термин включает полные иммуноглобулины, а также фрагменты и т.д., описанные выше при определении "антитела".

Термин "гуманизированное антитело" относится к химерной молекуле, обычно приготовленной, используя методы с использованием рекомбинантных ДНК, имеющей антигенсвязывающий сайт, происходящий из иммуноглобулина не являющегося человеком вида, а остальная структура молекулы иммуноглобулина основана на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Антигенсвязывающий сайт может включать или целые переменные домены, вставленные в константные домены, или лишь определяющие комплементарность участки (CDR), пересаженные в соответствующие каркасные области переменных доменов. Антигенсвязывающие сайты могут быть дикого типа или быть модифицированными в результате одной или более аминокислотных замен. Это исключает функционирование константной области в качестве иммуногена у являющихся людьми индивидуумов, но сохраняется возможность иммунного ответа на чужеродную переменную область (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 4220-4224). Другой подход сосредоточен не только на обеспечении происходящих от человека константных областей, но также на модификации переменных областей, чтобы придать им новую форму, по возможности близкую к человеческой форме. Известно, что переменные области как тяжелой, так и легкой цепей содержат три определяющих комплементарность участка (CDR), которые варьируют в ответ на соответствующие антигены и определяют способность к связыванию, фланкированных четырьмя каркасными областями (FR), которые являются относительно консервативными у конкретного вида и которые предположительно обеспечивают каркас для CDR. При приготовлении нечеловеческих антител к конкретному антигену переменным областям можно "придать новую форму" или "подвергнуть их гуманизации" посредством пересадки CDR, происходящих из нечеловеческого антитела, в FR, присутствующие в антителе человека, которые модифицируют. О применении этого подхода к различным антителам было сообщено в Sato, K. et al. (1993) *Cancer Res* 53: 851-856; Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", *Science* 239: 1534-1536; Kettleborough, C.A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation", *Protein Engineering* 4: 773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity", *Human Antibodies Hybridoma* 2: 124-134; Gorman, S.D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo", *Bio/Technology* 9: 266-271; Co, M.S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-pl85her2 Antibody For Human Cancer Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89: 4285-4289; и Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen", *J. Immunol.* 148: 1149-1154.

В некоторых вариантах осуществления в гуманизированных антителах сохранены все последовательности CDR (например, в гуманизированном мышинном антителе, которое содержит все шесть CDR из мышинных антител). В других вариантах осуществления гуманизированные антитела содержат один или более CDR (один, два, три, четыре, пять, шесть), которые изменены относительно исходного антитела, которые также называют одним или более CDR, "происходящих от" одного или более CDR исходного антитела. Как описано ниже, предпочтительные антитела по настоящему изобретению содержат специфические идентифицированные CDR. В настоящем изобретении, однако, предусматриваются эквивалентные антитела, содержащие измененные CDR.

Говорят, что антитело или полипептид, как здесь используется, "иммуноспецифически" или, что эк-

ввалентно, "специфически" связывается с участком другой молекулы (т.е. эпитопом), если оно реагирует или ассоциируются более часто, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с этим эпитопом, чем с альтернативными эпитопами. Например, антителом, которое специфически связывается с эпитопом CD3, является антитело, которое связывается с этим эпитопом CD3 с большей аффинностью, авидностью, быстрее и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими эпитопами CD3 или не относящимися к CD3 эпитопами. Под интерпретацией этого определения также подразумевается, что, например, антитело (или составляющая или эпитоп), которое иммуноспецифически связывается с первой мишенью, может связываться или может не связываться специфически или предпочтительно со второй мишенью. По существу, "иммуноспецифическое связывание" не подразумевает обязательно (хотя оно может включать) "исключительное" связывание. Как правило, но необязательно, ссылка на связывание означает "иммуноспецифическое" связывание.

Используемый здесь термин "иммунологически активный" в отношении эпитопа, являющегося или "остающегося иммунологически активным", относится к способности антитела (например, антитела против CD3) к связыванию с эпитопом в различных условиях, например после подвергания эпитопа воздействию восстанавливающих и денатурирующих условий. Например, если антитело больше не способно связываться с денатурированным эпитопом, говорят, что этот эпитоп сделался иммунологически неактивным.

Различные биологические функции связаны с антителами против CD3 по настоящему изобретению, и такие антитела могут проявлять любое или все из следующих характерных свойств, или могут испытывать недостаток одного, двух, трех или более таких характерных свойств: способность к специфическому связыванию с CD3 человека, который эндогенно представлен на поверхности нормальной Т-клетки человека; способность к специфическому связыванию с CD3 человека, который эндогенно представлен на поверхности лейкозной Т-клетки человека; способность к специфическому связыванию с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком (например, яванского макака), который эндогенно представлен на поверхности нормальной Т-клетки не являющегося человеком млекопитающего; способность к специфическому связыванию с CD3, не являющимся человеческим, который эндогенно представлен на поверхности нормальной нечеловеческой Т-клетки; способность к специфическому связыванию с CD3, не являющимся человеческим, который эндогенно представлен на поверхности нечеловеческой лейкозной Т-клетки; способность нейтрализовать (т.е. блокировать или препятствовать связыванию) образование комплекса с CD3; способность нейтрализовать образование комплекса с TCR; способность к модулированию (или антагонистически, или агонистически) передачи сигнала TCR-комплексом; способность к связыванию с Fc-рецептором; способность к конкурентному ингибированию предпочтительного связывания известного антитела против CD3 с CD3, включая способность к предпочтительному связыванию с тем же эпитопом CD3, с которым предпочтительно связывается исходное антитело; способность к связыванию с частью CD3, которая представлена на поверхности живой клетки *in vitro* или *in vivo*; способность к связыванию с частью CD3, которая представлена на поверхности живой раковой клетки; способность к доставке химиотерапевтического средства в раковую Т-клетку; и/или способность к доставке терапевтического средства, токсина или выявляемого маркера в Т-клетку. Как здесь обсуждалось, полипептиды (в том числе антитела) по настоящему изобретению могут обладать любым одним или более из этих характерных свойств.

Используемый здесь термин "средство (агент)" относится к биологическому, фармацевтическому или химическому соединению. Неограничивающие примеры включают простую или сложную органическую или неорганическую молекулу, пептид, белок, олигонуклеотид, антитело, производное антитела, фрагмент антитела, производное витамина, углевод, токсин или химиотерапевтическое соединение. Можно синтезировать различные соединения, например небольшие молекулы и олигомеры (например, олигопептиды и олигонуклеотиды), и синтетические органические соединения, основанные на различных базовых структурах. Кроме того, различные природные источники, такие как экстракты из растений или животных и т.п., могут предоставить соединения для отбора. Агенты, используемые в способах по этому изобретению, могут быть отобраны случайно или отобраны рационально или сконструированы. Говорят, что агент, как здесь используется, отобран случайно, если агент выбран без предварительного рассмотрения специфических аминокислотных или других химических составляющих, участвующих в ассоциации молекулы с ее природным партнером(ами) по связыванию или известными антителами, или без знания о них. Примером случайно отобранного агента является агент, который идентифицирован благодаря использованию химической библиотеки или пептидной комбинаторной библиотеки или ее скринингу. Говорят, что агент, как здесь используется, отобран рационально или сконструирован, если агент выбран на неслучайной основе, учитывающей последовательность центра мишени и/или его конформацию в связи с действием этого агента. Агент можно отобрать рационально или сконструировать рационально посредством использования пептидных последовательностей, которые образуют места контактов в комплексе рецептор/лиганд и/или CD3/антитело против CD3. Например, рационально отобранным агентом в виде пептида может быть пептид, аминокислотная последовательность которого идентична эпитопу, появляющемуся в CD3, когда он выставлен на поверхности живой клетки в ее природном окружении. Такой агент будет уменьшать или блокировать ассоциацию антитела против CD3 с CD3, или

ассоциацию CD3 с его природным лигандом, по желанию, при связывании с антителом против CD3 или с его природным лигандом.

Используемый здесь термин "мечено", что касается антитела, как предполагается, охватывает прямое мечение антитела посредством соединения (т.е. физической связи) выявляемого вещества, такого как радиоактивный агент или флуорофор (например, фикоэритрин (PE) или флуоресцеин изотиоцианат (также известный как фторизотиоцианат или FITC) с антителом, а также не прямое мечение зонда или антитела в результате реактивности с выявляемым веществом.

Используемый здесь термин "ассоциация", что касается антитела, включает ковалентное или нековалентное присоединение или связывание агента (например, химиотерапевтического средства) к (с) антителу(ом). Ассоциацию антитела с агентом (например, химиотерапевтическим средством) можно осуществить посредством прямого связывания или непрямого связывания через присоединение к общей платформе, так что антитело определяет локализацию агента в раковой клетке, с которой связывается антитело, и причем антитело и агент не подвергаются в значительной степени диссоциации при физиологических условиях, так что агент не направлен на ту же раковую клетку, с которой связывается антитело, или так что эффективность агента не уменьшается.

Термин "биологический образец" охватывает множество типов образцов, которые получают от индивидуума и могут использоваться в исследовании с целью диагностики или контроля. Определение охватывает слюну, кровь и другие жидкие образцы биологического происхождения, твердые образцы тканей, такие как биопсийный образец, или культуры тканей или клетки, происходящие из них, и их потомство, например клетки, полученные из образца ткани, взятого у индивидуума с подозрением на наличие у него рака, в предпочтительных вариантах осуществления ткани яичника, легкого, предстательной железы, поджелудочной железы, ободочной кишки и молочной железы. Определение также включает образцы, которыми манипулировали после их получения любым образом, например посредством обработки реагентами, солиubilизации или обогащения в отношении определенных компонентов, таких как белки или полинуклеотиды, или заделки в полутвердую или твердую матрицу с целью изготовления срезов. Термин "биологический образец" охватывает клинический образец, а также включает клетки в культуре, клеточные супернатанты, клеточные лизаты, сыворотку, плазму, биологическую жидкость и образцы тканей.

Термин "клетка-хозяин" включает отдельную клетку или культуру клеток, которая может быть или была реципиентом вектора(ов) для включения полинуклеотидных вставок. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, и это потомство может необязательно быть полностью идентичным (по морфологии или набору геномных ДНК) исходной родительской клетке вследствие природной, случайной или неслучайной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом(ами) по этому изобретению.

Как здесь используется, "эффективное количество" фармацевтической композиции в одном варианте осуществления является количеством, достаточным для обеспечения благотворных или желательных результатов, включающих, но без ограничения, клинические результаты, такие как уменьшение размера или скорости роста опухоли, отсрочка или ослабление воспалительной реакции, улучшение качества жизни тех, кто страдает заболеванием, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения такого заболевания, усиление эффекта другого лекарственного средства, например, посредством направленной доставки и/или интернализации, отсрочка прогрессирования заболевания и/или увеличение продолжительности жизни индивидуумов. Такое эффективное количество может вводиться при одном или более введениях. Применительно к целям этого изобретения, эффективным количеством лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции является количество, достаточное для улучшения клинического наблюдаемого состояния.

В некоторых вариантах осуществления эффективного количества лекарственного средства соединения или фармацевтической композиции можно достичь или можно не достичь вместе с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, "эффективное количество" может рассматриваться в рамках введения одного или более дополнительных средств, и можно считать, что одно средство назначено в эффективном количестве, если, вместе с одним или более других средств, может быть достигнут или достигается желаемый результат. Хотя индивидуальные потребности варьируют, определение оптимальных диапазонов эффективных количеств каждого соединения является частью профессиональных знаний данной области техники. Типичная доза, вводимая пациенту, обычно составляет от 0,0001 до 100 мг/кг веса тела пациента. Предпочтительно вводимая пациенту доза находится между 0,0001 и 20 мг/кг, 0,0001 и 10 мг/кг, 0,0001 и 5 мг/кг, 0,0001 и 2 мг/кг, 0,0001 и 1 мг/кг, 0,0001 и 0,75 мг/кг, 0,0001 и 0,5 мг/кг, 0,0001 и 0,25 мг/кг, 0,0001 и 0,15 мг/кг, 0,0001 и 0,10 мг/кг, 0,001 и 0,5 мг/кг, 0,01 и 0,25 мг/кг или 0,01 и 0,10 мг/кг веса тела пациента. Дозу и частоту введения молекул по настоящему изобретению можно уменьшить или изменить с помощью увеличения поглощения и проникновения в ткани молекул по настоящему изобретению посредством модификаций, таких как, например, липидизация.

Говорят, что молекула нуклеиновой кислоты или агент, антитело, композиция или клетка и т.д., как здесь используется, является "выделенной", если эта молекула нуклеиновой кислоты, агент, антитело,

композиция или клетка и т.д. отделена в значительной степени от примесных молекул нуклеиновых кислот, антител, агентов, композиций или клеток и т.д., которые присутствуют в природе в ее первоначальном источнике.

Термин "индивидуум" относится к позвоночному животному, предпочтительно млекопитающему. Млекопитающие включают, но без ограничения, людей, сельскохозяйственных животных, животных для спортивных мероприятий, любимых домашних животных, приматов, мышей и крыс. В наиболее предпочтительном варианте осуществления термин "индивидуум" означает человека.

Термины "полипептид", "олигопептид", "пептид" и "белок" используются здесь взаимозаменяемо для ссылки на полимеры из аминокислот любой длины. Полимер может быть неразветвленным или разветвленным, он может включать модифицированные аминокислоты, и он может прерываться не аминокислотами. Термины также охватывают полимер из аминокислот, который был модифицирован в природе или в результате вмешательства, например образования дисульфидных связей, гликозилирования, липидизации, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляции или модификации, такой как конъюгация с компонентом-меткой. В это определение также включены, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты и т.д.), а также другие модификации, известные в данной области техники. Понятно, что, поскольку полипептиды по этому изобретению основаны на антителе, могут встречаться полипептиды в виде одиночных цепей или в виде соединенных цепей.

Используемый здесь термин "в значительной степени чистый" относится к материалу по крайней мере с 50% степенью чистоты (т.е. без примесей), более предпочтительно по крайней мере с 90% степенью чистоты, более предпочтительно по крайней мере с 95% степенью чистоты, более предпочтительно по крайней мере с 98% степенью чистоты, более предпочтительно по крайней мере с 99% степенью чистоты и наиболее предпочтительно с превышающей 99% степенью чистоты.

Используемый здесь термин "токсин" относится к любому веществу, которое обеспечивает отрицательную реакцию в клетке. Например, токсин, направленный на раковую клетку, будет оказывать отрицательное, иногда вредное воздействие на раковую клетку. Примеры токсинов включают, но без ограничения, таксан, майтансиноид, ауристин (например, монометилауристин (ММАЕ), монометилауристин F (ММАF), ауристин E (AE) и т.д.) (например, те, которые описаны в патентах США №№ 5208020, 5416064, 6333410, 6340701, 6372738, 6436931, 6441163, 6596757, 7276497, 7585857 или 7851432), калихеамицин, антрациклин (например, доксорубин), аналог СС-1065, доцетаксел, катепсин В или Е, ридин, гелонин, *Pseudomonas* экзотоксин, дифтерийный токсин и РНКазу; меченные радиоактивными изотопами антитела (например, конъюгированные с труксетаном или меченные токсичным радиоизотопом (например, ^{90}Y ; ^{131}I , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{225}Ac и т.д.)).

Используемый здесь термин "лечение" означает способ получения благотворного или желаемого результата, в том числе и предпочтительно благотворного или желаемого клинического результата. Такие благотворные или желаемые клинические результаты включают, но без ограничения, одно или более из следующего: уменьшение воспаления или аутоиммунной реакции, уменьшение пролиферации (или уничтожение) раковых клеток или других нездоровых клеток, уменьшение метастазирования раковых клеток, обнаруживаемого при злокачественных новообразованиях, сокращение размера опухоли, ослабление симптомов, являющихся следствием заболевания, улучшение качества жизни тех, кто страдает этим заболеванием, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения этого заболевания, отсрочку прогрессирования заболевания и/или увеличение продолжительности жизни индивидуумов.

II. Способы создания антител и полипептидов по настоящему изобретению.

Способы создания моноклональных антител известны в данной области техники. Одним способом, который может использоваться, является способ Kohler, G. и др. ((1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity", *Nature* 256: 495-497) или его модификация. Типично моноклональные антитела создают в не являющихся людьми видах, таких как мыши. Обычно мышь или крысу используют для иммунизации, но могут также использоваться другие животные. Антитела вырабатываются при иммунизации мышей иммуногенным количеством клеток, клеточных экстрактов или белковых препаратов, которые содержат CD3 человека. Иммуногеном могут быть, но без ограничения, эмбриональные клетки, линии культивируемых клеток, раковые клетки, нуклеиновые кислоты или ткань.

В одном варианте осуществления моноклональные антитела, которые связываются с CD3, получают, используя клетки-хозяева, которые сверхэкспрессируют CD3, в качестве иммуногена. Такие клетки включают, в качестве примера, а не ограничения, Т-клетки человека.

Для контролирования образования антител небольшой биологический образец (например, кровь) может быть получен от животного и проверен в отношении титра антител против иммуногена. Селезенка и/или несколько больших лимфатических узлов могут быть извлечены и подвергнуты диссоциации до отдельных клеток. Если желательно, клетки селезенки могут быть подвергнуты скринингу (после удаления неспецифически присоединенных клеток) посредством внесения клеточной суспензии в планшет или лунку, покрытый(ую) антигеном. В-клетки, экспрессирующие связанный с мембраной иммуноглобулин, специфический в отношении антигена, будут связываться с планшетом и не смываются вместе с осталь-

ной частью суспензии. Получаемые в результате В-клетки, или все диссоциированные клетки селезенки, можно затем слить с миеломными клетками (например, X63-Ag8.653 и клетками из Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, CA). Полиэтиленгликоль (ПЭГ) может использоваться для слияния клеток селезенки или лимфоцитов с миеломными клетками для образования гибридомы. Затем гибридоме подвергают культивированию в селективной среде (например, содержащей гипоксантин, аминоптерин, тимидин среде, по-другому известной как "среда HAT"). Получающиеся гибридомы затем высевают методом серийных разведений и исследуют в отношении продукции антител, которые специфически связываются с иммуногеном, используя, например, FACS (клеточный сортинг с возбуждением флуоресценции) или отбор с использованием иммуногистохимического исследования (ИНС). Отобранные гибридомы, секретирующие моноклональные антитела, затем культивируют или *in vitro* (например, в матрасах для культур тканей или половолоконных реакторах), или *in vivo* (например, в виде асцитических жидкостей у мышей).

В качестве другой альтернативы методу слияния клеток могут использоваться В-клетки, иммортализованные с помощью вируса Эпштейна-Барр (EBV), для продукции моноклональных антител по расматриваемому изобретению. Гибридомы наращивают и субклонировать, если желательно, и супернатанты исследуют в отношении антииммуногенной активности с помощью обычных процедур исследования (например, FACS, ИНС, радиоиммуноанализа, иммуноферментного анализа, флуоресцентного иммуноанализа и т.д.).

В случае другой альтернативы моноклональное антитело против CD3 или любые другие эквивалентные антитела можно секвенировать и продуцировать рекомбинантно с помощью любого способа, известного в данной области техники (например, гуманизации, использования трансгенных мышей для продуцирования полностью человеческих антител, технологии фагового дисплея и т.д.). В одном варианте осуществления моноклональное антитело против CD3 секвенируют, а затем полинуклеотидную последовательность клонируют в вектор для экспрессии или наращивания. Последовательность, кодирующая представляющее интерес антитело, может сохраняться в векторе в клетке-хозяине, и клетку-хозяина можно затем нарастить и заморозить для дальнейшего использования.

Полинуклеотидная последовательность моноклонального антитела против CD3 и любых других эквивалентных антител может использоваться для генетической манипуляции с целью создания "гуманизованного" антитела, увеличения аффинности или улучшения других характеристик антитела. Общий принцип при гуманизации антитела включает в себя сохранение основной последовательности антигенсвязывающей части антитела, при замене нечеловеческой оставшейся части антитела последовательностями антитела человека. Существуют четыре общих стадии с целью гуманизации моноклонального антитела. Этими стадиями являются: (1) определение нуклеотидной и предсказываемой аминокислотной последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей исходного антитела; (2) конструирование гуманизованного антитела, т.е. решение, какую каркасную область антитела использовать во время процесса гуманизации; (3) методологии/методы фактической гуманизации; и (4) трансфекция и экспрессия гуманизованного антитела; смотрите, например, патенты США №№ 4816567, 5807715, 5866692 и 6331415.

Был описан ряд молекул "гуманизованных" антител, включающих антигенсвязывающий сайт, происходящий из нечеловеческого иммуноглобулина, в том числе химерные антитела, содержащие происходящие от грызунов или модифицированные, происходящие от грызунов V-области и связанные с ними определяющие комплементарность участки (CDR), слитые с константными доменами человека (смотрите, например, Winter et al. (1991) "Man-made Antibodies", *Nature* 349: 293-299; Lobuglio et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86: 4220-4224 (1989), Shaw et al. (1987) "Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen", *J. Immunol.* 138: 4534-4538, и Brown et al. (1987) "Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody", *Cancer Res.* 47: 3577-3583). В других ссылочных документах описываются происходящие от грызунов CDR, пересаженные в человеческую поддерживающую каркасную область (FR) до слияния с соответствующим константным доменом антитела человека (смотрите, например, Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", *Nature* 332: 323-327; Verhoeven, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", *Science* 239: 1534-1536; и Jones et al. (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse", *Nature* 321: 522-525). В другом ссылочном документе описываются происходящие от грызунов CDR, поддерживаемые рекомбинантно венерованными каркасными областями, происходящими от грызунов; смотрите, например, публикацию Европейского патента № 519596. Эти "гуманизованные" молекулы разработаны для минимизации нежелательной иммунологической реакции по отношению к молекулам античеловеческих антител грызунов, которая ограничивает продолжительность и эффективность терапевтических применений этих составляющих у являющихся людьми реципиентов. Другие способы гуманизации антител, которые также могут использоваться, описаны в Daugherty et al. (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins", *Nucl. Acids Res.* 19: 2471-2476 и в патентах США №№

6180377, 6054297, 5997867 и 5866692.

Настоящим изобретением также охватываются одноцепочечные Fv-фрагменты ("scFv") антител по этому изобретению, такие как мышинный анти-CD3. Одноцепочечные Fv-фрагменты создают посредством связывания переменных областей легкой и/или тяжелой цепи, используя короткий пептид-линкер. Bird и др. ((1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", *Science* 242: 423-426) приводят пример пептид-линкеров, которые образуют перемичку размером приблизительно 3,5 нм между карбоксильным концом одной переменной области и аминоконцом другой переменной области. Были разработаны и использовались линкеры с другими последовательностями (Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", *Science* 242: 423-426). Линкеры могут быть, в свою очередь, модифицированы ради дополнительных функций, таких как присоединение лекарственных средств или присоединение к твердым подложкам. Одноцепочечные варианты можно продуцировать или рекомбинантно, или синтетически. Для синтетического получения scFv может использоваться автоматический синтезатор. Для рекомбинантной продукции scFv подходящая плазмиды, содержащая полинуклеотид, который кодирует scFv, может быть введена в подходящую клетку-хозяина, или эукариотическую, такую как дрожжи, клетки растений, насекомых или млекопитающих, или прокариотическую, такую как *E. coli*. Полинуклеотиды, кодирующие представляющий интерес scFv, можно создать с помощью обычных манипуляций, таких как лигирование полинуклеотидов. Результирующий scFv можно выделить, используя стандартные методы очистки белков, известные в данной области техники.

Настоящее изобретение включает модификации по отношению к антителам против CD3 и их связывающим фрагментам. Модифицирование полипептидов является обычной практической деятельностью в данной области техники, и его подробное описание здесь не требуется. Примеры модифицированных полипептидов включают полипептиды с консервативными заменами аминокислотных остатков, одной или более делеций или добавлений аминокислот, которые не приводят в значительной степени к вредным изменениям функциональной активности, или использованием химическим аналогов. Аминокислотные остатки, которые могут быть консервативно заменены один другим, включают, но без ограничения: глицин/аланин; валин/изолейцин/лейцин; аспарагин/глутамин; аспарагиновую кислоту/глутаминовую кислоту; серин/треонин; лизин/аргинин и фенилаланин/тирозин. Эти полипептиды также включают гликозилированные и негликозилированные полипептиды, а также полипептиды с другими посттрансляционными модификациями, такими как, например, гликозилирование с использованием различных Сахаров, ацетилирование и фосфорилирование. Предпочтительно, если бы аминокислотные замены были консервативными, т.е. замененная аминокислота обладала бы химическими свойствами, схожими с таковыми исходной аминокислоты. Такие консервативные замены известны в данной области техники, и выше представлены примеры. Аминокислотные модификации могут простираются от изменения или модификации одной или более аминокислот до полной реконструкции области, такой как переменная область. Изменения переменной области могут привести к изменению аффинности и/или специфичности. Другие способы модифицирования включают использование методов соединения, известных в данной области техники, включающих, но без ограничения, ферментативный способ, окислительное замещение и хелатирование. Модификации могут использоваться, например, для присоединения меток в случае иммуноанализа, например присоединения радиоактивных составляющих в случае радиоиммуноанализа. Модифицированные полипептиды создают, используя процедуры, широко известные в данной области техники, и могут быть подвергнуты скринингу, используя стандартные исследования, известные в данной области техники.

То обстоятельство, что изменение одного аминокислотного остатка в CDR может привести к утрате функционального связывания (Rudikoff, S. etc. (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79(6): 1979-1983), обеспечивает способ методичной идентификации альтернативных функциональных последовательностей CDR. В одном предпочтительном способе получения таких вариантов CDR полинуклеотид, кодирующий CDR, мутируют (например, посредством неспецифического мутагенеза или метода сайт-специфического мутагенеза (например, амплификации с использованием полимеразной цепной реакции, используя праймеры, которые кодируют мутированный локус)) для получения CDR, содержащего замещенный аминокислотный остаток. Посредством сравнения идентификатора соответствующего остатка в исходной (функциональной) последовательности CDR с идентификатором варианта последовательности CDR с заменой (нефункциональной), можно определить бальную оценку этой замены BLOSUM62.ijj. Система BLOSUM обеспечивает матрицу аминокислотных замен, созданную в результате анализа базы данных, касающихся последовательностей, ради надежных совмещений (Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?", *Nature Biotech.* 22(8): 1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89: 10915-10919; Karlin, S. et al. (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87: 2264-2268; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective", *J. Mol. Biol.* 219, 555-565). В настоящее время самой развитой базой данных BLOSUM является база данных BLOSUM62 (BLOSUM62.ijj). В табл. 1 представлены бальные оценки замен BLOSUM62.ijj (чем выше бальная оценка, тем более консервативной является замена, и соответст-

венно более вероятно, что замена не будет оказывать влияние на функцию).

Если антигенсвязывающий фрагмент, включающий результирующий CDR, не связывается с CD3, то считают, что бальная оценка замены BLOSUM62.ii является недостаточно консервативной, и выбирают и осуществляют новую возможную замену, имеющую более высокую бальную оценку. Таким образом, например, если исходным остатком был глутамат (E), а нефункциональным замещающим остатком был гистидин (H), то бальная оценка замены BLOSUM62.ii будет равна 0, и предпочтительными являются более консервативные замены (например, на аспарат, аспарагин, глутамин или лизин).

Таблица 1

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+2	0	-3	-2	-1	-1	-2	-1	-2	+1
K	+1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

Таким образом, в настоящем изобретении предусматривается использование неспецифического мутагенеза для идентификации улучшенных CDR. Альтернативно, для увеличения (или уменьшения) аффинности CDR может использоваться технология фагового дисплея. В случае этой технологии, называемой созреванием аффинности, используется мутагенез или "прогулка по CDR", а при повторном отборе используется антиген-мишень или его антигенный фрагмент для идентификации антител, содержащих CDR, которые связываются с большей (или меньшей) аффинностью с антигеном, чем исходное или родительское антитело (смотрите, например, Glaser et al. (1992) *J. Immunology* 149: 3903). Мутирование целых кодонов, а не отдельных нуклеотидов приводит к получению полуслучайного набора мутаций аминокислот. Можно создать библиотеки, состоящие из совокупности вариантов клонов, каждый из которых отличается изменением одной аминокислоты в одном CDR, и содержащие варианты, отражающие каждую возможную аминокислотную замену для каждого остатка CDR. Мутанты с увеличенной (или уменьшенной) аффинностью к антигену можно отобрать посредством приведения подвергнутых иммобилизации мутантов в контакт с меченым антигеном. Любой способ скрининга, известный в данной области техники, может использоваться для идентификации мутантных антител с увеличенной или уменьшенной аффинностью к антигену (например, ELISA) (смотрите Wu et al. 1998, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6037; Yelton et al., 1995, *J. Immunology* 155: 1994). Можно использовать прогулку по CDR, в случае которой случайный характер придается легкой цепи (смотрите Schier et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 263: 551).

Способы осуществления такого созревания аффинности описаны, например, в Krause, J.C. et al. (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody", *MBio*. 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. et al. (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas", *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645; Hackel, B.J. et al. (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes", *J. Mol. Biol.* 401(1): 84-96; Montgomery, D.L. et al. (2009) "Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41", *MAbs* 1(5): 462-474; Gustchina, E. et al. (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth", *Virology* 393(1): 112-119; Finlay, W.J. et al. (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions", *J. Mol. Biol.* 388(3): 541-558; Bostrom, J. et al. (2009) "Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development", *Methods Mol. Biol.* 525: 353-376; Steidl, S. et al. (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification", *Mol. Immunol.* 46(1): 135-144 и Barderas, R. et al. (2008) "Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling", *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 105(26): 9029-9034. В предпочтительном варианте осуществления многолуночные планшеты можно покрыть выбранным антителом против CD3 (например, 100 нг/лунку в карбонатном буфере при комнатной температуре в течение 2 ч) и впоследствии инкубировать с растворимым CD3, добавляемым в разведении 1/10, и инкубировать при комнатной температуре в течение 16 ч, или развести до концентрации 50 нг/мл в PBS-T-BSA (0,05 мл добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение по крайней мере 2 ч при комнатной температуре).

Затем планшет промывают и разведения рекомбинантных антител, начиная с 0,5 мкг/мл в PBS-T-BSA, затем добавляют и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Связывание рекомбинантных антител с захваченным антигеном затем измеряют, используя, например, конъюгат античеловеческий IgG-HRP и субстрат ТМВ. После остановки развития окраски, используя разбавленную серную кислоту, планшет считывают при 450 нм и идентифицируют антитела с большей аффинностью (смотрите, например, патент США № 7351803).

Настоящее изобретение включает полипептиды, включающие аминокислотную последовательность антител по этому изобретению. Полипептиды по этому изобретению можно создать с помощью процедур, известных в данной области техники. Полипептиды можно получить посредством протеолитического или иного расщепления антител, с помощью способов с использованием рекомбинантных молекул (т.е. отдельные или слитые полипептиды), как описано выше, или с помощью химического синтеза. С помощью химического синтеза без труда создают полипептиды антител, особенно более короткие полипептиды вплоть до приблизительно 50 аминокислот. Способы химического синтеза известны в данной области техники и имеются на рынке. Например, полипептид против CD3 можно было получить с помощью автоматического синтезатора полипептидов, используя твердофазный метод.

Настоящее изобретение также включает слитые белки, включающие один или более фрагментов или районов из полипептидов и антител по этому изобретению. В одном варианте осуществления обеспечивается слитый полипептид, включающий по крайней мере 10 следующих друг за другом аминокислот вариабельной области легкой цепи и по крайней мере 10 аминокислот вариабельной области тяжелой цепи. В другом варианте осуществления слитый полипептид содержит гетерологичную константную область иммуноглобулина. В другом варианте осуществления слитый полипептид содержит вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи антитела, продуцируемого депонированной с открытым использованием гибридомой. Применительно к целям этого изобретения являющийся антителом слитый белок содержит один или более полипептидных доменов, которые специфически связываются с CD3, и другую аминокислотную последовательность, к которой он не присоединен в природной молекуле, например гетерологичную последовательность или гомологичную последовательность из другого района.

Анти-CD3 полипептиды и другие агонисты, антагонисты и модуляторы CD3 можно создать с помощью способов, известных в данной области техники, например синтетически или рекомбинантно. Один способ получения таких молекул включает химический синтез полипептида с последующей обработкой в условиях окисления, подходящих для получения природной конформации, т.е. соответствующих соединений с помощью дисульфидных связей. Это можно осуществить, используя методологии, хорошо известные квалифицированным в данной области техники специалистам (смотрите, например, Kelley, R.F. et al. (1990) In: Genetic engineering principles and methods, Setlow, J.K. Ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19; Stewart, J.M. et al. (1984) Solid phase peptide synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; смотрите также патенты США №№ 4105603, 3972859, 3842067 и 3862925).

Полипептиды по настоящему изобретению можно без труда приготовить, используя твердофазный синтез пептидов (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis", Science 232(4748): 341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15): 5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century", Mini Rev. Med. Chem. 6(1): 3-10).

Тем не менее, в другом варианте полностью человеческие антитела можно получить посредством использования имеющихся в продаже мышей, которые были созданы для экспрессии белков специфических иммуноглобулинов человека. Трансгенных животных, которых создают для вызова более желательного (например, образования полностью человеческих антител) или более сильного иммунного ответа, можно также использовать для выработки гуманизированных или человеческих антител. Примерами такой технологии являются XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc., Fremont, CA) и HUMAB-MOUSE(R) и TC MOUSE™ (обе от Medarex, Inc., Princeton, NJ).

В варианте антитела можно создать рекомбинантно и экспрессировать, используя любой способ, известный в данной области техники. Антитела можно создать рекомбинантно посредством сначала выделения выработанных антител из животных-хозяев, получения последовательности гена и использования последовательности гена для экспрессии антитела рекомбинантно в клетках-хозяевах (например, клетках CHO). Другим способом, который может использоваться, является экспрессия последовательности антитела в растениях (например, табаке) или трансгенном молоке. Подходящие способы экспрессии антител рекомбинантно в растениях или молоке были описаны (смотрите, например, Peeters et al. (2001) Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants", Vaccine 19: 2756; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice", Int. Rev. Immunol 13: 65-93; и Pollock et al. (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies", J. Immunol Methods 231: 147-157). Подходящие способы получения производных антител, например гуманизированных, одноцепочечных и т.д., известны в данной области техники. В другом варианте антитела можно создать рекомбинантно с помощью

технологии фагового дисплея (смотрите, например, патенты США №№ 5565332, 5580717, 5733743, 6265150 и Winter, G. et al. (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology", *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455).

Представляющие интерес антитела или белок можно подвергнуть секвенированию посредством расщепления белков по Эдману, которое хорошо известно квалифицированным в данной области техники специалистам. Информацию о пептидах, полученную от масс-спектрометрии или расщепления белков по Эдману, можно использовать для конструирования зондов или праймеров, которые используются для клонирования представляющего интерес белка.

Альтернативный способ клонирования представляющего интерес белка осуществляют с помощью "пэннинга", используя очищенный CD3 или его части для клеток, экспрессирующих представляющее интерес антитело или белок. Процедуру "пэннинга" можно проводить посредством получения библиотеки кДНК на основе тканей или клеток, которые экспрессируют CD3, сверхэкспрессии кДНК во втором типе клеток и скрининга трансфицированных клеток второго типа клеток в отношении специфического связывания с CD3. Подробные описания способов, используемых при клонировании генов млекопитающих, кодирующих белки клеточной поверхности, с помощью "пэннинга", можно найти в данной области техники (смотрите, например, Aruffo, A. et al. (1987) "Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 84: 8573-8577 и Stephan, J. et al. (1999) "Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation", *Endocrinol.* 140: 5841-5854).

кДНК, кодирующие антитела против CD3 и другие пептидные агонисты, антагонисты и модуляторы CD3, можно получить посредством обратного транскрибирования мРНК из конкретного типа клеток в соответствии со стандартными способами в данной области техники. В частности, мРНК можно выделить, используя различные литические ферменты или химические растворы в соответствии с процедурами, изложенными, например, в MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Third Edition (Sambrook et al. Eds., 2001) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY), или экстрагировать, используя имеющиеся в продаже связывающие нуклеиновые кислоты смолы, следуя сопроводительным инструкциям, предоставляемым производителями (например, Qiagen, Invitrogen, Promega). Синтезированные кДНК можно затем встроить в экспрессионный вектор для продукции представляющего интерес антитела или белка в клетках второго типа. Предполагается, что экспрессионный вектор должен быть реплицируемым в клетках-хозяевах или в виде эписомы, или в виде интегральной части хромосомной ДНК. Подходящие экспрессионные векторы включают, но без ограничения, плазмиды, вирусные векторы, в том числе аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы и космиды.

Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотиды, можно ввести в клетку-хозяина с помощью любого из ряда соответствующих способов, включая электропорацию, трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами; липофекцию и инфицирование (например, если вектором является инфекционный агент, такой как вирус коровьей оспы). Выбор введения векторов или полинуклеотидов будет часто зависеть от особенностей клетки-хозяина.

Любые клетки-хозяева, способные к сверхэкспрессии гетерологичных ДНК, можно использовать с целью выделения генов, кодирующих представляющее интерес антитело, полипептид или белок. Неограничивающие примеры подходящих клеток млекопитающих-хозяев включают, но без ограничения, клетки COS, HeLa и CHO. Предпочтительно, когда клетки-хозяева экспрессируют кДНК на уровне, который выше приблизительно в 5 раз, более предпочтительно выше в 10 раз, даже более предпочтительно выше в 20 раз такового соответствующего эндогенного антитела или белка, представляющего интерес, в случае его наличия, в клетках-хозяевах. Скрининг клеток-хозяев в отношении специфического связывания с CD3 осуществляют с помощью иммуноанализа или FACS. Клетку, сверхэкспрессирующую представляющее интерес антитело или белок, можно идентифицировать.

III. Способы скрининга полипептидов и моноклональных антител.

Несколько способов могут использоваться для скрининга полипептидов и моноклональных антител, которые связываются с CD3. Понятно, что "связывание" относится к биологически или иммунологически соответствующему специфическому связыванию и не относится к неспецифическому связыванию, которое может иметь место, например, при использовании иммуноглобулина в очень высокой концентрации против неспецифической мишени. В одном варианте осуществления моноклональные антитела подвергают скринингу на предмет связывания с CD3, используя стандартные методы скрининга. Таким образом можно получить моноклональное антитело против CD3. Предпочтительными гибридами по настоящему изобретению являются те, которые продуцируют антитела mAb1 и mAb2, или их химерные или гуманизированные производные. Однако можно идентифицировать дополнительные моноклональные антитела, которые связываются с CD3. С этой целью моноклональные антитела подвергают скринингу на предмет их дифференциальной способности к связыванию с CD3 человека, а также CD3 примата.

Любую из нескольких различных систем детектирования можно использовать для обнаружения связывания антител со срезом ткани. Типично иммуногистохимическое исследование включает связыва-

ние первого антитела с тканью, а затем второго антитела, направленного против вида, от которого первое антитело было получено, и конъюгированного с обнаруживаемым маркером (например, пероксидазой хрена (HRP) или диаминобензидином (DAB)). Одним альтернативным способом, который может использоваться, являются поликлональные, являющиеся зеркальным отображением антигенной структуры антитела или polyMICA™ (поликлональные Mirror Image Complementary Antibodies; The Binding Site Limited, Birmingham, UK; Mangham, D.C. et al. (1999) "A Novel Immunohistochemical Detection System Using Mirror Image Complementary Antibodies (MICA)", *Histopathology* 35(2): 129-33). Способ PolyMICA™ может использоваться для проверки связывания первых антител (например, антител против CD3) с нормальной и раковой тканью. В продаже имеется несколько видов наборов для детектирования polyMICA™: продукт № НК004.D является набором для детектирования polyMICA™, в котором используется хромоген DAB; продукт № НК004.A является набором для детектирования polyMICA™, в котором используется хромоген АЕС. Альтернативно, первое антитело можно непосредственно пометить обнаруживаемым маркером.

IV. Способы получения характеристик антител против CD3.

Любой из нескольких способов может использоваться для получения характеристик антител против CD3. Одним способом является идентификация эпитопа, с которым оно связывается. Картирование эпитопов имеется на рынке от различных поставщиков, например Pepscan Systems (Lelystad, Нидерланды). Картирование эпитопов может использоваться для определения последовательности, с которой связывается антитело против CD3. Эпитоп может быть линейным эпитопом, т.е. содержащимся в одном фрагменте аминокислот, или конформационным эпитопом, образованным в результате пространственного взаимодействия аминокислот, которые могут необязательно содержаться в одном фрагменте.

Пептиды различных длин (например, предпочтительно длиной по крайней мере 4-6 аминокислот) можно выделить или синтезировать (например, рекомбинантно) и использовать для анализов связывания с антителом против CD3. Эпитоп, с которым связывается антитело против CD3, можно определить при методичном скрининге, используя перекрывающиеся пептиды, происходящие из экстраклеточной последовательности и определяя связывание антителом против CD3.

Тем не менее, другим способом, который может использоваться для получения характеристик антитела против CD3, является использование анализов конкуренции с другими антителами, которые, как известно, связываются с тем же антигеном, т.е. CD3, для определения того, связываются ли антитела против CD3 с тем же эпитопом, что и другие антитела. Примеры имеющихся в продаже антител против CD3 могут иметься в распоряжении и могут быть идентифицированы, используя анализы связывания, изложенные здесь. Анализы конкуренции хорошо известны квалифицированным в данной области техники специалистам, и такие процедуры и пояснительные данные детализированы далее в разделе "Примеры". Антитела против CD3 можно, кроме того, охарактеризовать в соответствии с тканями, типом рака или типом опухоли, с которым они связываются.

V. Предпочтительные композиции по настоящему изобретению.

Настоящим изобретением охватываются композиции, в том числе фармацевтические композиции, включающие антитела против CD3, полипептиды, происходящие из антител против CD3, полинуклеотиды, включающие последовательность, кодирующую антитела против CD3, и другие агенты, описываемые здесь. В настоящем изобретении, кроме того, предусматриваются конъюгаты любого пептидного агониста, антагониста или модулятора CD3 и дополнительных химических структур, которые реализуют предполагаемую функцию или функций конкретного пептидного агониста, антагониста или модулятора CD3. Эти конъюгаты включают пептидный агонист, антагонист или модулятор CD3, ковалентно связанный с макромолекулой, такой как любая нерастворимая, являющаяся твердой подложкой матрица, используемая в способах диагностирования, скрининга или очистки, обсуждаемых здесь. Подходящие материалы матрицы включают любое вещество, которое является химически инертным, характеризуется высокой степенью пористости и имеет большое число функциональных групп, способных к образованию ковалентных связей с пептидными лигандами. Примеры материалов матриц и способов приготовления конъюгатов матрица-лиганд приведены в Dean et al. (Eds) *AFFINITY CHROMATOGRAPHY: A PRACTICAL APPROACH*, IRL Press (1985); Lowe, "An Introduction to Affinity Chromatography", in Work et al. (eds) *LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY*, Vol. 7, Part II, North-Holland (1979); Porath et al., "Biospecific Affinity Chromatography", in Neurath, H. et al. (eds), *THE PROTEINS*, 3rd ed., Vol. 1, p. 95-178 (1975) и Schott, H. *AFFINITY CHROMATOGRAPHY*, Macel Dekker, Inc. NY (1984).

Здесь также обеспечиваются конъюгаты пептидного агониста, антагониста или модулятора CD3 и любой репортерной составляющей, используемой в диагностических процедурах, описываемых здесь. Являющиеся пептидными агонистами, антагонистами или модуляторами CD3 агенты, полипептиды и белки по этому изобретению, в том числе антитела против CD3, кроме того, идентифицируют и характеризуют в соответствии с любым (одним или более) из следующих критериев:

(1) способность к специфическому связыванию с CD3 человека, который эндогенно представлен на поверхности нормальной Т-клетки человека;

(2) способность к специфическому связыванию с CD3 человека, который эндогенно представлен на поверхности лейкозной Т-клетки человека;

(3) способность к специфическому связыванию с CD3, не являющимся человеческим (например, CD3 яванского макака), который эндогенно представлен на поверхности нормальной нечеловеческой Т-клетки;

(4) способность к специфическому связыванию с CD3, не являющимся человеческим, который эндогенно представлен на поверхности нечеловеческой лейкозной Т-клетки;

(5) способность нейтрализовать (т.е. блокировать или препятствовать связыванию) образование комплекса с CD3; способность нейтрализовать образование комплекса с TCR;

(6) способность к модулированию (или антагонистически, или агонистически) передачи сигнала TCR-комплексом;

(7) способность к связыванию с Fc-рецептором;

(8) способность к конкурентному ингибированию предпочтительного связывания известного антигена против CD3 с CD3, включая способность к предпочтительному связыванию с тем же эпитопом CD3, с которым предпочтительно связывается исходное антитело;

(9) способность к связыванию с частью CD3, которая представлена на поверхности живой клетки *in vitro* или *in vivo*; способностью к связыванию с частью CD3, которая представлена на поверхности живой раковой клетки;

(10) способность к доставке химиотерапевтического средства в раковую Т-клетку и/или

(11) способность к доставке терапевтического средства, токсина или выявляемого маркера в Т-клетку.

Предпочтительное антитело по настоящему изобретению будет демонстрировать дифференциальное ИНС окрашивание опухолевой ткани по отношению к нормальной, нераковой ткани и будет, кроме того, способно к проверке в моделях на примате (и особенно яванском макаке) эффективности антитела. Предпочтительные антитела по настоящему изобретению будут, кроме того, проявлять желаемые уровни аффинности и антигенной специфичности. Предпочтительные антитела по настоящему изобретению будут, кроме того, проявлять желаемые уровни иммуномодулирующей активности и интернализации в клетки.

В некоторых вариантах осуществления антителом по настоящему изобретению является антитело, которое продуцирует гибридома mAB2, которая экспрессирует мышинное антитело mAB2, или ее потомство. Настоящим изобретением также охватываются различные препараты антител, продуцируемых этими гибридомами, и эквивалентные антитела или полипептидные фрагменты (например, Fab, Fab', F(ab')₂Fv, Fc и т.д.), химерные антитела, одиночная цепь (ScFv), их мутанты, слитые белки, включающие часть антитела, гуманизированные антитела и любая другая модифицированная конфигурация любого из этих или эквивалентных антител, которая включает сайт распознавания антигена (CD3) требуемой специфичности. Настоящим изобретением также обеспечиваются антитела человека, демонстрирующие одну или более из биологических характеристик члена анти-CD3 семейства. Эквивалентные антитела анти-CD3 семейства (в том числе гуманизированные антитела и антитела человека), полипептидные фрагменты и полипептиды, включающие любой из этих фрагментов, идентифицируют и характеризуют в соответствии с любым (одним или более) из описанных выше критериев.

Предпочтительными антителами против CD3 по настоящему изобретению является mAB2 и их гуманизированные или химерные производные и антигенсвязывающие фрагменты, которые реагируют с молекулой CD3 человека и яванского макака. Ниже представлены аминокислотные последовательности варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи мышинных антител mAb1 и mAB2 и кодирующие их полинуклеотидные последовательности. Последовательности CDR приводимых в качестве примера антител (mAb1 и mAB2) начертаны полужирно и подчеркнуты.

A. Последовательности варибельных областей мышинного моноклонального антитела mAb1.

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи мышинного моноклонального антитела mAb1 (SEQ ID NO: 1):

QVVLTSQSPAI MSAFFGKVT MTC**SASSSVS** **YMN**WYQKSG TSPKRWIYDS
SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMETE DAATYYC**QQW** **SRNPPT**FGGG
 TKLQITR

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая варибельную область легкой цепи мышинного моноклонального антитела mAb1 (SEQ ID NO: 2):

caggtggtgc tgacccaagtc ccccgccatc atgtccgcct tccccggcga
 gaaagtgaca atgacctgct ccgcctctct ctcogtgtcc tacatgaact
 ggtatcagca gaagtccggc acctccccca agcgtggat ctacgactcc
 tccaagctgg cctccggcgt gcccgccaga ttctctggct cgggtccgg
 caccagctac tcctgacca tctctccat ggaaaccgag gacgcccaca
 cctactactg ccagcagtg tcccggaacc cccctacctt cggcgaggc
 accaagctgc agatcaccag a

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи мышинного моноклонального антитела mAb1 (SEQ ID NO: 3):

QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RSTMHWVKQR PGQGLEWIGY
INPSSAYTNY NQKFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVVYCASPO
VHYDYNGFY WGQGTILVTVS S

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи мышино-ного моноклонального антитела mAb1 (SEQ ID NO: 4):

caggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgag ctggccagac ctggcgccctc
cgtgaagatg tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc cggtcaccaca
tgcactgggt gaaacagcgg cctggacagg gcctggaatg gatcggctac
atcaaccctt ccagcgccta caccaactac aaccagaagt tcaaggacaa
ggccaccctg accgcccaca agtccctcag caccgctac atgcagctgt
cctccctgac ctccgaggac tccgcccgtg actactgccc ctccccccag
gtgcactacg actacaacgg cttcccctac tggggccagg gcaccctggt
gacagtgtcc tcc

В. Последовательности вариабельных областей мышинового моноклонального антитела mAb2

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи мышинового моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 5):

QAVVTQESAL TTSPGETVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQE KPDHLFTGLI
GTNKRAPGV PARFSGSLIG DKAALITIGA QTEDEAIYFC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область легкой цепи мышинового моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 6):

cagggcctgg tgacacagga gtcagctctg accacatccc cagggcgaaac
agtgactctg acctgcagat ccagcactgg agcagtgact acctctaact
acgctaattg ggtgcaggag aagcccagacc acctgttcac tgggctgac
ggcgaacca acaaaagggc acccgggtgtg cctgcccggg tttctggcag
tctgatcgga gacaaggccg ctctgacaat tactggcgcc cagacagagg
atgaagctat ttacttctgt gcactgtggt atagcaatct gtgggtgttt
gggggtggca ccaaacctgac agtgcctggga

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышинового монокло-нального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 7):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYAT YADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNLLKT EDTAMYCYVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGT L VTVSA

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи мышино-ного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 8):

gaggtgaagc tgctggaag cggcggagga ctggtgcagc caaagggatc
actgaaactg tcctgcgccc cctccggctt cacctttaac acatacgcta
tgaattgggt gcgacagcca cctggcaagg gcctggagtg ggtggcaagg
atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actctgtgaa
ggatagattc acaatcagtc ggcagcattc ccagagcatt ctgtatctgc
agatgaacaa tctgaaact gaagacaccg ccatgtacta ttgtgtgcgg
cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca
ggggacactg gtgactgtgt ctccc

Положение 40 тяжелой цепи является положением якорного остатка связывающего пептида с высокой аффинностью класса II МНС. Положения 44, 48, 54, 94, 99 и 108 тяжелой цепи являются положениями якорных остатков связывающего пептида со средней аффинностью класса II МНС. Положение 69 легкой цепи является положением якорного остатка связывающего пептида с высокой аффинностью класса II МНС. Положение 59 легкой цепи является положением якорного остатка связывающего пептида со средней аффинностью класса II МНС. Эти остатки можно заменить, используя стандартные методы молекулярной биологии, на какой-либо остаток для ослабления или исключения сайта распознавания МНС класса II.

С. Антитела против CD3 со сконструированным Fc.

При обычном функционировании иммунной системы взаимодействие комплексов антитело-антиген с клетками иммунной системы приводит к широкому ряду реакций, распространяющихся от эффекторных функций, таких как антителозависимая цитотоксичность, дегрануляция тучных клеток и фагоцитоз, до иммуномодулирующих сигналов, таких как пролиферация регулирующих лимфоцитов и секреция антител. Любые из этих взаимодействий инициируются благодаря связыванию Fc-домена антител или иммунных комплексов со специализированными рецепторами клеточной поверхности гемопозитических клеток. Разнообразие клеточных реакций, запускаемых антителами и иммунными комплексами, является следствием структурной гетерогенности трех Fc-рецепторов: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) и FcγRIII (CD16) являются активирующими (т.е. усиливающими иммунную систему) рецепторами; FcγRIIB (CD32B) является ингибирующим (т.е. успокаивающим иммунную систему) рецептором. Аминокислотная последовательность Fc-области IgG1 представлена ниже (как SEQ ID NO: 9, с нумерацией в соответствии с Kabat и др. (SEQUENCE OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, NIH, MD (1991), который включен в настоящее описание в словесной форме посредством ссылки, ниже называемой "Kabat EU"). Остатки 230-341 являются CH2-областью Fc. Остатки 342-447 являются CH3-областью Fc.

PAPELLGGPS 230	VFLFPPKPKD 240	TLMISRTPEV 250	TCVVVDVSHE 260	DPEVKFNWYV 270
DGVEVHNAKT 280	KPREEQYNST 290	YRVVSVLTVL 300	HQDWLNGKEY 310	KCKVSNKALP 320
APIEKTISKA 330	KGQPREPQVY 340	TLPPSREEMT 350	KNQVSLTCLV 360	KGFYPSDIAV 370
EWESNGQPEN 380	NYKTTFPVLD 390	SDGSFFLYSK 400	LTVDKSRWQQ 410	GNVFSCSVMH 420
EALHNNHTQK 430	SLSLSPGK 440			

Поскольку не связывающиеся с Fc-рецептором (FcR) CD3-специфические антитела являются в минимальной степени истощающими, было выдвинуто предположение, что они могут изменять сигналы от TCR так, что могла бы индуцироваться иммунологическая толерантность (St. Clair E.W. (2009) "Novel Targeted Therapies for Autoimmunity", *Curr. Opin. Immunol.* 21(6): 648-657). Таким образом, такая терапия имеет потенциальное применение при лечении аутоиммунного заболевания и отторжения вследствие реакции "хозяин против трансплантата". Не связывающиеся с FcR CD3-специфические антитела, как также было постулировано, индуцируют толерантность в виде ремиссии сахарного диабета типа 1 (St. Clair E.W. (2009) "Novel Targeted Therapies for Autoimmunity", *Curr. Opin. Immunol.* 21(6): 648-657; Masharani, U.B. et al. (2010) "Teplizumab Therapy For Type 1 Diabetes", *Expert Opin. Biol. Ther.* 10(3): 459-465).

Таким образом, настоящее изобретение включает специфически связывающиеся с CD3 антитела, которые включают вариант Fc-области, имеющие Fc-области, которые модифицированы (например, содержат замены, делеции, вставки в одной или более частей), чтобы быть неспособными или менее способными к связыванию с Fc-рецептором (по сравнению с антителом, содержащим те же CDR, но Fc-область дикого типа).

В одном варианте осуществления такие антитела будут неспособны к связыванию с любым Fc-рецептором. Альтернативно, Fc-область антитела будет модифицирована так, чтобы дать ей возможность связываться с такими Fc-рецепторами, как FcγRIIB, которые являются ингибиторными, но не с такими Fc-рецепторами, как FcγRIIA, FcγRIIA или FcγRIIB, которые стимулируют активацию иммунной системы.

Предпочтительно способности к связыванию молекул по настоящему изобретению определяют с помощью *in vitro* функциональных анализов для определения одной или более FcγR-опосредуемых функций клеток-эффекторов. Аффинности и способности к связыванию молекул, например антител, по настоящему изобретению к (с) FcγR можно определить, используя *in vitro* анализы (биохимические или иммунологические анализы), известные в данной области техники для определения взаимодействий антитело-антиген или Fc-FcγR, т.е. специфического связывания антигена с антителом или специфического связывания Fc-области с FcγR соответственно, включающие, но без ограничения, анализ ELISA, анализ с использованием поверхностного плазмонного резонанса, анализ методом иммунопреципитации. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления молекулы по настоящему изобретению обладают способностями к связыванию в *in vivo* моделях (таких как те, которые описаны и раскрыты здесь), схожими с таковыми в *in vitro* анализах. Однако настоящее изобретение не исключает молекулы по настоящему изобретению, которые не демонстрируют желаемый фенотип в *in vitro* анализах, но демонстрируют желаемый фенотип *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления молекулы по настоящему изобретению, включающие вариант Fc-области, включают по крайней мере одну модификацию аминокислоты (например, имея 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более модификаций аминокислот) в СН3-домене Fc-области, который определяют как домен, расположенный от аминокислоты 342 до аминокислоты 447. В других вариантах осуществления молекулы по настоящему изобретению, включающие вариант Fc-области, включают по крайней мере одну модификацию аминокислоты (например, имея 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более модификаций аминокислот) в СН2-домене Fc-области, который определяют как домен, расположенный от аминокислоты 231 до аминокислоты 341. В некоторых вариантах осуществления молекулы по настоящему изобретению включают по крайней мере две модификации аминокислот (например, имея 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более модификаций аминокислот), причем по крайней мере одна такая модификация находится в СН3-области, и по крайней мере одна такая модификация находится в СН2-области. Настоящим изобретением, кроме того, охватывается модификация аминокислоты в шарнирной области. В отдельном варианте осуществления настоящим изобретением охватывается модификация аминокислоты в СН1-домене Fc-области, который определяют как домен, расположенный от аминокислоты 216 до аминокислоты 230.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления настоящим изобретением охватываются молекулы, включающие вариант Fc-области, причем указанный вариант придает им уменьшенную ADCC активность и/или уменьшенное связывание с FcγRIIA (CD32A) или обладает ими, как определено, используя способы, известные квалифицированному в данной области техники специалисту и приведенные здесь в качестве примера. Анализы ADCC, используемые в соответствии со способами по настоящему изобретению, могут быть НК-зависимыми или макрофагозависимыми.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления настоящим изобретением охватываются молекулы, включающие вариант Fc-области, причем указанный вариант придает им уменьшенную ADCC активность и/или уменьшенное связывание с Fc γ RIIIA (CD16A) или обладает ими, как определено, используя способы, известные квалифицированному в данной области техники специалисту и приведенные здесь в качестве примера. Анализы ADCC, используемые в соответствии со способами по настоящему изобретению, могут быть NK-зависимыми или макрофагозависимыми.

Варианты Fc по настоящему изобретению могут быть в комбинации с другими модификациями Fc, такие как те, которые описаны в патентах США №№ 7632497, 7521542, 7425619, 7416727, 7371826, 7355008, 7335742, 7332581, 7183387, 7122637 и 6737056; в публикациях PCT-заявок с № WO 2008/105886; WO 2008/002933; WO 2007/021841; WO 2007/106707; WO 06/088494; WO 05/115452; WO 05/110474; WO 04/1032269 и WO 04/063351 и в Presta, L.G. et al. (2002) "Engineering therapeutic antibodies for improved function", *Biochem. Soc. Trans.* 30(4): 487-490; Shields, R.L. et al. (2002) "Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc γ RIII and antibody-dependent cellular toxicity", *J. Biol. Chem.* 26; 277(30): 26733-26740, и Shields, R.L. et al. (2001) "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R", *J. Biol. Chem.* 276(9): 6591-6604. Настоящим изобретением охватывается комбинация варианта Fc по настоящему изобретению с другими модификациями Fc для придания модифицированному антителу аддитивных, синергетических или новых свойств.

В других вариантах осуществления настоящим изобретением охватывается использование любого варианта Fc, известного в данной области техники, такого как те, которые описаны в Jefferis, B.J. et al. (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For Fc γ R: Current Models", *Immunol. Lett.* 82: 57-65; Presta, L.G. et al. (2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function", *Biochem. Soc. Trans.* 30: 487-90; Idusogie, E.E. et al. (2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement", *J. Immunol.* 166: 2571-75; Shields, R.L. et al. (2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc Gamma RI, Fc Gamma RII, Fc Gamma RIII, And FcRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc gamma R", *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604; Idusogie, E.E. et al. (2000) "Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc", *J. Immunol.* 164: 4178-84; Reddy, M.P. et al. (2000) "Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4", *J. Immunol.* 164: 1925-1933; Xu, D. et al. (2000) "In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies", *Cell. Immunol.* 200: 16-26; Armour, K.L. et al. (1999) "Recombinant human IgG Molecules Lacking Fc γ Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities", *Eur. J. Immunol.* 29: 2613-24; Jefferis, R. et al. (1996) "Modulation Of Fc (Gamma) R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions", *Immunol. Lett.* 54: 101-04; Lund, J. et al. (1996) "Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains", *J. Immunol.* 157: 4963-4969; Hutchins et al. (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 92: 11980-84; Jefferis, R. et al. (1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation", *Immunol. Lett.* 44: 111-17; Lund, J. et al. (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors", *FASEB J.* 9: 115-19; Alegre, M.L. et al. (1994) "A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo", *Transplantation* 57: 1537-1543; Lund et al. (1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma RII", *Mol. Immunol.* 29: 53-59; Lund et al. (1991) "Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG", *J. Immunol.* 147: 2657-2662; Duncan, A.R. et al. (1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG", *Nature* 332: 563-564; в патентах США №№ 5624821, 5885573, 6194551, 7276586 и 7317091; и публикациях PCT-заявок с № WO 00/42072 и WO 99/58572.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения включает вариант Fc-области (в том числе Fc, происходящую из любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY) или класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂) или подкласса иммуноглобулинов человека), причем указанный вариант Fc-области включает по крайней мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с Fc-областью дикого типа, который (вариант Fc-области) демонстрирует уменьшенное или аннулированное связывание с одним или более лигандов-эффекторов, как определено с помощью стандартных исследований, известных в данной области техники и описанных здесь, относительно сравнимой молекулы, включающей Fc-область дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc-домена антитела по настоящему изобретению включает модификацию аминокислоты (т.е. вставку, замену, делецию) в одном или более из положений остатков 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 270, 297, 298, 299. В конкретном варианте осуществления одной или более модификаций аминокислот, которые уменьшают или аннулируют связывание с одним или более лигандов-эффекторов, является замена фенилаланином или пролином в положении 233; замена аланином в положении 234; замена аланином или глутаминовой кислотой в положении 235; замена аланином в положении 236, замена аланином в положении 237, замена аргинином в положении 238; замена аланином или глутаминовой кислотой в положе-

нии 265; замена аланином или аспарагином в положении 270; замена аланином или глутамином в положении 297; замена фенилаланином, аспарагином или пролином в положении 298; замена любой аминокислотой, отличной от серина или треонина, в положении 299 или комбинация из двух или более вышеперечисленных замен. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает Fc-домен, содержащий замену аланином в положении 265 и в положении 297; замену аланином в положении 265 и глутамином в положении 297; замену глутаминовой кислотой в положении 265 и аланином в положении 297; или замену глутаминовой кислотой в положении 265 и глутамином в положении 297. В предпочтительных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает Fc-домен, содержащий модификацию (например, замену, вставку, делецию) в положении 234 и в положении 235 Fc-области. В конкретном примере в соответствии с этим вариантом осуществления антитело по настоящему изобретению включает Fc-домен, содержащий замену аланином в положении 234 и замену глутаминовой кислотой в положении 235. Тем не менее, в более предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению включает Fc, содержащий замену аланином в положении 234 и замену аланином в положении 235.

В других вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает вариант Fc-области, который демонстрирует уменьшенное или аннулированное связывание с одним или более лигандами-эффекторами, как определено с помощью стандартных исследований, известных в данной области техники и описанных здесь, относительно сравнимой контрольной молекулы. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению имеет Fc-область, демонстрирующую уменьшенное или аннулированное связывание с одним или более лигандами-эффекторами, которая включает фенилаланин или пролин в положении 233; аланин в положении 234; аланин или глутаминовую кислоту в положении 235; аланин в положении 236, аланин в положении 237, аргинин в положении 238; аланин или глутаминовую кислоту в положении 265; аланин или аспарагин в положении 270; аланин или глутамин в положении 297; фенилаланин, аспарагин или пролин в положении 298; любую аминокислоту, отличную от серина или треонина, в положении 299 или комбинацию из двух или более вышеперечисленных замен. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает Fc-домен, содержащий аланин в положении 265 и в положении 297; аланин в положении 265 и глутамин в положении 297; глутаминовую кислоту в положении 265 и аланин в положении 297; или глутаминовую кислоту в положении 265 и глутамин в положении 297. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает Fc-домен, содержащий аланин в положении 234 и глутаминовую кислоту в положении 235. В предпочтительных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает Fc, содержащий аланин в положении 234 и аланин в положении 235.

Антитела по настоящему изобретению, которые включают Fc-домен, содержащий аланин в положениях, соответствующих 234 и 235 согласно системе нумерации по Kabat, известны как "ala-ala" антитела. В некоторых вариантах осуществления использование "ala-ala" Fc-доменов и/или других комбинаций из комбинаций аминокислот, описываемых здесь (в том числе комбинаций, включающих "ala-ala" Fc-домены), может аннулировать связывание Fc-домена со всеми Fc γ R. Связывание Fc-домена с одним или более Fc γ R можно определить с помощью любого способа, описанного здесь и/или известного в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислот, которые аннулируют связывание со всеми Fc γ R или уменьшают или аннулируют связывание с одним или более лигандами-эффекторами, включают комбинации модификаций, перечисленные здесь, или комбинации модификаций, перечисленные здесь, с любой из тех, которые могут обеспечить связывание нулевого порядка с любым FcR (например, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIA), как определено с помощью способов, описанных здесь или известных квалифицированному в данной области техники специалисту. Как это будет без труда понятно квалифицированному в данной области техники специалисту, такие антитела по настоящему изобретению могут найти конкретное применение при лечении аутоиммунного заболевания, в случае которого антитела против CD3 и антигенсвязывающие фрагменты служат для модулирования функции иммунной системы без связанной реакции на первую дозу, характерной для антител против иммуноцитов.

В некоторых вариантах осуществления антитела против CD3 и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты характеризуются уменьшенным (например, но без ограничения, меньше 50, меньше 40, меньше 30, меньше 20, меньше 10, меньше 5 или меньше 1% по сравнению со связыванием белком, включающим контрольный Fc-домен) или более предпочтительно не обнаруживаемым связыванием с одним или более из любых Fc γ R (например, Fc γ RI, Fc γ RII или Fc γ RIII) благодаря своему Fc-домену, как определено с помощью обычных в данной области техники анализов. Дополнительно или альтернативно, антитела против CD3 и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, или их антигенсвязывающие фрагменты, могут характеризоваться уменьшенным (например, но без ограничения, меньше 50, меньше 40, меньше 30, меньше 20, меньше 10, меньше 5 или меньше 1% по сравнению со связыванием контрольным белком, включающим контрольный Fc-домен) или более предпочтительно не обнаруживаемым связыванием с любыми рецеп-

торами комплемента, такими как C1q, как определено в обычно используемых анализах. В отдельных вариантах осуществления антитело является негликозилированным. В других вариантах осуществления в антителе отсутствует Fc-домен (например, оно представляет собой Fab-фрагмент, F(ab')₂ или одноцепочечное антитело).

Таким образом, антитела по настоящему изобретению являются, в частности, полезными, поскольку они характеризуются уменьшенной *in vivo* токсичностью, причиной которой является продукция лимфокинов или выброс цитокинов, или ее отсутствием. Способы определения продукции лимфокинов и выброса цитокинов известны и являются обычными в данной области техники и включены в настоящее описание. Например, выброс цитокинов можно определить посредством измерения секреции цитокинов, включающих, но без ограничения, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-16 (IL-16), PDGF, TGF- α , TGF- β , TNF- α , TNF- β , GCSF, GM-CSF, MCSF, IFN- α , IFN- β , TFN- γ , IGF-I, IGF-II. Например, смотрите Isaacs et al., 2001, *Rheumatology*, 40: 724-738; Soubrane et al., 1993, *Blood*, 81(1): 15-19; все из которых включены сюда посредством ссылки в их полном объеме.

D. CD3-специфические диатела DART™.

Как обсуждалось выше, настоящим изобретением, кроме того, охватываются биспецифические, триспецифические и полиспецифические антитела. Особенно предпочтительный пример таких антител включает молекулы диател "DART™", которые включают по крайней мере две полипептидные цепи, которые образуют по крайней мере два эпитопсвязывающих сайта, по крайней мере один из которых специфически связывается с CD3. Приводимые в качестве примера молекулы диател "DART™" представлены в US20100174053, US20090060910, US20070004909, EP2158221, EP1868650, WO2010080538, WO2008157379 и WO2006113665.

В предпочтительных вариантах осуществления первая полипептидная цепь диатела DART™ включает:

- (i) домен (A), включающий связывающую область варибельного домена легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), специфическую в отношении эпитопа (1);
- (ii) домен (B), включающий связывающую область варибельного домена тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), специфическую в отношении эпитопа (2); и
- (iii) домен (C);

вторая полипептидная цепь диатела DART™ включает:

- (i) домен (D), включающий связывающую область варибельного домена легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2), специфическую в отношении эпитопа (2);
- (ii) домен (E), включающий связывающую область варибельного домена тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), специфическую в отношении эпитопа (1); и
- (iii) домен (F).

Домены (A) и (B) диатела DART™ не ассоциируются друг с другом с образованием эпитопсвязывающего сайта. Так же домены (D) и (E) диатела DART™ не ассоциируются друг с другом с образованием эпитопсвязывающего сайта. Точнее, домены (A) и (E) диатела DART™ ассоциируются с образованием связывающего сайта, который связывает эпитоп (1); указанные домены (B) и (D) диатела DART™ ассоциируются с образованием связывающего сайта, который связывает указанный эпитоп (2). Домены (C) и (F) ковалентно связаны вместе.

Каждая полипептидная цепь молекулы диатела DART™ включает VL-домен и VH-домен, которые ковалентно связаны, так что самосборка доменов затруднена. Взаимодействие двух из полипептидных цепей будет приводить к двум спариваниям VL-VH, образуя два эпитопсвязывающих сайта, т.е. двухвалентную молекулу. Ни VH-домен, ни VL-домен не ограничивается каким-либо положением в полипептидной цепи, т.е. не ограничивается амино (N) концом или карбоксильным (C) концом, также домены не ограничиваются их положениями относительно друг друга, т.е. VL-домен может быть N-концевым по отношению к VH-домену и наоборот. Единственным ограничением является то, чтобы в распоряжении имелась комплементарная полипептидная цепь для образования функциональных диател DART™. Если VL- и VH-домены происходят из одного и того же антитела, две комплементарных полипептидных цепи могут быть идентичными. Например, если связывающие домены происходят из антитела, специфического в отношении эпитопа A (т.е. связывающий домен образован исходя из взаимодействия VL_A-VH_A), каждый полипептид будет включать VH_A и VL_A. Гомодимеризация двух полипептидных цепей антитела будет приводить к образованию двух связывающих сайтов VL_A-VH_A, приводя к двухвалентному моноспецифическому антителу. Если VL- и VH-домены происходят из антител, специфических в отношении различных антигенов, для образования функционального биспецифического диатела DART™ требуется взаимодействие двух различных полипептидных цепей, т.е. образование гетеродимера. Например, в случае биспецифического диатела DART™ одна полипептидная цепь будет включать VL_A и VL_B; гомодимеризация указанной цепи будет приводить к образованию двух связывающих сайтов VL_A-VH_B, или не связывающих, или непредсказуемо связывающих. В отличие от этого, если две отличающиеся полипептидные цепи могут взаимодействовать, например, в рекомбинантной экспрессионной системе, одна, вклю-

чающая VL_A и VH_B, а другая, включающая VL_B и VH_A, будут образовываться два отличающихся связывающих сайта: VL_A-VH_A и VL_B-VH_B. В случае всех пар полипептидных цепей диател DART™ существует вероятность неправильного совмещения или неправильного связывания двух цепей, т.е. взаимодействие доменов VL-VL или VH-VH; однако легко осуществить очистку функциональных антител на основе иммуноспецифичности правильно димеризованных связывающих сайтов, используя любой аффинный способ, известный в данной области техники или приведенный здесь в качестве примера, например аффинную хроматографию.

Одна или более из полипептидных цепей диатела DART™ может необязательно включать Fc-домен или его часть (например, CH2-домен или CH3-домен). Fc-домен или его часть может происходить из любого изоэпитипа или аллотипа иммуноглобулинов, в том числе, но без ограничения, IgA, IgD, IgG, IgE и IgM. В предпочтительных вариантах осуществления Fc-домен (или его часть) происходит из IgG. В конкретных вариантах осуществления изоэпитипом IgG является IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или его аллотип. В одном варианте осуществления молекула диатела включает Fc-домен, включающий CH2-домен и CH3-домен, которые независимо выбирают из любого изоэпитипа иммуноглобулинов (т.е. Fc-домен, включающий CH2-домен, происходящий из IgG, и CH3-домен, происходящий из IgE, или CH2-домен, происходящий из IgG1, и CH3-домен, происходящий из IgG2, и т.д.). Fc-домен можно спроектировать в полипептидной цепи, включающей молекулу диатела по настоящему изобретению, в любом положении относительно других доменов или частей указанной полипептидной цепи (например, Fc-домен, или его часть, может быть C-концевым по отношению к обоим VL- и VH-доменам полипептидной цепи; может быть N-концевым по отношению к обоим VL- и VH-доменам; или может быть N-концевым по отношению к одному домену и C-концевым по отношению к другому (т.е. находиться между двумя доменами полипептидной цепи)).

Fc-домены в полипептидных цепях молекул диател DART™ предпочтительно подвергаются димеризации, приводящей к образованию молекулы DART™, которая демонстрирует свойства, подобные таковым иммуноглобулинов, например взаимодействия Fc-Fcγ. Fc-включающие диатела могут быть димерами, например, состоящими из двух полипептидных цепей, каждая из которых включает VH-домен, VL-домен и Fc-домен. Димеризация указанных полипептидных цепей приводит к образованию двухвалентного диатела DART™, включающего Fc-домен, хоть и со структурой, отличной от таковой не модифицированного двухвалентного антитела. Такие молекулы диател DART™ будут проявлять измененные фенотипы по сравнению с иммуноглобулином дикого типа, например измененный полупериод существования в сыворотке, способности к связыванию и т.д. В других вариантах осуществления молекулы диател DART™, включающие Fc-домены, могут быть тетрамерами. Такие тетрамеры включают две "более тяжелые" полипептидные цепи, т.е. полипептидную цепь, включающую VL, VH и Fc-домен, и две "более легкие" полипептидные цепи, т.е. полипептидную цепь, включающую VL и VH. Более легкие и более тяжелые цепи взаимодействуют с образованием мономера, и указанные мономеры взаимодействуют благодаря их неспаренным Fc-доменам с образованием Ig-подобной молекулы. Такое Ig-подобное диатело DART™ является четырехвалентным и может быть моноспецифическим, биспецифическим или тетраспецифическим.

VI. Терапевтические способы применения антител против CD3 по настоящему изобретению.

Антитела против CD3 по настоящему изобретению и их антигенсвязывающие фрагменты, в частности, применимы для лечения злокачественных новообразований, связанных с экспрессией CD3, и для лечения аутоиммунного заболевания и других воспалительных нарушений.

Эти применения могут приводить к образованию комплекса между CD3 и антителом, которое специфически связывается с CD3. Примеры таких антител включают, но без ограничения, моноклональные антитела против CD3 mAb1 и mAb2 или, более предпочтительно их гуманизированные производные. Образование такого комплекса может происходить *in vitro* или *in vivo*. Без ограничения этой теорией, антитело против CD3 может связываться с CD3 благодаря экстраклеточному домену CD3 и может затем подвергаться интернализации в живую нормальную или раковую клетку.

A. Лечение рака.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связываются с CD3, присутствующим на поверхности T-клеток. Антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут использоваться в случае биспецифической (или триспецифической, или полиспецифической) молекулы, такой как молекула DART или ViTE, для перенаправления T-клеток на опухолевую клетку. T-клетка может затем уничтожить опухолевую клетку. Биспецифические (или триспецифические, или полиспецифические) молекулы по настоящему изобретению способны к связыванию как с CD3 человека, так и с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком (например, яванского макака), а также со вторым (или дополнительным) и отличным антигеном(ами) и эпитопом(ами). Вторым антигеном или эпитопом предпочтительно является опухолеспецифический антиген, представленный на опухолевой клетке. Такие опухолевые клетки могут быть из злокачественных новообразований, например рака молочной железы, рака предстательной железы, рака желудка, рака легкого, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичника, рака ротовой полости, рака глотки, рака

пищевода, рака гортани, рака кости, рака кожи, меланомы, рака матки, рака яичек, рака мочевого пузыря, рака почки, рака головного мозга, глиобластомы, рака щитовидной железы, лимфомы, миеломы и лейкоза. Такими дополнительными антигенами или эпитопами предпочтительно являются опухолеспецифические антигены или эпитопы на клеточной поверхности (такие как 17-1A, A33, основной антиген I эндодермального происхождения на эритроцитах взрослого человека, альфа-фетопроtein, антиген оболочки РНК-вируса опухоли, онкоэмбриональный антиген, специфический для опухоли мочевого пузыря, В7-Н1, В7-Н2, В7-Н3, В7-Н4, В7-Н5, В7-Н6, специфический для лимфомы Беркитта антиген-38.13, CA125, CD18, CD19, специфический для В-клеточной лимфомы человека антиген-CD20, CD22, CD33, CD44, CD52, СЕА, СО17-1А, СТА-1, СТЛА-4, рецептор эпидермального фактора роста, Ер-САМ, ЕрhА2, антиген I на эритроцитах новорожденного, антиген фибросаркомы, ганглиозид GD2, ганглиозид GD3, ганглиозид GM2, ганглиозид GM3, GICA 19-9, gp IIIb/IIIa, gp72, HER1, HER-2/neu, HER3, HER4, специфический для меланомы антиген с большой молекулярной массой, антиген HLA-DR, специфический для лейкоза человека Т-клеточный антиген-Gr37, специфический для карциномы легкого человека антиген L20, специфический для карциномы легкого человека антиген L6, антиген в виде глобулярной частицы молочного жира человека, IgE, специфический для карциномы KS 1/4 рап антиген, LEA, специфический для аденокарциномы антиген F3, специфический для злокачественных лимфоцитов человека антиген-АРО-1, специфический для меланомы антиген gp75, связанный с меланомой антиген p97, неогликопротеин, nuC242, специфический для полиморфного эпителия антиген муцинового типа, специфический для предстательной железы антиген, специфический для предстательной железы мембранный антиген, специфический для предстательной железы кислый фосфат, антиген SK-1, TAG-72, Т-антиген, опухолеспецифический антиген CA125, опухолеспецифический антиген MUC1, опухолеспецифический трансплантационный антиген клеточной поверхности, фактор роста сосудистого эндотелия, рецептор фактора роста сосудистого эндотелия и $\alpha\upsilon\beta 3$). Альтернативно, такие дополнительные антигены или эпитопы могут быть связаны с патогеном (таким как: вирус гепатита типа А, вирус гепатита типа В, вирус гепатита типа С, вирус гриппа, вирус ветряной оспы, аденовирус, вирус простого герпеса типа I (HSV-I), вирус простого герпеса типа II (HSV-II), возбудитель чумы рогатого скота, риновирус, ECHO-вирус, ротавирус, респираторно-синцитиальный вирус, папилломавирус, паповавирус, цитомегаловирус, эхиновирус, арбовирус, хантавирус, коксаки-вирус, вирус эпидемического паротита, вирус кори, вирус краснухи, полиовирус, возбудитель натуральной оспы, вирус Эпштейна-Барра, вирус иммунодефицита человека типа I (HIV-I), вирус иммунодефицита человека типа II (HIV-II), возбудитель вирусного менингита, возбудитель вирусного энцефалита, возбудитель денге, возбудитель натуральной оспы; микобактерии, рикетсии, микоплазма, нейссерии, *S. pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, возбудитель столбняка, возбудитель коклюша, возбудитель холеры, возбудитель чумы, возбудитель дифтерии, хламидии и легионеллы; лейшмания, возбудитель кокцидиоза, трипаносома или возбудитель малярии; хламидии и рикетсии).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связываются с CD3, присутствующим на поверхности Т-клеток. Используя обычные способы, такие антитела можно пометить флуоресцеином, как описано выше. При инкубации таких меченых молекул в присутствии биспецифической молекулы (такой как, например, диатело UDART™, содержащее эпитопсвязывающий домен, который связывается с Т-клеточным рецептором, и эпитопсвязывающий домен, который связывается с флуоресцеином ("TCR-UDART™")), они могут связываться с меткой - флуоресцеином - и таким образом сами локализоваться на поверхности клеток, которые экспрессируют CD3, и приводить к перенаправленному уничтожению таких клеток.

В альтернативном варианте осуществления CD19 может использоваться в качестве "второго" эпитопа, так что биспецифическое антитело, или более предпочтительно диатело DART™, распознающее CD3 и CD19, используется для уничтожения В-клеточной лимфомы благодаря вхождению в контакт и со специфическим для В-клеток антигеном (CD19), и с комплексом Т-клеточный рецептор/CD3 на Т-клетках-эффекторах. Как обсуждалось в Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", Blood 2011 blood-2010-09-306449, CD3/CD19-специфическое диатело DART™ использовалось для уничтожения В-клеточной лимфомы благодаря вхождению в контакт и со специфическим для В-клеток антигеном (CD19), и с комплексом Т-клеточный рецептор/CD3 на Т-клетках-эффекторах. В результате сравнения бок о бок с одноцепочечным биспецифическим антителом, содержащим последовательности Fv антитела против CD19 и CD3, выявлено, что DART является более эффективным в наведении на лизис В-клеток. Увеличенная активность при использовании CD19×CD3-биспецифического DART отмечалась в отношении всех CD19-экспрессирующих В-клеток-мишеней при оценке, используя покоящиеся и предварительно подвергнутые стимуляции PBMC человека или очищенные популяции Т-клеток-эффекторов. В результате определения характеристик CD19×TCR-биспецифического DART выявлена эффективность, эквивалентная таковой CD19×CD3 DART, что указывает на гибкость структуры DART в поддержании ассоциаций Т-клетка/В-клетка в случае применений для перенаправленного, опосредуемого Т-клетками уничтожения. Важно отметить, что увеличенный уровень уничтожения, опосредуемого молекулами DART, не сопро-

воздался каким-либо увеличением активации неспецифических Т-клеток или лизиса негативных по CD19 клеток. Исследования клеточных ассоциаций указывают на то, что структура DART хорошо подходит для сохранения межклеточных контактов, несомненно, вносящих вклад в высокий уровень уничтожения клеток-мишеней. Наконец, способность CD19×TCR-биспецифического DART к ингибированию В-клеточной лимфомы у мышей NOD/SCID при совместном введении с PBMC человека, кроме того, демонстрирует ценность молекул DART для лечения В-клеточных злокачественностей. Обладающие перекрестной реактивностью антитела против CD3 по настоящему изобретению могли бы использоваться таким же образом, как антитела против CD3 Moore, P.A. и др. Таким образом, настоящим изобретением обеспечивается терапия для раков (особенно лимфом и лейкозов), включающих CD3-экспрессирующие раковые клетки.

Биспецифические (или триспецифические, или полиспецифические) молекулы по настоящему изобретению предпочтительно вводят пациенту в одной или более стандартных доз, типично составляющих от 0,0001 до 100 мг/кг веса тела пациента. Предпочтительно, когда вводимая пациенту доза находится между 0,0001 и 20 мг/кг, 0,0001 и 10 мг/кг, 0,0001 и 5 мг/кг, 0,0001 и 2 мг/кг, 0,0001 и 1 мг/кг, 0,0001 и 0,75 мг/кг, 0,0001 и 0,5 мг/кг, 0,0001 и 0,25 мг/кг, 0,0001 и 0,15 мг/кг, 0,0001 и 0,10 мг/кг, 0,001 и 0,5 мг/кг, 0,01 и 0,25 мг/кг или 0,01 и 0,10 мг/кг веса тела пациента.

В. Лечение аутоиммунного заболевания и воспаления.

Настоящим изобретением также обеспечиваются способы лечения, предотвращения, замедления прогрессирования и/или уменьшения интенсивности симптомов опосредованных Т-клетками заболеваний или нарушений, включающих отторжение трансплантата, гомологичную болезнь, нежелательные реакции гиперчувствительности замедленного типа (такие как аллергические реакции замедленного типа), опосредованные Т-клетками заболевания легких и аутоиммунные заболевания. Опосредованные Т-клетками заболевания легких включают саркоидоз, аллергический альвеолит, острый интерстициальный пневмонит, альвеолит, фиброз легких, идиопатический фиброз легких и другие заболевания, характеризующиеся воспалительным поражением легких. Опосредованные Т-клетками аутоиммунные заболевания включают рассеянный склероз, неврит, полимиозит, псориаз, витилиго, синдром Гужеро-Шегрена, ревматоидный артрит, диабет типа I, аутоиммунный панкреатит, воспалительные заболевания кишечника (например, болезнь Крона и неспецифический язвенный колит), гломерулонефрит, склеродермию, саркоидоз, аутоиммунные заболевания щитовидной железы (например, зоб Хасимото и болезнь Грейвса), злокачественную миастению, болезнь Аддисона, аутоиммунный увеоретинит, обыкновенную пузырчатку, первичный билиарный цирроз, злокачественную анемию и системную красную волчанку (в частности, кожную форму), эффекты вследствие трансплантации органа, гомологичную болезнь (GVHD) и т.д. В частности, способы по настоящему изобретению полезны для субъектов с заболеванием на ранней стадии для замедления или уменьшения нарушения вследствие аутоиммунитета и сохранения высокого уровня функционирования и/или уменьшения необходимости в другой терапии (например, при лечении или профилактике сахарного диабета типа I способы настоящего изобретения могут уменьшить необходимость во введении экзогенного инсулина у субъекта). Кроме того, способы по настоящему изобретению могут преимущественно уменьшить частоту или привести к отсутствию частоты случаев синдрома выброса цитокинов, ранее связанного с введением терапевтических антител и, в частности, анти-Т-клеточного антитела (например, против CD3) или антигенсвязывающих фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления курс лечения антителом против CD3 или антигенсвязывающими фрагментами в соответствии со способами по настоящему изобретению повторяют с интервалами в 2, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 24, 30 или 36 месяцев. В конкретных вариантах осуществления эффективность лечения антителом против CD3 или антигенсвязывающими фрагментами по настоящему изобретению определяют, как описано здесь или как известно в данной области техники, через 2, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30 или 36 месяцев после предшествующего лечения.

В другом варианте осуществления субъекту вводят одну или более стандартных доз, составляющих приблизительно 0,5-50, приблизительно 0,5-40, приблизительно 0,5-30, приблизительно 0,5-20, приблизительно 0,5-15, приблизительно 0,5-10, приблизительно 0,5-5, приблизительно 1-5, приблизительно 1-10, приблизительно 20-40, приблизительно 20-30, приблизительно 22-28 или приблизительно 25-26 мкг/кг одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности. В другом варианте осуществления субъекту вводят одну или более стандартных доз, составляющих 200, 178, 180, 128, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 26, 25, 20, 15, 13, 10 м, 6,5, 5, 3,2, 3, 2,5, 2, 1,6, 1,5, 1, 0,5, 0,25, 0,1 или 0,05 мкг/кг одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности.

В одном варианте осуществления субъекту вводят одну или более доз, составляющих 200 мкг/кг или меньше, 175, 150, 128, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,5, 0,25, 0,1 или 0,05 мкг/кг или меньше одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более

симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности.

В отдельных вариантах осуществления субъекту вводят одну или более доз, составляющих приблизительно 5-1200, предпочтительно 51-826 мкг/м². В другом варианте осуществления субъекту вводят одну или более стандартных доз, составляющих 1200, 1150, 1100, 1050, 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10 или 5 мкг/м² одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения, лечения, замедления прогрессирования, отсрочки возникновения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности.

В другом варианте осуществления субъекту назначают схему лечения, включающую одну или более доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, причем курс лечения осуществляют в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней. В одном варианте осуществления схема лечения включает введение доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов каждый день, через день, каждый третий день или каждый четвертый день. В некоторых вариантах осуществления схема лечения включает введение доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов в понедельник, вторник, среду, четверг конкретной недели и не введение доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов в пятницу, субботу или воскресенье той же недели, пока не будет введено 14, 13, 12, 11, 10, 9 или 8 доз. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза является одинаковой каждый день схемы. В некоторых вариантах осуществления субъекту назначают схему лечения, включающую одну или более доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, причем профилактически или терапевтически эффективное количество составляет 200, 175, 150, 125, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 26, 25, 20, 15, 13, 10, 6,5, 5, 3,2, 3, 2,5, 2, 1,6, 1,5, 1, 0,5, 0,25, 0,1 или 0,05 мкг/кг/день; и/или причем профилактически или терапевтически эффективное количество составляет 1200, 1150, 1100, 1050, 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10 или 5 мкг/м²/день. В другом варианте осуществления внутривенную дозу, составляющую 1200, 1150, 1100, 1050, 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10 или 5 мкг/м² или меньше одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, вводят в течение приблизительно 24, приблизительно 22, приблизительно 20, приблизительно 18, приблизительно 16, приблизительно 14, приблизительно 12, приблизительно 10, приблизительно 8, приблизительно 6, приблизительно 4, приблизительно 2, приблизительно 1,5, приблизительно 1 ч, приблизительно 50, приблизительно 40, приблизительно 30, приблизительно 20, приблизительно 10, приблизительно 5, приблизительно 2, приблизительно 1 мин, приблизительно 30 или приблизительно 10 с для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности. Суммарная доза за время реализации схемы предпочтительно составляет всего менее 9000, 8000, 7000, 6000 мкг/м² и может составлять менее 5000, 4000, 3000, 2000 или 1000 мкг/м². В конкретных вариантах осуществления суммарная доза, назначаемая в схеме, составляет 100-200, 100-500, 100-1000 или 500-1000 мкг/м².

В предпочтительных вариантах осуществления дозу увеличивают на протяжении первых четырех, первой половины и первых 2/3 доз (например, в течение первых 2, 3, 4, 5 или 6 дней схемы введения в течение 10, 12, 14, 16, 18 или 20 дней одной дозы в день) схемы лечения до достижения суточного профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления субъекту назначают схему лечения, включающую одну или более доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, причем профилактически или терапевтически эффективное количество увеличивают, например, на 0,01, 0,02, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или 125 мкг/кг каждый день; или увеличивают, например, на 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 или 650 мкг/м², каждый день в ходе лечения. В некоторых вариантах осуществления субъекту назначают схему лечения, включающую одну или более доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, причем профилактически или терапевтически эффективное количество увеличивают в 1,25, в 1,5, в 2, в 2,25, в 2,5 или в 5 раз до достижения суточного профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов.

В конкретном варианте осуществления субъекту внутримышечно вводят одну или более доз, составляющих 200, предпочтительно 175, 150, 125, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,5 или 0,5 мкг/кг или меньше одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного

или более симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности.

В другом варианте осуществления субъекту подкожно вводят одну или более доз, составляющих 200, предпочтительно 175, 150, 125, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,5 или 0,5 мкг/кг или меньше одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения.

В другом варианте осуществления субъекту внутривенно вводят одну или более доз, составляющих 100, предпочтительно 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,5 или 0,5 мкг/кг или меньше одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности. В другом варианте осуществления внутривенную дозу, составляющую 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,5 или 0,5 мкг/кг или меньше одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, вводят в течение приблизительно 6, приблизительно 4, приблизительно 2, приблизительно 1,5, приблизительно 1 ч, приблизительно 50, приблизительно 40, приблизительно 30, приблизительно 20, приблизительно 10, приблизительно 5, приблизительно 2, приблизительно 1 мин, приблизительно 30 или приблизительно 10 с для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности.

В конкретных вариантах осуществления, в которых увеличивающиеся дозы вводят в течение первых дней схемы введения доз, доза в день 1 этой схемы составляет 5-100 мкг/м²/день и увеличивается до изложенной непосредственно выше суточной дозы к дню 3, 4, 5, 6 или 7. Например, в день 1 субъекту вводят дозу, составляющую приблизительно 51 мкг/м²/день, в день 2 - приблизительно 103 мкг/м²/день, в день 3 - приблизительно 207 мкг/м²/день, в день 4 - приблизительно 413 мкг/м²/день и в последующие дни этой схемы (например, дни 5-14) 826 мкг/м²/день.

В других вариантах осуществления первоначальная доза составляет 1/4, до 1/2, до равной суточной дозе в конце схемы, но вводится частями с интервалами в 6, 8, 10 или 12 ч. Например, составляющую 13 мкг/м²/день дозу вводят в четырех дозах, равных 3-4 мкг/кг, с интервалами в 6 ч для уменьшения уровня выброса цитокинов, причиной которого является введение антитела.

В конкретных вариантах осуществления для уменьшения вероятности выброса цитокинов и других неблагоприятных эффектов первые 1, 2, 3 или 4 дозы или все дозы в схеме вводят более медленно с помощью внутривенного введения. Например, доза, составляющая 51 мкг/м²/день, может вводиться в течение приблизительно 5, приблизительно 15, приблизительно 30, приблизительно 45 мин, приблизительно 1, приблизительно 2, приблизительно 4, приблизительно 6, приблизительно 8, приблизительно 10, приблизительно 12, приблизительно 14, приблизительно 16, приблизительно 18, приблизительно 20 и приблизительно 22 ч. В некоторых вариантах осуществления дозу вводят с помощью медленной инфузии в течение периода времени, составляющего, например, 20-24 ч. В конкретных вариантах осуществления дозу нагнетают на насос, предпочтительно увеличивая концентрацию антитела, вводимого в ходе инфузии.

В других вариантах осуществления может вводиться заданная часть схемы в увеличивающихся дозах. Например, в случае схемы введения 51-826 мкг/м²/день, описанной выше, часть может составлять $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{2}{3}$ или $\frac{3}{4}$ от суточных доз. Соответственно, когда часть будет равняться $\frac{1}{10}$, суточные дозы будут составлять 5,1 мкг/м² в день 1, 10,3 мкг/м² в день 2, 20,7 мкг/м² в день 3, 41,3 мкг/м² в день 4 и 82,6 мкг/м² в дни 5-14. Когда часть будет равняться $\frac{1}{4}$, дозы будут составлять 12,75 мкг/м² в день 1, 25,5 мкг/м² в день 2, 51 мкг/м² в день 3, 103 мкг/м² в день 4 и 207 мкг/м² в дни 5-14. Когда часть будет равняться $\frac{1}{3}$, дозы будут составлять 17 мкг/м² в день 1, 34,3 мкг/м² в день 2, 69 мкг/м² в день 3, 137,6 мкг/м² в день 4 и 275,3 мкг/м² в дни 5-14. Когда часть будет равняться $\frac{1}{2}$, дозы будут составлять 25,5 мкг/м² в день 1, 51 мкг/м² в день 2, 103 мкг/м² в день 3, 207 мкг/м² в день 4 и 413 мкг/м² в дни 5-14. Когда часть будет равняться $\frac{2}{3}$, дозы будут составлять 34 мкг/м² в день 1, 69 мкг/м² в день 2, 137,6 мкг/м² в день 3, 275,3 мкг/м² в день 4 и 550,1 мкг/м² в дни 5-14. Когда часть будет равняться $\frac{3}{4}$, дозы будут составлять 38,3 мкг/м² в день 1, 77,3 мкг/м² в день 2, 155,3 мкг/м² в день 3, 309,8 мкг/м² в день 4 и 620 мкг/м² в дни 5-14.

В конкретных вариантах осуществления антитело против CD3 или антигенсвязывающие фрагменты не вводят с использованием ежедневных доз на протяжении ряда дней, а точнее вводят с помощью инфузии непрерывно в течение 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 24, 30 или 36 ч. Инфузия может быть неизменной или может начинаться с более низкой дозы, вводимой в течение, например, первых 1, 2, 3, 5, 6 и 8 ч инфузии, и впоследствии увеличиваться до более высокой дозы. В ходе инфузии пациент получает дозу, равную количеству, вводимому в приводимых в качестве примера схемах, изложенных выше, например дозу, составляющую приблизительно 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 или 9000 мкг/м². В частности, скорость и продолжительность инфузии планируют в расчете на минимизацию уровня свободного антитела против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов у субъекта после введения. В некоторых вариантах осуществления уровень свободного антитела против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов не должен превышать 200 нг/мл свободного антитела. Кроме того, ин-

фузию планируют в расчете на достижение комбинированного покрытия и модуляции Т-клеточных рецепторов, составляющего по крайней мере 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 100%.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD3 или антигенсвязывающие фрагменты вводят для достижения определенного уровня комбинированного покрытия и модуляции Т-клеточных рецепторных комплексов на Т-клетках, определяемого с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, смотрите, например, пример 11 в публикации заявки на патент США № US 2003/0108548, которая тем самым включена в настоящее описание в качестве ссылки в ее полном объеме. В отдельных вариантах осуществления с помощью схемы введения доз достигается комбинированное покрытие и модуляция Т-клеточных рецепторов, составляющее по крайней мере 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 100% в отдельных вариантах осуществления с малым количеством или отсутствием выявляемого свободного антитела против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов (например, меньше 200 нг/мл лекарственного средства выявляется в крови пациента).

В предпочтительных вариантах осуществления антитело против CD3 или антигенсвязывающие фрагменты вводят парентерально, например внутривенно, внутримышечно или подкожно, или, альтернативно, вводят перорально. Антитело против CD3 или антигенсвязывающие фрагменты можно также вводить в виде препарата с замедленным высвобождением.

В отдельном варианте осуществления назначение одной или более доз или схемы введения доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов не вызывает или уменьшает по сравнению с другими иммуносупрессорами один или более из следующих нежелательных или неблагоприятных эффектов: отклонения основных показателей состояния организма (лихорадку, тахикардию, брадикардию, гипертензию, гипотензию), гематологические проявления (анемию, лимфопению, лейкопению, тромбоцитопению), головную боль, озноб, головокружение, тошноту, астению, боль в пояснице, боль в груди (сдавленность в груди), диарею, миалгию, боль, зуд, псориаз, ринит, потоотделение, реакцию в месте инъекции, расширение кровеносных сосудов, повышенный риск инфекции, вызываемой условно патогенными организмами, активацию вируса Эпштейна-Барр, апоптоз Т-клеток и повышенный риск развития некоторых типов рака. В другом отдельном варианте осуществления назначение одной или более доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов не вызывает или уменьшает по сравнению с другими иммуносупрессорами один или более из следующих нежелательных или неблагоприятных эффектов: отклонения основных показателей состояния организма (лихорадку, тахикардию, брадикардию, гипертензию, гипотензию), гематологические проявления (анемию, лимфопению, лейкопению, тромбоцитопению), головную боль, озноб, головокружение, тошноту, астению, боль в пояснице, боль в груди (сдавленность в груди), диарею, миалгию, боль, зуд, псориаз, ринит, потоотделение, реакцию в месте инъекции, расширение кровеносных сосудов, повышенный риск инфекции, вызываемой условно патогенными организмами, активацию вируса Эпштейна-Барр, апоптоз Т-клеток и повышенный риск развития некоторых типов рака.

В соответствии с настоящим изобретением дозу или схему введения доз, включающую профилактически или терапевтически эффективное количество одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для лечения аутоиммунного нарушения, можно повторять через 1, 2, 4, 6, 8, 12, 15, 18 или 24 месяца или дольше после первоначальной или предыдущей дозы или схемы введения доз, включающей профилактически или терапевтически эффективное количество одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов. Повторную дозу или схему введения доз можно назначать, как правило, когда симптомы, связанные с указанным аутоиммунным нарушением, снова возникают после ослабления после первоначальной или предыдущей дозы или схемы введения доз, или когда симптомы, связанные с указанным аутоиммунным нарушением, не ослабляются после первоначальной дозы или схемы введения доз антитела против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов в соответствии со способами по настоящему изобретению. Например, что касается диабета, повторную дозу или схему введения доз, включающую профилактически или терапевтически эффективное количество одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, можно назначать субъекту, когда, например, среднее суточное введение субъекту инсулина через 1, 2, 4, 6, 8, 12, 15, 18 или 24 месяца или дольше после первоначального или предыдущего лечения антителом против CD3 или антигенсвязывающими фрагментами не уменьшается по крайней мере на 5, по крайней мере 10, по крайней мере 20, по крайней мере 30, по крайней мере 40, по крайней мере 50, по крайней мере 60, по крайней мере 70, по крайней мере 80 или по крайней мере 90% по сравнению с уровнями до лечения. Альтернативно, что касается диабета, повторную дозу или схему введения доз, включающую профилактически или терапевтически эффективное количество одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, можно назначать субъекту, когда, например, уровни H₁A или H₁C у субъекта через 1, 2, 4, 6, 8, 12, 15, 18 или 24 месяца или дольше после первоначального или предыдущего лечения антителом против CD3 или антигенсвязывающими фрагментами не уменьшаются на по крайней мере 5, по крайней мере 10, по крайней мере 20, по крайней мере 30, по крайней мере 40, по крайней мере 50, по крайней мере 60, по крайней мере 70, по крайней мере 80 или по крайней мере 90% по сравнению с уровнями до лечения. В другом варианте осуществления, что касается диабета, повторную дозу

или схему введения доз, включающую профилактически или терапевтически эффективное количество одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, можно назначать субъекту, когда, например, ответ в виде увеличения С-пептида через 1, 2, 4, 6, 8, 12, 15, 18 или 24 месяца или дольше после первоначального или предыдущего лечения антителом против CD3 или антигенсвязывающими фрагментами уменьшается на более чем 5, более чем 10, более чем 20, более чем 30, более чем 40, более чем 50, более чем 60, более чем 70, более чем 80 или более чем 90% по сравнению с уровнями до лечения.

Аутоиммунные заболевания являются неинфекционными иммунологическими заболеваниями, вызванными иммунными ответами, направленными против нормальных компонентов клеток, тканей и органов человека. Аутоиммунные заболевания часто являются хроническими заболеваниями, которые мало-помалу разрушают являющиеся мишенями ткани и органы. Часто встречающиеся заболевания, в настоящее время отнесенные к аутоиммунным заболеваниям вследствие наличия несоответствующих аутоиммунных реакций, включают инсулинозависимый диабет типа I, ревматоидный артрит (РА), системную красную волчанку (SLE), рассеянный склероз (MS), воспалительное заболевание кишечника (IBD), злокачественную миастению, глютеновую болезнь, синдром Гужеро-Шегрена, болезнь Грейвса, болезнь Крона, аутоиммунный гепатит, псориаз, псориатический артрит, астму, аллергический ринит, эффекты вследствие трансплантации органа или гомологичную болезнь (GVHD) и многочисленные другие заболевания, в которые вовлечена воспалительная иммунная реакция.

Поскольку аутоиммунные заболевания типично являются хроническими, в их случае, как правило, требуется пожизненное лечение и слежение. По этой причине традиционные терапии для аутоиммунного заболевания, главным образом, направлены на борьбу с последствиями воспаления, вызванного заболеванием, и лишь немного аутоиммунных заболеваний можно вылечить или заставить исчезнуть с помощью такого лечения. В случае некоторых аутоиммунных заболеваний введение одного из ограниченного ряда иммуносупрессоров может привести к периодам ремиссии или исчезновения активного заболевания.

Иммуносупрессоры, используемые для дополнительной терапии, включают вещества, которые подавляют продукцию цитокинов, уменьшают или подавляют экспрессию аутоантигенов или маскируют антигены главного комплекса гистосовместимости (МНС).

Иммуносупрессоры включают противовоспалительные лекарственные средства (например, нестероидное противовоспалительное лекарственное средство ("NSAID"), циклофосфамид, бромокриптин, циклоспорин А, метотрексат, стероиды, такие как глюкокортикоиды, и цитокины или антагонисты рецепторов цитокинов. Пациенты редко могут прекратить прием этих иммуносупрессоров, поскольку аутоиммунное заболевание у них обычно вновь возникает при прекращении приема лекарственного средства. Аутоиммунное заболевание может стать не поддающимся лечению при продолжении приема иммуносупрессоров в течение длительного срока и может даже нуждаться в увеличивающихся дозах иммуносупрессоров.

Терапевтические антитела, направленные против CD3, как полагают, приводят к меньшему числу длительных побочных эффектов, чем многие из иммуносупрессорных химиотерапии, доступных в настоящее время для лечения аутоиммунных заболеваний (WO 2007/117600). Однако было установлено, что прежние терапии на основе антител являются проблематичными, особенно в случае использования многократного введения. Антилимфоцитарные терапии, такие как антилимфоцитарный глобулярный белок (ALG), и моноклональные антитела, направленные против В-клеток, такие как ритуксимаб (Rituxin®) и алемтузумаб (CAMPATH®), уменьшают популяции циркулирующих и тканевых В-клеток у подвергнутых лечению субъектов. Однако эти терапии также приводят к тяжелой форме иммуносупрессии, которая является нежелательной в случае лечения в течение длительного срока хронического аутоиммунного заболевания. Основным осложнением вызывающей тяжелую форму иммуносупрессии терапии является инфекция. Системная иммуносупрессия может также сопровождаться нежелательными токсическими эффектами и снижением уровней гемопоэтических стволовых клеток. Кроме того, у пациентов, получающих терапии на основе антител, часто вырабатываются значительные уровни человеческих антимышинных антител (НАМА), человеческих антихимерных антител (НАСА) и антиидиотипические ответы, которые могут ограничить повторные лечения, когда ремиссия заканчивается.

Как обсуждалось выше, антитела, направленные против антигенов Т-клетки, таких как Т-клеточный рецепторный комплекс (TCR), были предложены в качестве возможных терапевтических средств для иммуносупрессии аутоиммунного заболевания. Антитела против CD3, как полагают, вызывают такую иммуносупрессию в результате уменьшения патогенных Т-клеток и индукции регуляторных Т-клеток (WO 2007/117600; St. Clair E.W. (2009) "Novel Targeted Therapies for Autoimmunity", *Curr. Opin. Immunol.* 21(6): 648-657; Ludvigsson, J. (2009) "The Role of Immunomodulation Therapy in Autoimmune Diabetes", *J. Diabetes Sci. Technol.* 3(2): 320-330). По этой причине антитела против Т-клеток, в том числе против CD3, использовались для оказания влияния на иммунологический статус у субъекта посредством супрессии, усиления или перенаправления Т-клеточных реакций на антиген. В частности, Теплизумаб, также известный как hOKT3γ1 (Ala-Ala) (содержащий аланин в положениях 234 и 235) (MacroGenics, Inc.), явля-

ется антителом против CD3, которое было сконструировано для изменения функции Т-лимфоцитов, которые опосредуют разрушение инсулин-продуцирующих бета-клеток панкреатических островков. Теплизумаб связывается с эпитопом α -цепи CD3, представленной на зрелых Т-клетках, и поступает таким образом.

Благодаря частично своей перекрестной реактивности с нечеловеческим CD3 (которая делает возможным более точное и гибкое дозирование), антитела против CD3 по настоящему изобретению, как считают, особенно применимы для лечения аутоиммунного заболевания, несмотря на очевидные неудачи известного уровня техники.

Такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут использоваться отдельно или вместе с другими фармакологическими средствами. В частности, в настоящем изобретении предусматриваются терапии, включающие введение таких антител или антигенсвязывающих фрагментов вместе с антителами против В-клеток (или их антигенсвязывающими фрагментами). Антитела против В-клеток известны в данной области техники (смотрите WO 2007/117600; WO 2005/000901; WO 2004/035607; патенты США №№ 5500362 и 5736137, публикации заявок на патенты США №№ 2003/0219433, 2005/0271658, 2005/0271658, 2005/0281817, 2006/024295, 2006/024300 и 2006/034835; Clark, E.A. et al. (1985) "Role Of The Bp35 Cell Surface Polypeptide In Human B-Cell Activation", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82(6): 1766-1770; Press, O.W. et al. (1987) "Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B Cell Lymphomas", Blood 69: 584-591). Такое совместное введение можно выполнять, используя совместное введение отдельных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, или посредством образования биспецифических антител, или более предпочтительно посредством образования диател DART™, описанных выше, обладающих способностью к связыванию как с CD3, так и с В-клеточным антигеном.

Предпочтительно используемое антитело против В-клеток или антигенсвязывающий фрагмент будет направлено против маркера поверхности В-клеток, такого как маркер, выбираемый из CD19, CD20, CD22, CD23, CD32B, CD40, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD79a, CD79b, CD38, CD27, связанного с функцией лимфоцитов антигена (LFA), такого как LFA-I или LFA-3, CFA-I, или другой вспомогательной молекулы, вовлеченной в ассоциацию Т-клеток, В-клеток, которая приводит к активации Т-клеток и В-клеток в ходе адаптивного иммунного ответа. В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления антителом против В-клеток может быть истощающее В-клетки антитело, такое как антитело, направленное против маркера, выбираемого из CD19, CD20, CD22, CD23, CD32B, CD40, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), связанного с функцией лимфоцитов антигена (LFA), такого как LFA-I или LFA-3, CFA-I, или другой вспомогательной молекулы, вовлеченной в ассоциацию Т-клеток, В-клеток.

Альтернативно, такая комбинированная терапия может включать введение антитела против CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с антителом (или его антигенсвязывающим фрагментом), которое распознает антиген, присутствующий на антигенпрезентирующей клетке (например, B7-H3). Тем не менее, в дополнительном предпочтительном варианте осуществления комбинированная терапия включает введение антитела против CD3 (или его антигенсвязывающего фрагмента) в комбинации с антителом (или его антигенсвязывающим фрагментом), которое распознает полипептид, участвующий в активации В-клеток (или напрямую, или опосредованно), или иммуномодулятор, такой как член семейства цитокинов TNF или интерферон (например, α -, β - или γ -интерферон). Как это будет понятно квалифицированным в данной области техники специалистам, такие интерфероны участвуют в регуляции белков, которые работают сообща при процессировании и презентации антигенов. Эти цитокины стимулируют клетки с увеличением экспрессии в них тяжелых цепей класса I HLA. В одном предпочтительном варианте осуществления комбинированная терапия включает введение субъекту, имеющему активное аутоиммунное заболевание, антитела против Т-клеточного антигена в комбинации с антителом против β -интерферона. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления комбинированная терапия включает введение субъекту антитела, направленного против Т-клеточного антигена, в комбинации с антителом, выбираемым из антител против β -интерферона AVONEX®, BETASERON® и REBIF®. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления комбинированная терапия включает введение субъекту антитела, направленного против Т-клеточного антигена, в комбинации с антителом, направленным против β -интерферона, для лечения субъекта, страдающего рассеянным склерозом.

В дополнительном варианте осуществления антитело против CD3 может быть немитогенным антителом или антителом с уменьшенной митогенностью, которое ингибирует или предотвращает активацию Т-клетки, когда Т-клетка приходит в контакт со специфическим антигеном на антигенпрезентирующей клетке, в частности антигенпрезентирующей В-клетке. Используемый здесь термин "немитогенное по отношению к Т-клетке антитело" означает антитело, которое сконструировано посредством изменения Fc-рецептора антитела, так что оно не запускает первоначальные события активации и последующий выброс цитокинов, которые отмечаются при активации Т-клетки. "Антителом с уменьшенной митогенностью по отношению к Т-клетке", является антитело, специфическое в отношении Т-клеточного антигена, которое ослабляет первоначальные события активации и последующий выброс цитокинов, которые возникают при активации Т-клетки. Немитогенное антитело или антитело с уменьшенной митогенно-

стью может применяться для предотвращения первоначальных "побочных эффектов первой дозы", отмечаемых при введении пациенту антилимфоцитарного антитела. Немитогенным антителом или антителом с уменьшенной митогенностью может быть сконструированное антитело, содержащее модифицированный Fc-фрагмент, который предотвращает или ингибирует связывание клетками-эффекторами.

С. Способы введения.

В одном аспекте варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают являющихся людьми субъектов, подвергнутых лечению для достижения и сохранения клинической ремиссии в течение более длительных периодов времени, чем ремиссии, достигаемые у пациентов, подвергнутых лечению с использованием традиционной терапии. Например, если с помощью традиционной терапии достигается ремиссия симптомов аутоиммунного заболевания в течение 3 месяцев, композиции по настоящему изобретению могут обеспечить полную ремиссию симптомов вплоть до 6, вплоть до 12 месяцев и в некоторых случаях вплоть до одного-двух лет или дольше. Предусматривается, что в случае некоторых аутоиммунных заболеваний возможно достижение полной ремиссии, которая снова не прекращается, особенно если терапию начинают вскоре после диагностирования аутоиммунного заболевания.

Клиническая ремиссия, достигаемая с помощью комбинированной терапии, может быть полной ремиссией, или она может быть частичной ремиссией, при которой значительные ослабления симптомов заболевания сохраняются в течение продленного периода. Например, у субъекта, получающего терапию по настоящему изобретению, могут отмечаться уменьшенные аутоиммунные ответы, что определяется по уменьшению уровней обнаруживаемых аутоантител в жидкостях и тканях организма, например в спинномозговой жидкости (CSF), сыворотке, моче или в тканях организма. У субъекта, получающего комбинированную терапию по настоящему изобретению, могут также отмечаться уменьшенные Т-клеточные реакции на аутоантигены, что определяется с помощью *in vitro* анализов пролиферации или продукции цитокинов, используя моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) или очищенные Т-клетки, по сравнению с субъектами, подвергнутыми лечению с использованием традиционной терапии.

Композиции по настоящему изобретению могут вводиться любым подходящим способом, в том числе с помощью парентерального, местного, подкожного, внутривенного, внутримышечного, интраназального введения и/или введения внутрь пораженных тканей. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутривенное или подкожное введение. Кроме того, антитело можно соответственно ввести с помощью инфузии в прерывистом режиме, например, с использованием увеличивающихся доз антитела. Предпочтительно введение доз осуществляют внутривенно или подкожно, а более предпочтительно с помощью внутривенной инфузии(й). Каждое подвергание воздействию можно обеспечить, используя один и тот же или различные способы введения. В одном варианте осуществления каждое подвергание воздействию осуществляют с помощью внутривенного введения. В другом варианте осуществления каждое подвергание воздействию осуществляют с помощью подкожного введения. Тем не менее, в другом варианте осуществления подвергание воздействию осуществляют с помощью как внутривенного, так и подкожного введения.

В одном варианте осуществления терапевтического антитела вводят в виде медленной внутривенной инфузии, которая может начинаться с почасовой скоростью для доставки молекул по настоящему изобретению за приблизительно 15 мин-4 ч. Однако, если субъект демонстрирует инфузионную реакцию, скорость инфузии предпочтительно уменьшают, например, до половины скорости потока. Подвергаемые лечению субъекты могут получать профилактическое лечение ацетаминофеном/парацетамолом (например, приблизительно 1 г) и дифенгидрамина HCl (например, приблизительно 50 мг или эквивалентную дозу схожего средства), принимая их внутрь за приблизительно 30-60 мин до начала инфузии.

Лечение, обеспечиваемое комбинированными композициями по настоящему изобретению (включающими диател DART™), может назначаться субъекту, используя первоначальную дозу первого антитела, которая меньше количества такого антитела, которое необходимо для достижения клинической эффективности терапии для аутоиммунного заболевания при введении в виде терапии, предусматривающей одно антитело. Доза терапевтического антитела против Т-клеток, которая меньше дозы, необходимой для достижения истощения Т-клеток, способных распознавать аутоантигены и реагировать на них, при терапии, предусматривающей одно антитело, может быть достаточной для обеспечения желаемой клинической эффективности. Способы определения дозы терапевтического антитела, необходимой для достижения клинической эффективности, известны квалифицированным в данной области техники специалистам. Например, клиническую эффективность у субъекта можно определить как период времени до прогрессирования заболевания, уменьшение клинических симптомов, уменьшение уровней лабораторных маркеров, уменьшение необходимости в повторном лечении или с помощью любого другого клинического средства, признанного в качестве пригодного индикатора улучшения состояния аутоиммунного заболевания.

Второе антитело комбинированной терапии может также вводиться субъекту, нуждающемуся в лечении, в виде первоначальной дозы, которая меньше дозы, эффективной для достижения клинической эффективности при приведении только этого антитела. Например, дозы истощающего антитела против В-клеток, с помощью которых достигается составляющее менее чем 100% истощение В-клеток, состав-

ляющее менее чем 50% истощение В-клеток, составляющее менее чем 30% истощение В-клеток или даже не достигается истощение В-клеток, могут вводиться вместе с первым антителом против Т-клеток для достижения клинической эффективности, предусматривающей подавление иммунного ответа против аутоантигена, которая равна клинической эффективности, достигаемой при введении количества истощающего В-клетки антитела, которое обеспечивает 100% истощение В-клеток у субъекта при введении только этого антитела, или превосходит ее.

В некоторых случаях клинической эффективностью является эффективность, которая не достигается ни при введении только первого антитела, или только второго антитела. В других случаях клиническая эффективность может быть эквивалентна таковой, достигаемой при назначении терапии, предусматривающей одно антитело, причем комбинированная терапия обуславливает меньшую иммуносупрессию иммунной системы подвергаемого лечению субъекта, чем терапия, предусматривающая одно антитело. В одном предпочтительном варианте осуществления синергетическая реакция, обуславливаемая комбинированной терапией, уменьшает или аннулирует ответы против аутоантигена у субъекта при обеспечении более низких уровней иммуносупрессии. Общая иммуносупрессия является значительной проблемой для ранее доступных терапий на основе антител.

D. Фармацевтические препараты.

Терапевтические препараты антител, используемые в вариантах осуществления настоящего изобретения, готовят для хранения, поставки и введения посредством смешивания композиции по настоящему изобретению с желаемой степенью чистоты с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами, общепризнанными в фармацевтической области, в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает разрешенный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или приведенный в списке в Фармакопее США или других общепризнанных фармакопеех для применения для животных и конкретнее для людей. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту (например, адьюванту Фрейнда (полному и неполному)), эксципиенту или носителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут быть стерильными жидкостями, такими как вода или масла, в том числе масла нефтяные, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является предпочтительным носителем, когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно. В качестве жидких носителей могут также использоваться солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина, особенно в случае инъектируемых растворов. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицерин моностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое снятое молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция, если желательна, может также содержать незначительные количества смачивающих агентов или эмульгаторов, или pH-буферных веществ. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, препаратов с замедленным высвобождением и т.п.

Композиции по настоящему изобретению включают нерасфасованные композиции лекарственных средств, применимые для производства фармацевтических композиций, (например, композиции с примесью или нестерильные композиции) и фармацевтические композиции (т.е. композиции, которые подходят для введения субъекту или пациенту), которые могут использоваться для приготовления стандартных лекарственных форм. Такие композиции включают профилактически или терапевтически эффективное количество профилактического и/или терапевтического средства, описываемого здесь, или комбинации этих средств и фармацевтически приемлемый носитель. Предпочтительно, когда композиции по настоящему изобретению включают профилактически или терапевтически эффективное количество гуманизированных антител по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Как правило, ингредиенты композиций по настоящему изобретению поставляются или порознь, или смешаны вместе в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как ампула или саше, указывающем на количество активного агента. Если композиция должна вводиться с помощью инфузии, ее распределение осуществляют с использованием инфузионного флакона, содержащего стерильную воду или солевой раствор фармацевтического качества. Если композиция вводится с помощью инъекции, может предоставляться ампула со стерильной водой для инъекции или соевым раствором, так что ингредиенты могут быть смешаны до введения. Фармацевтические композиции, подходящие для инъекции, включают стерильные водные растворы, в которых активные агенты являются водорастворимыми, или дисперсии или стерильные порошки для приготовления стерильных инъектируемых растворов для немедленного введения. Композиции для применения в комбинированной терапии можно приготовить посредством включения активного антагониста или антитела в требуемом количестве вместе с подходящими носителями, например водой, этанолом, полиолом (например, глицерином, пропиленгликолем и жидким полиэтиленгликолем) и их подходящими смесями. В композицию могут быть включены агенты для придания изотоничности, такие как сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия.

Композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде нейтральных или соле-

вых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают, но без ограничения, те, которые образованы анионами, такими как те, которые получаются из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислоты и т.д., и те, которые образованы катионами, такими как те, которые получаются из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов трехвалентного железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Теперь после общего описания настоящего изобретения его будет легче понять благодаря ссылке на следующие примеры, которые предоставлены в качестве иллюстрации и, как предполагается, не являются ограничением настоящего изобретения, кроме особо оговоренных случаев.

Пример 1. mAb1 связывается как с CD3 человека, так и с CD3 яванского макака.

Для оценки способности mAb1 к связыванию с CD3 человека был выполнен ELISA с захватом. Планшеты покрывали 1 мкг/мл растворимого CD3 яванского макака ("sCD3") и инкубировали в присутствии различных концентраций химерного варианта антитела mAb1 (ch-mAb1) (содержащего последовательности переменных областей mAb1 и константные области антитела человека), гуманизованного варианта (h-mAb1) и антитела, состоящего из легкой цепи химерного антитела mAb1 и тяжелой цепи гуманизованного варианта mAb1. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 1A. Этот эксперимент показывает способность mAb1 к связыванию с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком. Кроме того, было выполнено сравнение связывания химерного антитела mAb1 с таковым антителом, в состав которого входят LC-2 гуманизованного варианта mAb1 и тяжелая цепь mAb1. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 1B. Этот эксперимент показывает способность mAb1 к связыванию с CD3 человека. Таким образом, фиг. 1A и 1B показывают, что гуманизованное mAb1 было способно к связыванию как с CD3 человека, так и с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком. Гуманизованное mAb1 продемонстрировало связывание с sCD3 и hCD3, схожее с таковым химерного mAb1.

Пример 2. Гуманизация mAb1.

Были приготовлены гуманизованные производные mAb1. Ниже представлены аминокислотные последовательности этих гуманизованных производных и кодирующие их полинуклеотидные последовательности. CDR начертаны полужирно и подчеркнуты.

Аминокислотная последовательность варианта 1 переменной области легкой цепи гуманизованного mAb1 (SEQ ID NO: 10):

DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITC**SASSSVS** **YMN**WYQQKPG KAPKRLIYDS
SKLASGVPSR FSGSGSSTEF TLTISLQPE DFATYYC**QQW** **SRNPPT**FGGG
 TKVEIK

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 1 переменной области легкой цепи гуманизованного mAb1 (SEQ ID NO: 11):

gacatccaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgcct ctgtggggcga
 cagagtgaca atcacctgtt ccgccagctc ctccgtgtcc tacatgaact
 ggtatcagca gaagcccggc aaggccccca agcggctgat ctacgactcc
 tccaagctgg cctccggcgt gccctccaga ttctccggct ctggctccgg
 caccgagttc accctgacca tctccagcct gcagcccag gacttcgcca
 cctactactg ccagcagtggt tcccggaaacc cccctacctt cggcggaggc
 accaaggtgg aatcaag

Аминокислотная последовательность варианта 2 переменной области легкой цепи гуманизованного mAb1 (LC-2 mAb1) (SEQ ID NO: 12):

DVVMTQSPAI MSAFPGEKVT ITC**SASSSVS** **YMN**WYQQKPG KAPKRWIYDS
SKLASGVPSR FSGSGSSTEF TLTISLQPE DFATYYC**QQW** **SRNPPT**FGGG
 TKVEIK

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 2 переменной области легкой цепи гуманизованного mAb1 (SEQ ID NO: 13):

gacgtggtga tgacccagtc tcctgccatc atgagtgtt tcccaggcga
 gaaagtgacc attacatgct ctgcttccag ctctgtgtcc tacatgaact
 ggtatcagca gaagccaggg aaagcaccca agaggtgat ctacgactcc
 tccaagctgg cctccggcgt gccaaagcgg ttctctggta gtggctcagg
 aaccgagttt actctgacca ttccagcct gcagcctgaa gatttcgcaa
 catactattg tcagcagtggt tccagaaatc cccctacctt tggcggaggg
 actaaagtgg aatcaag

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи гуманизованного mAb1 (SEQ ID NO: 14):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **RSTMH**WVRQA PGQGLEWIGY
INPSSAYTNY **NQKFKD**RVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAS**PO**
VHYDYNGFY WGQGTLLVTVS S

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи гуманизованного mAb1 (SEQ ID NO: 15):

```

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc
cgtgaaggtg tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc cggtcacca
tgcaactgggt ggcacaggcc caagccagg gactggaatg gatcggctac
atcaaccctt ccagcgccta caccaactac aaccagaaat tcaaggaccg
cgtgaccatc accgcccaca agtccaccag caccgcctac atggaactgt
ctagcctgcg gagcagggac accgcccgtg actactgcgc cccccccag
gtgcactacg actacaacgg cttcccctac tggggccagg gcaccctggt
gacagtgtcc tcc

```

Пример 3. Гуманизация mAb2.

Были приготовлены гуманизированные производные mAb2. Ниже представлены аминокислотные последовательности этих гуманизированных производных и кодирующие их полинуклеотидные последовательности. CDR начертаны полужирно и подчеркнуты.

Аминокислотная последовательность варианта 1 варибельной области легкой цепи гуманизованного mAb2 (VL-1 h-mAb2) (SEQ ID NO: 16):

```

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWFQQ KPGQAPRTLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTIITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 1 варибельной области легкой цепи гуманизованного mAb2 (VL-1 h-mAb2) (SEQ ID NO: 17):

```

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgcccaattg gttccagcag aagccaggac aggcaccaag gaccctgac
gggggtacaa acaaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

```

Аминокислотная последовательность варианта 2 варибельной области легкой цепи гуманизованного mAb2 (VL-2 h-mAb2) (SEQ ID NO: 18):

```

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRTLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTIITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 2 варибельной области легкой цепи гуманизованного mAb2 (VL-2 h-mAb2) (SEQ ID NO: 19):

```

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgcccaattg ggtgcagcag aagccaggac aggcaccaag gaccctgac
gggggtacaa acaaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

```

Аминокислотная последовательность варианта 3 варибельной области легкой цепи гуманизованного mAb2 (VL-3 h-mAb2) (SEQ ID NO: 20):

```

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWFQE KPGQAPRTLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTIITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 3 варибельной области легкой цепи гуманизованного mAb2 (VL-3 h-mAb2) (SEQ ID NO: 21):

```

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgcccaattg gttccaggag aagccaggac aggcaccaag gaccctgac
gggggtacaa acaaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

```

Аминокислотная последовательность варианта 4 варибельной области легкой цепи гуманизованного mAb2 (VL-4 h-mAb2) (SEQ ID NO: 22):

```

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWFQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTIITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 4 варибельной области легкой цепи гуманизованного mAb2 (VL-4 h-mAb2) (SEQ ID NO: 23):

```

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgcccaattg gttccagcag aagccaggac aggcaccaag gggcctgac
gggggtacaa acaaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

```

Аминокислотная последовательность варианта 5 варибельной области легкой цепи гуманизованного mAb2 (VL-5 h-mAb2) (SEQ ID NO: 24):

QAVVTQEPSSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQE KPGQAPRTLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTTTGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 5 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-5 h-mAb2) (SEQ ID NO: 25):

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac
 tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
 acgccaattg ggtgcaggag aagccaggac aggcaccaag gaccctgatc
 gggggtacaa acaaaaaggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
 tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
 acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Аминокислотная последовательность варианта 6 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-6 h-mAb2) (SEQ ID NO: 26):

QAVVTQEPSSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTTTGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 6 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-6 h-mAb2) (SEQ ID NO: 27):

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac
 tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
 acgccaattg ggtgcagcag aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc
 gggggtacaa acaaaaaggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
 tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
 acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Аминокислотная последовательность варианта 7 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-7 h-mAb2) (SEQ ID NO: 28):

QAVVTQEPSSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWFQE KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTTTGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 7 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-7 h-mAb2) (SEQ ID NO: 29):

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac
 tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
 acgccaattg gttccaggag aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc
 gggggtacaa acaaaaaggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
 tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
 acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Аминокислотная последовательность варианта 8 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-8 h-mAb2) (SEQ ID NO: 30):

QAVVTQEPSSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQE KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTTTGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 8 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-8 h-mAb2) (SEQ ID NO: 31):

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac
 tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
 acgccaattg ggtgcaggag aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc
 gggggtacaa acaaaaaggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
 tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
 acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Аминокислотная последовательность варианта 9 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-9 h-mAb2) (SEQ ID NO: 32):

QAVVTQEPSSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQE KPGQAFRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTTTGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 9 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-9 h-mAb2) (SEQ ID NO: 33):

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac
 tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
 acgccaattg ggtgcaggag aagccaggac aggcattcag gggcctgatc
 gggggtacaa acaaaaaggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
 tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
 acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Аминокислотная последовательность варианта 10 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-10 h-mAb2) (SEQ ID NO: 34):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCR**SSSTGAVT** **TSNYAN**WFQQ KPDHLFTGLI
 GG**TNKRAP**WT PARFSGSLLG GKAAALTTITGA **QAEDEADYYC** **ALWYSNLWV**F
 GGGTKLTVLG

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 10 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-10 h-mAb2) (SEQ ID NO: 35):

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac
 tgtgaccctg acatgcagat ccagcactgg agcagtgact acctetaact
 acgctaattg gttccagcag aagcccagc accctgtcac tgggctgac
 ggcggaacca acaaaaaggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag
 tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
 acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Аминокислотная последовательность варианта 1 варибельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-1 h-mAb2) (SEQ ID NO: 36):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT **YYADSVKDRF** TISRDDSKNS **LYLQMN**SLKT EDTAVYYCAR
HGNFGNSYVS **WFAY**WGQGL VTVSS

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 1 варибельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-1 h-mAb2) (SEQ ID NO: 37):

gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc cagggtggcag
 cctgcgactg tcttgccgag ctagtggctt caccttttct acatacgcca
 tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg
 atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actcagtga
 ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
 agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga
 cacggaactc tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcac attgggggtca
 gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

Аминокислотная последовательность варианта 2 варибельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-2 h-mAb2) (SEQ ID NO: 38):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT **YYADSVKDRF** TISRDDSKNS **LYLQMN**SLKT EDTAVYYCAR
HGNFGNSYVS **WFAY**WGQGL VTVSS

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 2 варибельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-2 h-mAb2) (SEQ ID NO: 39):

gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc cagggtggcag
 cctgcgactg tcttgccgag ctagtggctt cacctttaac acatacgcca
 tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg
 atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actcagtga
 ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
 agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga
 cacggaactc tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcac attgggggtca
 gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

Аминокислотная последовательность варианта 3 варибельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-3 h-mAb2) (SEQ ID NO: 40):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYAT **YYADSVKDRF** TISRDDSKNS **LYLQMN**SLKT EDTAVYYCAR
HGNFGNSYVS **WFAY**WGQGL VTVSS

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 3 варибельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-3 h-mAb2) (SEQ ID NO: 41):

gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc cagggtggcag
 cctgcgactg tcttgccgag ctagtggctt caccttttct acatacgcca
 tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtggccagg
 atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actcagtga
 ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
 agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga
 cacggaactc tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcac attgggggtca
 gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

Аминокислотная последовательность варианта 4 варибельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-4 h-mAb2) (SEQ ID NO: 42):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT **YYADSVKDRF** TISRDDSKNS **LYLQMN**SLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS **WFAY**WGQGL VTVSS

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 4 варибельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-4 h-mAb2) (SEQ ID NO: 43):

```

gaggtgcagc tgggtgaaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaaagg ggctggagtg ggtggccagg
atcagggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcac attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

```

Аминокислотная последовательность варианта 5 варибельной области тяжелой цепи гуманизованного mAb2 (VH-5 h-mAb2) (SEQ ID NO: 44):

```

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNLSLKT EDTAVYYCAR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGLT VTVSS

```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 5 варибельной области тяжелой цепи гуманизованного mAb2 (VH-5 h-mAb2) (SEQ ID NO: 45):

```

gaggtgcagc tgggtgaaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaaagg ggctggagtg ggtggccagg
atcagggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcac attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

```

Аминокислотная последовательность варианта 6 варибельной области тяжелой цепи гуманизованного mAb2 (VH-6 h-mAb2) (SEQ ID NO: 46):

```

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNLSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGLT VTVSS

```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 6 варибельной области тяжелой цепи гуманизованного mAb2 (VH-6 h-mAb2) (SEQ ID NO: 47):

```

gaggtgcagc tgggtgaaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaaagg ggctggagtg ggtggccagg
atcagggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcac attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

```

Аминокислотная последовательность варианта 7 варибельной области тяжелой цепи гуманизованного mAb2 (VH-7 h-mAb2) (SEQ ID NO: 48):

```

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNLSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGLT VTVSS

```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 7 варибельной области тяжелой цепи гуманизованного mAb2 (VH-7 h-mAb2) (SEQ ID NO: 49):

```

gaggtgcagc tgggtgaaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaaagg ggctggagtg ggtggccagg
atcagggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcac attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

```

Аминокислотная последовательность варианта 8 варибельной области тяжелой цепи гуманизованного mAb2 (VH-8 h-mAb2) (SEQ ID NO: 50):

```

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNLSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGLT VTVSS

```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 8 варибельной области тяжелой цепи гуманизованного mAb2 (VH-8 h-mAb2) (SEQ ID NO: 51):

```

gaggtgcagc tgggtgagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc
cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgcta
tgaattgggt ccgccaggct ccaggggaagg ggctggagtg ggttgcgaagg
atcagggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actctgtgaa
ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca ctgtatctgc
aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga
cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgcct attgggggaca
ggggacactg gtgactgtgt ctccc

```

Аминокислотная последовательность варианта QV варибельной области тяжелой цепи гуманизованного mAb2 (VH-QV h-mAb2) (SEQ ID NO: 52):

EVQLVESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNLLKT EDTAMYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант QV варибельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-QV h-mAb2) (SEQ ID NO: 53):

gaggtgcagc tgggtgaaaag cggcggagga ctggtgcagc caaagggatc
actgaaactg tcctgcgccc cctccggctt cacctttaac acatacgccta
tgaattgggt gcgacaggca cctggcaagg gcctggagtg ggtggcaagg
atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccc actctgtgaa
ggatagattc acaatcagtc gcgacgattc ccagagcatt ctgtatctgc
agatgaaaca tctgaaaact gaagacaccg ccatgtacta ttgtgtgccc
cacggttaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca
ggggacactg gtgactgtgt ctccc

Пример 4. mAb2 связывается как с CD3 человека, так и с CD3 яванского макака.

Как обсуждалось выше, антитело mAB2 было изначально выделено на основе его способности к связыванию с CD3 человека. Для оценки способности mAB2 к связыванию с нечеловеческим CD3 был выполнен ELISA с захватом. Планшеты покрывали 1 мкг/мл CD3 (или человека, или яванского макака) и инкубировали в присутствии различных концентраций химерного варианта антитела mAB2 (ch-mAb2) (содержащего последовательности варибельных областей mAB2 и константные области антитела человека). В качестве контроля планшеты также покрывали антителом, состоящим из легкой цепи гуманизированного mAb1 и тяжелой цепи химерного антитела. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 2А и 2В и показывают, что химерный вариант mAB2 продемонстрировал равное связывание с CD3 человека и с CD3 яванского макака.

Пример 5. Анализ связывающих свойств вариантов легкой и тяжелой цепей h-mAb2.

Анализ был проведен для определения эффекта вариаций остатков каркасных областей легкой цепи mAB2. В табл. 2 указаны исследованные замены.

Таблица 2

		Легкая цепь								
№ остатка по Kabat:		36	38	41	42	43	44	45	46	SEQ ID NO:
№ остатка SEQ ID NO: 5		38	40	43	44	45	46	47	48	
Вариант	mAb2-VL	V	E	D	H	L	F	T	G	5
	h-mAb2 VL-1	F	Q	G	Q	A	P	R	T	16
	h-mAb2 VL-2	V								18
	h-mAb2 VL-3		E							20
	h-mAb2 VL-4								G	22
	h-mAb2 VL-5	V	E							24
	h-mAb2 VL-6	V							G	26
	h-mAb2 VL-7		E						G	28
	h-mAb2 VL-8	V	E						G	30
	h-mAb2 VL-9	V	E				F		G	32
	h-mAb2 VL-10			D	H	L	F	T	G	34
		Тяжелая цепь								
№ остатка по Kabat:		30	49	52a	58	93				SEQ ID NO:
№ остатка SEQ ID NO: 7		30	49	53	61	99				
Вариант	mVH	N	A		Y	V				7
	hVH-1	S	G			A				36
	hVH-2	N								38
	hVH-3		A							40
	hVH-4					V				42
	hVH-5	N	A							44
	hVH-6	N				V				46
	hVH-6L	N			E	V				54
	hVH-6M	N		N	E	V				72
	hVH-7		A			V				48
	hVH-8	N	A			V				50
	hVH-8L	N	A		E	V				55
	hVH-8M	N	A	N	E	V				74

Были образованы антитела, имеющие легкие цепи mAB2 с SEQ ID NO: 11, но содержащие замены (с использованием нумерации по Kabat) D41G, H42Q, L43A, F44P, T45R или G46T, и тяжелые цепи химерного mAb2 (CDR mAB2 с hFR1-mFR2-hFR3-4), и их связывание оценивали, используя ELISA с захватом. Планшеты покрывали 1 мкг/мл экстраклеточного домена CD3 человека (растворимого hCD3 или "shCD3") и инкубировали в присутствии различных концентраций антитела. Результаты (фиг. 3) указывают на то, что замена T в положении 46 по Kabat аннулировала способность антитела к связыванию с shCD3.

Были проведены дополнительные исследования для определения влияния вариаций в положениях легкой цепи 36, 38, 44 и 46 по Kabat. Были образованы антитела, содержащие варибельную область легкой цепи VL-8 h-mAb2, VL-9 h-mAb2 или VL-10 h-mAb2 и тяжелую цепь химерного антитела mAB2, и их оценивали, используя описанный выше ELISA с захватом. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 4 и показывают, что связывание с shCD3 антителом, содержащим варибельную область легкой цепи hVL-8, было схожим с таковым антитела, содержащего легкую цепь химерного mAB2.

Были также образованы антитела, содержащие вариабельную область легкой цепи VL-6 h-mAb2, VL-7 h-mAb2 или VL-8 h-mAb2 и тяжелую цепь химерного антитела mAb2, и их оценивали, используя описанный выше ELISA с захватом (за исключением того, что планшеты покрывали 0,5 мкг/мл shCD3 в забуференном фосфатом солевом растворе) для определения влияния дополнительных замен в положениях 36, 38 и 46. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 5 и показывают, что замены F36V и T46G с использованием нумерации по Kabat были достаточными для получения антитела, связывание которого с shCD3 было схожим с таковым антитела, содержащего легкую цепь химерного mAb2.

Влияние замен в последовательности тяжелой цепи mAb2 оценивали посредством образования антител, содержащих легкую цепь химерного антитела mAb2 и вариабельную область тяжелой цепи VH-5 h-mAb2, VH-6 h-mAb2 или VH-7 h-mAb2, и оценки связывания, используя описанный выше ELISA с захватом (с использованием покрытия 1 мкг/мл shCD3). Результаты этих исследований представлены на фиг. 6. Кроме того, были образованы антитела, содержащие легкую цепь химерного антитела mAb2 и гуманизированный вариант вариабельной области тяжелой цепи VH-4 h-mAb2, VH-7 h-mAb2 или VH-9 h-mAb2. Связывание таких антител оценивали, используя описанный выше ELISA с захватом. Результаты этих исследований представлены на фиг. 7.

hVH-6L (и ее вариант hVH-6M) и hVH-8L (и ее вариант VH-8M) тяжелых цепей являются особенно предпочтительными для получения антител, обладающих меньшей аффинностью к CD3, чем антитела, в состав которых входят hVH-1, hVH-2, hVH-3, hVH-4, hVH-5, hVH-6, hVH-7 или hVH-8 табл. 2. В состав таких антител с уменьшенной аффинностью будет предпочтительно входить или hVH-6L тяжелой цепи, или VH-8L тяжелой цепи в комбинации с любой из VL-1 легкой цепи h-mAb2, VL-2 h-mAb2, VL-3 h-mAb2, VL-4 h-mAb2, VL-5 h-mAb2, VL-6 h-mAb2, VL-7 h-mAb2, VL-8 h-mAb2, VL-9 h-mAb2 или VL-10 h-mAb2. Особенно предпочтительное "деиммунизированное" антитело будет состоять из hVH-6L (или ее варианта hVH-6M) тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи h-mAb2, или hVH-8L (или ее варианта hVH-8M) тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи h-mAb2. Ниже представлены последовательности таких полипептидов.

Аминокислотная последовательность hVH-6L (SEQ ID NO: 54):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRNKYNNYAT EYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNLSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS
```

Аминокислотная последовательность hVH-8L (SEQ ID NO: 55):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRNKYNNYAT EYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNLSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS
```

hVH-6L и hVH-8L тяжелых цепей были, кроме того, модифицированы для получения вариантов, содержащих модификацию в виде замены на аспарагин в положении 52a (S52aN). Аминокислотные последовательности этих модифицированных вариабельных областей тяжелых цепей и соответствующие полинуклеотидные последовательности, кодирующие их, представлены ниже.

Аминокислотная последовательность hVH-6M (SEQ ID NO: 72):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT EYAASVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNLSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS
```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи hVH-6M (SEQ ID NO: 73):

```
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc
cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatagccta
tgaattgggt ccgccaggct ccaggggaagg ggctggagtg ggttgaagg
atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc gagtatgccg actctgtgaa
ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca ctgtatctgc
aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga
cacggttaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca
ggggacactg gtgactgtgt cttcc
```

Аминокислотная последовательность hVH-8M (SEQ ID NO: 74):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRNKYNNYAT EYAASVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNLSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS
```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи hVH-8M (SEQ ID NO: 75):

```
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc
cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatagccta
tgaattgggt ccgccaggct ccaggggaagg ggctggagtg ggttgaagg
atcaggaaca agtacaacaa ttatgcaacc gagtatgccg actctgtgaa
ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca ctgtatctgc
aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga
cacggttaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca
ggggacactg gtgactgtgt cttcc
```

hVH-8 di-1 и hVH-8 di-2 тяжелых цепей являются особенно предпочтительными для получения антител, которые являются менее иммуногенными, чем антитела, в состав которых входят hVH-1, hVH-2,

hVH-3, hVH-4, hVH-5, hVH-6, hVH7 или hVH-8 табл. 2. Такие "деиммунизированные" антитела будут предпочтительно состоять из или hVH-8 di-1 тяжелой цепи, или hVH-8 di-2 тяжелой цепи в комбинации с любой из VL-1 легкой цепи h-mAb2, VL-2 h-mAb2, VL-3 h-mAb2, VL-4 h-mAb2, VL-5 h-mAb2, VL-6 h-mAb2, VL-7 h-mAb2, VL-8 h-mAb2, VL-9 h-mAb2 или VL-10 h-mAb2. Особенно предпочтительное "деиммунизированное" антитело будет состоять из hVH-8 di-1 тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи h-mAb2, или hVH-8 di-2 тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи h-mAb2.

Аминокислотная последовательность hXR32VH-8 di-1 (SEQ ID NO: 56):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVAR
TRSKANSYTT YYAASVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNLSLKT EDTAVYYCAR
HGNGFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS

Аминокислотная последовательность hXR32VH-8 di-2 (SEQ ID NO: 57):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVGR
TRSKANSYTT YYAASVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNLSLKT EDTAVYYCAR
HGNGFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS

Такие "деиммунизированные" антитела будут предпочтительно состоять из или hVH-8 di-1 тяжелой цепи, или hVH-8 di-2 тяжелой цепи в комбинации с любой из VL-1 легкой цепи h-mAb2, VL-2 h-mAb2, VL-3 h-mAb2, VL-4 h-mAb2, VL-5 h-mAb2, VL-6 h-mAb2, VL-7 h-mAb2, VL-8 h-mAb2, VL-9 h-mAb2 или VL-10 h-mAb2. Особенно предпочтительное "деиммунизированное" антитело будет состоять из hVH-8 di-1 тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи h-mAb2, или hVH-8 di-2 тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи h-mAb2.

Были также созданы дополнительные гуманизированные варианты вариабельной области тяжелой цепи мышинового моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 7). Аминокислотные последовательности таких вариантов представлены ниже, при этом изменения по сравнению с SEQ ID NO: 7 начертаны полужирно и подчеркнуты.

Аминокислотная последовательность варианта "a" (I51T Y52cA) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышинового моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 76):

EVKLL**ESGGG** LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVAR
TASK**A**NNYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMN**NLKT** EDTAMYYCVR
HGNGFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSA

Аминокислотная последовательность варианта "b" (I51T N54S) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышинового моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 77):

EVKLL**ESGGG** LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVAR
TRSKY**N**SYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMN**NLKT** EDTAMYYCVR
HGNGFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSA

Аминокислотная последовательность варианта "c" (I51T A56T) вариабельной области тяжелой цепи мышинового моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 78):

EVKLL**ESGGG** LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVAR
TRSKY**N**NY**T** YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMN**NLKT** EDTAMYYCVR
HGNGFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSA

Аминокислотная последовательность варианта "d" (I51T Y52cA N54S) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышинового моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 79):

EVKLL**ESGGG** LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVAR
TRSK**A****N**SYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMN**NLKT** EDTAMYYCVR
HGNGFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSA

Аминокислотная последовательность варианта "e" (I51T N54S A56T) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышинового моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 80):

EVKLL**ESGGG** LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVAR
TRSKY**N**SY**T** YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMN**NLKT** EDTAMYYCVR
HGNGFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSA

Аминокислотная последовательность варианта "f" (I51T Y52cA N54S A56T) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышинового моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 81):

EVKLL**ESGGG** LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVAR
TRSK**A****N**SY**T** YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMN**NLKT** EDTAMYYCVR
HGNGFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSA

Аминокислотная последовательность варианта "g" (I51T D61A) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышинового моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 82):

EVKLL**ESGGG** LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVAR
TRSKYNNYAT YYA**A**SVKDRF TISRDDSQSI LYLQMN**NLKT** EDTAMYYCVR
HGNGFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSA

Аминокислотная последовательность варианта "h" (I51T D65G) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышинового моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 83):

EVKLL**ESGGG** LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVAR
TRSKYNNYAT YYADSVK**G**RF TISRDDSQSI LYLQMN**NLKT** EDTAMYYCVR
HGNGFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSA

Аминокислотная последовательность варианта "i" (I51T Y52cA N54S D61A) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышинового моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 84):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVAR
 TRSKANSYAT YYASVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNLLKT EDTAMYCVR
 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

Аминокислотная последовательность варианта "j" (I51T Y52cA N54S D65G) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 85):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVAR
 TRSKANSYAT YYADSVKGRF TISRDDSQSI LYLQMNLLKT EDTAMYCVR
 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

Аминокислотная последовательность варианта "k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAB2 (SEQ ID NO: 86):

EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVAR
 TRSKANSYAT YYASVKGRF TISRDDSQSI LYLQMNLLKT EDTAMYCVR
 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

Аминокислотная последовательность варианта "2k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G (VH8-A49G V93A)) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAB2 (SEQ ID NO: 87):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVGR
 TRSKANSYTT YYASVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNLLKT EDTAVYYCAR
 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

Аминокислотная последовательность варианта "5k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G (VH8-V93A)) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAB2 (SEQ ID NO: 88):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWRQA PGKGLEWVAR
 TRSKANSYTT YYASVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNLLKT EDTAVYYCAR
 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

Все такие дополнительные гуманизированные варианты вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAB2 могут использоваться для образования "деиммунизированных" антител по настоящему изобретению. В состав таких дополнительных "деиммунизированных" и гуманизированных антител будет предпочтительно входить вариабельная область тяжелой цепи: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, 2k или 5k, в комбинации с любой из вариабельных областей легких цепей: VL-1 h-mAb2, VL-2 h-mAb2, VL-3 h-mAb2, VL-4 h-mAb2, VL-5 h-mAb2, VL-6 h-mAb2, VL-7 h-mAb2, VL-8 h-mAb2, VL-9 h-mAb2 или VL-10 h-mAb2. В состав особенно предпочтительного "деиммунизированного" антитела будет входить вариабельная область тяжелой цепи 2k или 5k и вариабельная область легкой цепи VL-6 h-mAb2, или вариабельная область тяжелой цепи hVH-8M8L di-2 и вариабельная область легкой цепи VL-6 h-mAb2. Варианты 2k и 5k связываются с белком А в вариабельной области, что тем самым облегчает очистку молекул (таких как диатела), в которых могут отсутствовать Fc-области или другие домены, которые могут использоваться для отделения таких молекул от других молекул. Варианты hVH-8M, hVH-8L, hVH-6M и hVH-6L проявляют уменьшенную иммуногенность по сравнению с соответствующими родительскими полипептидами.

Настоящее изобретение, в частности, имеет отношение к "деиммунизированным" и гуманизированным антителам, в состав которых входят hVH-8 тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи. Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к "деиммунизированным" и гуманизированным антителам, в состав которых входят hVH-4 тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи. Кроме того, настоящее изобретение, в частности, имеет отношение к "деиммунизированным" и гуманизированным антителам, в состав которых входят hVH-2k тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи.

Пример 6. Анализ связывающих свойств вариантов легкой и тяжелой цепей химерного и гуманизированного mAb2.

Для оценки способности химерного и гуманизированного mAB2 к связыванию с нечеловеческим CD3 был выполнен ELISA с захватом. Планшеты покрывали 1 мкл/мл экстраклеточного домена CD3 (растворимого CD3) (или человека, или яванского макака) и инкубировали в присутствии различных концентраций антитела. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 8А и 8В и показывают, что mAB2 и его гуманизированный вариант продемонстрировали равное связывание с растворимым CD3 человека и с растворимым CD3 яванского макака.

Пример 7. Количественный анализ связывания mAb2 с CD3 человека и CD3 яванского макака.

Для определения степени связывания между mAB2 и CD3 человека или яванского макака были выполнены анализы BIACORE™. В анализах BIACORE™ определяется скорость диссоциации, k_d . Аффинность (K_D) антитела к его мишени зависит от кинетических констант ассоциации (скорости ассоциации, k_a) и диссоциации (скорости диссоциации, k_d) в соответствии с уравнением $K_D = k_d/k_a$. В анализах BIACORE™ используется поверхностный плазмонный резонанс для прямого определения этих кинетических параметров. Антитело против CD3 mAB2 (6,3-100 нМ) подвергали иммобилизации на подложке, используя антитела против ЕК, и инкубировали в присутствии растворимого CD3 человека (shCD3) или растворимого CD3 яванского макака (scCD3). Определяли динамику диссоциации, и выполняли приближение данных к двухвалентной природе антител. Результаты анализов BIACORE™ представлены на фиг. 9А-9D. Относящиеся к кинетике данные суммированы в табл. 3.

Таблица 3

shCD3			
Антитело	k_a	k_d	K_D
ch-mAb2	$1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$	$2.5 \times 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$	14.7 нМ
h-mAb2	$1.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$	$3.8 \times 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$	20.0 нМ
scCD3			
Антитело	k_a	k_d	K_D
ch-mAb2	$1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$	$2.3 \times 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$	14.4 нМ
h-mAb2	$1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$	$4.1 \times 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$	24.1 нМ

Пример 8. Относящиеся к биспецифическому связыванию данные для диател DART™, содержащих CDR h-mAb2.

CDR гуманизированного mAb2 (h-mAb2) использовали для создания ряда диател DART™, содержащих первый эпитопсвязывающий сайт, способный к связыванию с CD3, и второй эпитопсвязывающий сайт, способный к связыванию с Her2/neu (диатело DART™ "Her2-h-mAb2"), или с CD19 (диатело DART™ "CD19-h-mAb2"), или с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) (диатело DART™ "ERBITUX™-h-mAb2").

Диатело DART™ Her2/neu-h-mAb2.

Аминокислотная последовательность hXR32VL-Her-2VH-E-спираль диатела DART™ Her2-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hXR32VL и последовательностью Her2VH и между последовательностью Her2VH и последовательностью E-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 58):

QAVVTQEP^{SL} TVSPGGTV^{TL} TCRSSTGAVT TSNYANWVQ^Q KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTI^{TGA} QAEDEADY^{YC} ALWYSNLWV^F
GGGTKLTVL^G GGGSGGGG^{QV} QLQSGPEL^V KPGASLKLSC TASGFNIKDT
YIH^{WVKQRPE} QGLEWIGRI^Y PTNGYTRY^{DP} KFQDKATI^{TA} DTSSNTAYL^Q
VSRLTSE^{DTA} VYYCSR^{WGGD} GFYAMDY^{WQG} GASVTVSS^{GG} CGGGKVAAL^K
EKVAALKEK^V AALKEKVAAL^{KE}

Аминокислотная последовательность Her2VL-hXR32VH-K-спираль диатела DART™ Her2-h-mAb2 (линкеры между последовательностью Her2VL и последовательностью hXR32VH и между последовательностью hXR32VH и последовательностью K-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 59):

DIVMTQSHK^F MSTSVGDR^{VS} ITCKASQD^{VN} TAVAWYQQ^{KP} GHSPKLLI^{YS}
ASFRYTGVP^D RFTGNRSG^{TD} FTFTISSV^{QA} ADLAVYYC^{QQ} HYTPPTPF^{GG}
GTKLEIKRAG GGGSGGGG^{EVQ} LVESGGGL^{VQ} PGGSLRLS^{CA} ASGFTFNT^{YA}
M^{NWVRQAPGK} GLEWVAR^{IRS} KYN^{NYATYYA} DSVKDRFT^{IS} RDDSKNSL^{YL}
QMNSLKTED^T AVYYCVRH^{GN} FGNSYVSW^F YWQGTTLV^{TV} SSGGCGGG^{EV}
AALEKEVAAL EKEVAALKE^{VAALKEK}

Диатело DART™ CD19-h-mAb2.

Аминокислотная последовательность CD19VL-hXR32VH-E-спираль диатела DART™ CD19-h-mAb2 (линкеры между последовательностью CD19VL и последовательностью hXR32VH и между последовательностью hXR32VH и последовательностью E-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 60):

DIQLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSV^D YDGSYLNWY^Y QQIPGQPP^{KL}
LIYDASNL^{VS} GIPPRFSG^{SG} SGTDFTLN^{IH} PVEKVDAAT^Y HCQQSTED^{PW}
TFGGG^{TKLEI} KGGSGGGG^E VQLVESGG^{GL} VQPGGSLRL^S CAASGF^TNT
YAMN^{WVRQAP} G^KGLEW^{VARI} RSKY^{NNYATY} YADSVKDR^{FT} ISRDDSKNS^L
YLQ^{MNSL}KTE DTA^{VYYCVRH} GN^FGN^SYV^{SW} FAYW^{QGT}TLV TVSSGG^{CGGG}
EVAALKE^{VA} ALEKEVAAL^E KEVAAL^{EK}

Аминокислотная последовательность hXR32VL-CD19VH-K-спираль диатела DART™.

CD19-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hXR32VL и последовательностью CD19VH и между последовательностью CD19VH и последовательностью K-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 61):

QAVVTQEP^{SL} TVSPGGTV^{TL} TCRSSTGAVT TSNYANWVQ^Q KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTI^{TGA} QAEDEADY^{YC} ALWYSNLWV^F
GGGTKLTVL^G GGGSGGGG^{QV} QLQSGAEL^V R^{PGSSVK}I^{SC} KASGYAFSS^Y
WMN^{WVKQRPG} QGLEWIG^{QIW} PGDGD^{TNYNG} KFKGKATL^{TA} DES^SSTAYM^Q
LSS^{LASE}DSA VYFCAR^{RETT} TVGR^{YYYAMD} YWQGT^{TVTV} SSGGCGGG^{GK}
AALKEKVAAL KEKVAALKE^K VAALKE

Диатело DART™ ERBITUX™-h-mAb2.

Аминокислотная последовательность hXR32VL-EGFRVH-E-спираль диатела DART™ ERBITUX™-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hXR32VL и последовательностью EGFRVH и между последовательностью EGFRVH и последовательностью E-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 62):

QAVVTQEP^{SL} TVSPGGTV^{TL} TCRSSTGAVT TSNYANWVQ^Q KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTI^{TGA} QAEDEADY^{YC} ALWYSNLWV^F
GGGTKLTVL^G GGGSGGGG^{QV} QLKQSGPGL^V QPSQSL^{STC} TVSGFSL^{TNY}
GVH^{WVRQSPG} KGLEWLV^{GIW} SGGNTD^{YNT}P FTSRLS^{INKD} NSKSQV^{FFKM}
NSLQ^{SNDTAI} Y^YCARAL^{TY} D^YE^FFAYW^QG TLVTVSS^{GGC} GGG^{EVAAL}E^K
EVAALKE^{VA} ALEKEVAAL^E K

Аминокислотная последовательность EGFRVL-hXR32VH-K-спираль диатела DART™ ERBITUX™-h-mAb2 (линкеры между последовательностью EGFRVL и последовательностью hXR32VH и между последовательностью hXR32VH и последовательностью K-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 63):

DILLTQSPVI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TNIHWYQQRT NGSPELLIKY
 ASESISGIPS RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYCQQ NNNWPTTFGA
 GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFNTYAMN
 WVRQAPGKGL EWVARIIRSK NNYATYYADS VKDRFTISR DSKNSLYLQM
 NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTTLVTVSS GGCGGGKVA
 LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

Было установлено, что такие диатела DART™ способны к связыванию с CD3 яванского макака (фиг. 10A-10C).

CDR гуманизированного mAB2 (h-mAB2) использовали для создания ряда диател DART™, содержащих первый эпитопсвязывающий сайт, способный к связыванию с CD3, и второй эпитопсвязывающий сайт, способный к связыванию с B7-H3 (диатело DART™ "B7-H3-1-h-mAB2" и "B7-H3-2-h-mAb2").

Диатело DART™ B7-H3-1-h-mAb2.

Аминокислотная последовательность hBRCA69DVL-hXR32VH-E-спираль диатела DART™ B7-H3-1-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hBRCA69DVL и последовательностью hXR32VH и между последовательностью hXR32VH и последовательностью E-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 64):

DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
 TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQ EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
 GTKLEIKGGG SGGGGEVQL VESGGGLVQPG GGSRLRSCAA SGFTFNTYAM
 NWVRQAPGKGL LEWVARIRSK YNNYATYYAD SVKDRFTISR DDSKNSLYLQ
 MNSLKTEDTA VYYCVRHGNF GNSYVSWFAY WQGTTLVTVSS SGCGGGGEVA
 ALEKEVAALKE KEVAALKEKVA AALEK

Аминокислотная последовательность hXR32VL-hBRCA69DVH-K-спираль диатела DART™ B7-H3-1-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hXR32VL и последовательностью hBRCA69DVH и между последовательностью hBRCA69DVH и последовательностью K-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 65):

QAVVTQEPSSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTIITGA QAEDEADYYC ALWYNSLWVW
 GGGTKLTVLG GGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYFTFSY
 WMQWVRQAPG QGLEWMTIY PGDGDTRYTQ KFKGRVTITA DKSTSTAYME
 LSSLRSEDTA VYYCARRGIP RLWYFDVWGG GTTVTVSSGG CGGGKVAALKE
 EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

Диатело DART™ B7-H3-2-h-mAb2.

Аминокислотная последовательность hBRCA8 4DVL-hXR32VH-E-спираль диатела DART™ B7-H3-2-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hBRCA84DVL и последовательностью hXR32VH и между последовательностью hXR32VH и последовательностью E-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 66):

DIQLTQSPSF LSASVGRVIT ITCRASQND TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
 ASYRYSVGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQ EDFATYYCQQ YNNYPTTFGG
 GTKLEIKGGG SGGGGEVQL VESGGGLVQPG GGSRLRSCAA SGFTFNTYAM
 NWVRQAPGKGL LEWVARIRSK YNNYATYYAD SVKDRFTISR DDSKNSLYLQ
 MNSLKTEDTA VYYCVRHGNF GNSYVSWFAY WQGTTLVTVSS SGCGGGGEVA
 ALEKEVAALKE KEVAALKEKVA AALEK

Аминокислотная последовательность hXR32VL-hBRCA8 4DVH-K-спираль диатела DART™ B7-H3-2-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hXR32VL и последовательностью hBRCA84DVH и между последовательностью hBRCA84DVH и последовательностью K-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 67):

QAVVTQEPSSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTIITGA QAEDEADYYC ALWYNSLWVW
 GGGTKLTVLG GGSGGGGQV QLVESGGGLV QPGLSLRSC AASGFTFSSS
 GMHWVRQAPG KGLEWVAYIS SDSSAIYYAD TVKGRFTISR DNAKNSLYLQ
 MNSLRDEDTA VYYCGRGREN IYYSRLDYW GQGTTLVTVSS GGCGGGKVA
 LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

Было установлено, что такие антитела DART™ способны к связыванию с растворимым CD3 яванского макака (фиг. 10D).

Пример 9. Диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™), специфические в отношении HER2/neu и CD3, опосредуют мощное перенаправленное, опосредуемое T-клетками уничтожение.

Были приготовлены диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™), специфические в отношении HER2/neu и CD3. Такие диатела DART™ обладают способностью локализовать T-клетку (в результате связывания такой T-клетки с CD3-связывающей частью CD3-связывающего диатела DART™) в положении опухолевой клетки (в результате связывания такой раковой клетки с HER2/neu-связывающей частью диатела DART™). Локализованная T-клетка может затем уничтожить опухолевую клетку в ходе процесса, называемого здесь "перенаправленным" уничтожением.

Было сконструировано диатело - перенаправляющий реагент с двумя аффинностями (DART™), специфический в отношении HER2/neu и CD3, содержащее способные к связыванию с HER2/neu переменные домены трастузумаба и способные к связыванию с CD3 переменные домены VH-8 h-mab2 и VL-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 58-59).

Для демонстрации способности диател DART™ к опосредованию перенаправленного уничтожения раковых клеток, описанное выше HER2/neu×CD3-биспецифическое диатело DART™ инкубировали в различных концентрациях с опухолевыми клетками-мишенями (опухолевыми клетками SKOV-3, опухолевыми клетками SKBR-3, опухолевыми клетками A549 и опухолевыми клетками MCF-7) и покоящимися РВМС-эффекторами (отношение Е:Т=30:1), и определяли цитотоксичность (анализ LDH). Результаты этих исследований свидетельствуют о способности HER2/neu×CD3-биспецифического диатела DART™ к опосредованию перенаправленного уничтожения опухолевых клеток.

Пример 10. Терапия с использованием моноклонального антитела против TCR для пациентов с диабетом аутоиммунного генеза.

Пациенты.

40 пациентов с диабетом типа 1 привлекают для участия в соответствии со следующими критериями: возраст между 7 и 20 лет, диагностирование в пределах 6 недель в соответствии с критериями Американской ассоциации диабетологов и подтверждение наличия аутоантител против GAD65, ICA512 и/или инсулина. Пациенты остаются под наблюдением их личных врачей в ходе исследования.

Подходящих для участия в исследовании пациентов случайным образом зачисляют в контрольную группу и группу лечения гуманизированным антителом против CD3 (N297Q) (включающим VH-8 h-mab2 и VL-6 h-mab2). После рандомизации отбирают образцы крови для установления исходных уровней HА1с, устанавливают ответ в виде увеличения С-пептида до лечения в ММТТ, и выполняют FPIR до лечения в ИГТТ. Пациентов обеих групп госпитализируют для получения ими или 6-дневного курса лечения гуманизированным моноклональным антителом против CD3 (N297Q), или плацебо. Антитело вводят внутривенно в следующей дозе: 17 мкг/м² в день 1, 34,3 мкг/м² в день 2, 69 мкг/м² в день 3, 137,6 мкг/м² в день 4 и 275,3 мкг/м² в дни 5 и 6. Альтернативно, антитело может внутривенно вводиться в следующей дозе: 1,6 мкг/кг/день в день 1; 3,2 мкг/кг/день в день 2; 6,5 мкг/кг/день в день 3; 13 мкг/кг/день в день 4 и 26 мкг/кг/день в дни 5-14. В исследованиях с использованием увеличения дозы лечение может представлять собой, например, 1,42 мкг/кг/день в день 1; 5,7 мкг/кг/день в день 2; 11 мкг/кг/день в день 3; 26 мкг/кг/день в день 4 и 45,4 мкг/кг/день в дни 5-14. В последующих исследованиях терапию меняют с увеличением дозы и/или с уменьшением периода времени лечения. Например, в последующих исследованиях пациентам может назначаться 4-дневное лечение: 6,4 мкг/кг/день в день 1; 13 мкг/кг/день в день 2 и 26 мкг/кг/день в дни 3 и 4; во время дополнительных исследований с использованием увеличения дозы лечение может представлять собой 8 мкг/кг/день в день 1; 16 мкг/кг/день в день 2 и 32 мкг/кг/день в дни 3 и 4.

Во время первоначальных исследований дозу антитела в первые три дня лечения вводят с помощью медленной внутривенной инфузии в течение 20 ч для слежения за неблагоприятными реакциями. В последующих исследованиях время введения будут уменьшать, и/или дозу будут разбивать на 2-4 равных части, которые будут вводить в виде болюсных инъекций, равномерно распределенных в течение периода, составляющего 12 ч. Пациенты контрольной группы подвергаются метаболическим и иммунологическим исследованиям, но не получают моноклональные антитела. На протяжении всего исследования осуществляют контроль в отношении иммуносупрессорных эффектов моноклонального антитела против CD3 (N297Q) у пациентов.

За пациентами следят в течение 18 месяцев после лечения. Функционирование β-клеток определяют каждые 6 месяцев в случае уменьшенной толерантности к глюкозе и каждые 12 месяцев в случае нормальной толерантности к глюкозе. Пациентам разрешают соблюдать нормальный режим питания, и они остаются под наблюдением их личных врачей на протяжении всего исследования. Иммунологические анализы повторяют с интервалами в 6 месяцев. Пациенты будут получать терапию с использованием инсулина, как предписано их личными врачами.

Функционирование β-клеток будут анализировать в соответствии с изменениями уровней С-пептида, определяемых с помощью радиоиммуноанализа. После отбора образцов для установления исходных уровней С-пептида и глюкозы пациентам дают смешанную пищу. Уровни С-пептида определяют в образцах, отобранных через 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 и 240 мин. Ответ в виде увеличения С-пептида в тесте толерантности к смешанной пище (ММТТ) представляют в виде общей площади под кривой ответа (AUC). Считается, что изменение ответа произошло, если ответ отличается на более чем 7,5% от ответа при вхождении в исследование. Ответы в виде увеличения С-пептида у пациентов в ММТТ постоянно проверяют через 6, 9, 12, 15 и 18 месяцев после лечения. Альтернативно, функционирование β-клеток оценивают с использованием FPIR (выброса инсулина на первой фазе) в ИГТТ. Уровни инсулина в сыворотке определяют с использованием модификации способа радиоиммуноанализа с использованием двух антител, используя моноидированный тирозин A14-меченный инсулин (Amersham Pharmacia). FPIR рассчитывают как сумму уровней инсулина через 1 и 3 мин после введения глюкозы (0,5 г/кг). Уровни гликозилированного гемоглобина определяют с помощью исследования ингибирования латекс-агглютинации.

Иммунологическая проверка.

Уровень аутоантител против GAD65, IA2/ICA512 и инсулина определяют с помощью анализов ра-

диосвязывания, известных в данной области техники (например, Woo et al., 2000, J. Immunol Methods 244: 91-103). Генотипирование HLA-DQA и HLA-DQB выполняют с помощью прямого секвенирования полиморфизмов экзона 2 после амплификации с помощью ПЦР. Уровень цитокинов в сыворотке после введения моноклонального антитела определяют с помощью иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA). Продукцию антиидиотипических антител проверяют с помощью анализа ELISA, используя связанное с планшетом антитела против CD3 (N297Q), или с помощью проточной цитометрии для определения блокирования связывания анти-CD3-FITC с CD3-цепью TCR.

Статистический анализ.

Будут проводиться анализы данных, касающихся остаточной функции β -клеток, уровня аутоантител, уровня цитокинов и уровня гликозилированного гемоглобина. χ^2 анализ будут проводить для проверки эффекта лечения лекарственным средством до и после введения лекарственного средства. Сравнение между контрольной группой и группой лечения будут осуществлять с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Пример 11. Диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™), специфические в отношении B7H3 и CD3, опосредуют мощное перенаправленное, опосредуемое T-клетками уничтожение.

Были приготовлены диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™), специфические в отношении B7H3 и CD3. B7H3 был иммуногистологически обнаружен в линиях опухолевых клеток (Charoval, A. et al. (2001) "B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production", Nature Immunol. 2: 269-274; Saatian, B. et al. (2004) "Expression Of Genes For B7-H3 And Other T Cell Ligands By Nasal Epithelial Cells During Differentiation And Activation", Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 287: L217-L225; Castriconi et al. (2004) "Identification Of 4lg-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101(34): 12640-12645; Sun, M. et al. (2002) "Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes", J. Immunol. 168: 6294-6297). Несколько независимых исследований показали, что злокачественные опухолевые клетки человека демонстрируют явное увеличение экспрессии белка B7-H3, и что эта увеличенная экспрессия связана с увеличением тяжести заболевания (Zang, X. et al. (2007) "The B7 Family And Cancer Therapy: Costimulation And Coinhibition", Clin. Cancer Res. 13: 5271-5279), что наводит на мысль о том, что B7-H3 используется опухолями в качестве пути ускользания от иммунной системы (Hofmeyer, K. et al. (2008) "The Contrasting Role Of B7-H3", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30): 10277-10278).

CD3-связывающая часть таких антител DART™ состояла из описанных выше переменных областей легкой и тяжелой цепей гуманизованного mAb2 против CD3 (VH-8 h-mAb2 и VL-6 h-mAb2). B7H3-связывающая часть таких антител DART™ состояла из легкой цепи hBCA84D-2 и тяжелой цепи hBCA84D-2 (SEQ ID NO: 66-67).

Такие диатела DART™ обладают способностью локализовать T-клетку (в результате связывания такой T-клетки с CD3-связывающей частью CD3-связывающего диатела DART™) в положении опухолевой клетки (в результате связывания такой раковой клетки с B7H3-связывающей частью диатела DART™). Локализованная T-клетка может затем опосредовать уничтожение опухолевой клетки в ходе процесса "перенаправленного" уничтожения.

Для демонстрации способности таких диател DART™ к опосредованию такого перенаправленного уничтожения раковых клеток диатело DART™ инкубировали в различных концентрациях с опухолевыми клетками-мишенями (опухолевыми клетками A498, опухолевыми клетками RECA905021E) и покоящимися РВМС-эффекторами (отношение E:T=30:1), и определяли цитотоксичность (анализ LDH). Диатело DART™ (4420-h-mAb2), обладающее двумя специфичностями к CD3 (h-mAb2) и флуоресцеину (антитело 4420), использовали в качестве контроля.

Диатело DART™ 4420-h-mAb2.

Аминокислотная последовательность 4420VL-hXR32VH-E-спираль диатела DART™ 4420-h-mAb2 (линкеры между последовательностью 4420VL и последовательностью hXR32VH и между последовательностью hXR32VH и последовательностью E-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 68):

```
DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNQNTYLRW YLQKPGQSPK
VLIYKVSNRG SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
WTFGGGKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN
TYAMNWRQA PGKGLEWVAR IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDSKNS
LYLQMNLSLKT EDTAVYYCVR HGNFNGSYVS WFAYWGQGTL VTVSSGGCGG
GEVAALEKEV AALEKEVAAL EKEVAALEK
```

Аминокислотная последовательность hXR32VL-4420VH-K-спираль диатела DART™ 4420-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hXR32VL и последовательностью 4420VH и между последовательностью 4420VH и последовательностью K-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 69):

QAVVTQEP~~SL~~ TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADY~~YC~~ ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV KLD~~ET~~GGGLV QPGRPMKLS~~C~~ VASGFTFSDY
 WMNWVRQ~~SPE~~ KGLEWVAQIR NKPNY~~ET~~Y SDSVKGRFTI SRD~~DS~~KSSVY
 LQMNNLRVED MGIYYCTGSY YGMDYWGQGT SVTVSSGGCG G~~GK~~VAAALKEK
 VAALKEKVA~~A~~ LKEKVAALKE

Результаты этих исследований (фиг. 11A-11B) указывают на способность В7Н3×CD3-биспецифического диатела DART™ к опосредованию перенаправленного уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих В7Н3.

Пример 12. Диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™), специфические в отношении А33 и CD3, опосредуют мощное перенаправленное, опосредуемое Т-клетками уничтожение.

Были приготовлены диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™), специфические в отношении А33 и CD3 (диатело DART™ "А33-h-mAb2"). А33 является мембранным антигеном, который экспрессируется в нормальном эпителии толстой кишки и тонкой кишки человека и в >95% раков толстой кишки человека (Heath, J.K. et al. (1997) "The Human A33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein And A Novel Member Of The Immunoglobulin Superfamily", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 94: 469-474).

Такие диатела DART™ обладают способностью локализовать Т-клетку (в результате связывания такой Т-клетки с CD3-связывающей частью CD3-связывающего диатела DART™) в положении опухолевой клетки (в результате связывания такой раковой клетки с А33-связывающей частью диатела DART™). Локализованная Т-клетка может затем опосредовать уничтожение опухолевой клетки в ходе процесса "перенаправленного" уничтожения.

CD3-связывающая часть таких диател DART™ состояла из описанных выше переменных областей легкой и тяжелой цепей гуманизированного mAb2 (VH-8 h-mAb2 и VL-6 h-mAb2). А33-связывающая часть таких диател DART™ состояла из антитела RECA47.

Диатело DART™ А33-h-mAb2.

Аминокислотная последовательность RECA47VL-hXR32VH-К-спираль диатела DART™ А33-h-mAb2 (линкеры между последовательностью RECA47VL и последовательностью hXR32VH и между последовательностью hXR32VH и последовательностью К-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 70):

QIVLTQSPAI MSASPGERV~~T~~ MTC~~S~~ARSSIS FMYWYQQKPG SSPRLLIYDT
 SNLASGV~~PVR~~ FSGSGSGTSY SLTISRMEAE DAATYYCQ~~QW~~ S~~S~~YPLTFGSG
 TKLELKRGGG SGGGGEVQLV E~~S~~GGGLVQPG G~~S~~LRLSCAAS GFTFNTYAMN
 WVRQAPGKGL EWVARIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISR~~D~~ DSKNSLYLQ~~M~~
 NSLKTEDTAV YYCVRHGNF~~G~~ NSYVSWFAYW GQGLTVTVSS GCGGGKVA~~A~~
 LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

Аминокислотная последовательность hXR32VL-RECA47VH-Е-спираль диатела DART™ А33-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hXR32VL и последовательностью RECA47VH и между последовательностью RECA47VH и последовательностью Е-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 71):

QAVVTQEP~~SL~~ TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADY~~YC~~ ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLQ~~Q~~SGPELV KPGASVKI~~SC~~ KASGYTFSGS
 WMNWVKQ~~RPG~~ QGLEWIGRIY PGDGETNYNG KFKDKATLTA DKSSTTAYME
 LSSLTSVDSA VYFCARLYGN NVYFDVWGAG TTVTVSSGGC G~~G~~GEVAALKE
 EVAALKEKVA ALEKEVAALKE K

Для демонстрации способности таких диател DART™ к опосредованию такого перенаправленного уничтожения раковых клеток, диатело DART™ инкубировали в различных концентрациях с опухолевыми клетками-мишенями (опухолевыми клетками Co1o205, опухолевыми клетками RECA905021E) и покойющимися РВМС-эффektорами (отношение Е:Т=30:1), и определяли цитотоксичность (анализ LDH). Результаты этих исследований (фиг. 12A-12E) свидетельствуют о способности А33×CD3-биспецифических диател DART™ к опосредованию перенаправленного уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих А33.

Пример 13. Диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™), специфические в отношении CD3, приводят к перенаправленному, опосредуемому Т-клетками уничтожению, эквивалентному таковому в случае других специфических в отношении CD3 человека диател.

Для дальнейшей оценки диател - перенаправляющих реагентов с двумя аффинностями (DART™), специфических в отношении CD3 по настоящему изобретению, способность описанного выше диатела DART™ CD19-h-mAb2 к вызову перенаправленного, опосредуемого Т-клетками уничтожения сравнивали с таковой CD19×CD3-биспецифического диатела DART Moore, P.A. и др. (2011) ("Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", Blood 117(17): 4542-4551). Диатело DART™ CD19-h-mAb2 проявляет специфичность в отношении CD3 человека, а также нечеловеческого CD3; CD19×CD3-биспецифическое диатело DART Moore, P.A. и др. (2011) проявляет специфичность в отношении только CD3 человека.

Соответственно клетки В-клеточной лимфомы человека Raji (смотрите Drexler, H.G. et al. (1998) "History And Classification Of Human Leukemia-Lymphoma Cell Lines", *Leuk. Lymphoma* 31(3-4): 305-316; Arndt, R. (1984) "Demonstration Of C3-Binding Circulating Immune Complexes Using Raji, Conglutinin And Anti-C3 Assays - A Critical Review", *Immun. Infekt.* 12(1): 3-11) или клетки лимфомы из клеток ткани человека JeKo-1 (Salaverria, I. et al. (2006) "Mantle Cell Lymphoma: From Pathology And Molecular Pathogenesis To New Therapeutic Perspectives", *Haematologica* 91: 11-16; Jeon, H.J. et al. (1998) "Establishment And Characterization Of A Mantle Cell Lymphoma Cell Line", *Br. J. Haematol.* 102(5): 1323-1326) инкубировали в присутствии диатела DART™ и покоящихся мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) (E:T=30:1). Результаты этого эксперимента (фиг. 13А и 13В) показывают, что диатело DART™ CD19-h-mAb2 по настоящему изобретению приводит к перенаправленному, опосредуемому Т-клетками уничтожению, которое эквивалентно таковому, отмечаемому при использовании CD19×CD3-биспецифического диатела DART, специфического в отношении CD3 человека. Таким образом, расширение специфичности в отношении нечеловеческих гомологов CD3 не уменьшало способность диатела DART™ к опосредованию перенаправленного уничтожения.

Пример 14. Перенаправленный цитолиз с помощью диател перенаправляющих реагентов с двумя аффинностями (DART™), специфических в отношении CD3, обладающих перекрестной реактивностью с CD3 яванского макака.

Была исследована способность описанного выше диатела DART™ CD19-h-mAb2 DART™ к вызову перенаправленного, опосредуемого Т-клетками уничтожения в присутствии Т-клеток или человека, или яванского макака.

Клетки рака толстой кишки человека HT-29 (Marchis-Mouren, G. et al. (1988) "HT 29, A Model Cell Line: Stimulation By The Vasoactive Intestinal Peptide (VIP); VIP Receptor Structure And Metabolism", *Biochimie* 70(5): 663-671; Fogh, J. et al. (1975) In: J. Fogh (ed.), *HUMAN TUMOR CELLS IN VITRO*, New York: Plenum Press. 1975) инкубировали в присутствии Т-клеток человека или яванского макака (отношение E:T=30:1) и или описанного выше диатела DART™ CD19-h-mAb2, или CD19×CD3-биспецифического диатела DART, CD3-связывающие последовательности которого происходят из антигена FN-18. Антитело FN-18 проявляет специфичность в отношении только CD3 яванского макака (Nooij, F.J. et al. (1986) "Differentiation Antigens On Rhesus Monkey Lymphocytes. I. Identification Of T Cells Bearing CD3 And CD8, And Of A Subset Of CD8-Bearing Cells", *Eur. J. Immunol.* 16(8): 975-979; Meng, G. et al. (1998) "The Effect Of Anti-CD3-Immunotoxin On T Lymphocyte Function in vitro", *Transpl. Immunol.* 6(1): 53-59). Определяли результирующей процент цитотоксичности в зависимости от концентрации диател. Результаты (фиг. 14А и 14В) показывают, что диатело DART™ CD19-h-mAb2 способно к опосредованию цитолиза в присутствии Т-клеток-эффекторов или человека, или яванского макака. В отличие от этого, диатело FN-18 было способно к опосредованию цитолиза только в присутствии Т-клеток яванского макака.

Пример 15. Диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™) нуждаются во вхождение в контакт с клетками-мишенями.

Для демонстрации того, что наблюдаемое перенаправленное уничтожение, опосредуемое CD3-специфическим диателом DART™ по настоящему изобретению, было специфическим, определяли степень уничтожения в присутствии и в отсутствие клеток-мишеней.

PBMC человека инкубировали в присутствии описанного выше диатела DART™ ERBITUX™-h-mAb2, (ERBITUX™-Т-клеточный рецептор)-биспецифического диатела DART™ (способного к связыванию с EGFR (рецептором эпидермального фактора роста) и Т-клеточным рецептором) или диатела DART™ ERBITUX™-CD3 FN18 (способного к связыванию с EGFR и с CD3 яванского макака). Инкубации проводили в присутствии или в отсутствие клеток рака почки A498-мишеней (Giard, D.J. et al. (1973) "In vitro Cultivation Of Human Tumors: Establishment Of Cell Lines Derived From A Series Of Solid Tumors", *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1417-1423; Fogh, J. (1978) "Cultivation, Characterization, And Identification Of Human Tumor Cells With Emphasis On Kidney, Testis And Bladder Tumors", *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 49:5-9).

Гликопротеин CD69 является ранним антигеном активации Т- и В-лимфоцитов, представленным на клетках большинства гемопоэтических линий, включая нейтрофилы, после стимуляции (Atzenia, F. et al. (2002) "Induction Of CD69 Activation Molecule On Human Neutrophils by GM-CSF, IFN- γ , and IFN- α ", *Cellular Immunol.* 220(1): 20-29). По этой причине в качестве способа оценки активации иммунной системы определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) CD69 (в зависимости от концентрации диател) (смотрите, например, Ampel, N.M. et al. (2002) "In Vitro Whole-Blood Analysis of Cellular Immunity in Patients with Active Coccidioidomycosis by Using the Antigen Preparation T27K", *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 9 (5): 1039-1043).

Результаты (фиг. 15А и 15В) показывают, что активация иммунной системы (определяемая по MFI CD69) увеличивалась, только когда CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки инкубировали с диателом DART™ ERBITUX™-h-mAb2 по настоящему изобретению или (ERBITUX™-Т-клеточный рецептор)-биспецифическим диателом DART™ (способным к связыванию с EGFR и с Т-клеточным рецептором). Диатело DART™

ERBITUX™-CD3 FN18 (способное к связыванию с EGFR и с CD3 яванского макака) не вызывало увеличение MFI CD69.

Пример 16. Перенаправленное уничтожение с помощью гуманизированных, обладающих реактивностью с CD3 яванского макака/человека диател DART™.

Для дальнейшей демонстрации способности диател DART™ по настоящему изобретению к опосредованному перенаправленного уничтожения использовали клетки рака почки A498-мишени или клетки плоскоклеточного рака A431 (Lee, C.M. et al. (2010) "The Distribution Of The Therapeutic Monoclonal Antibodies Cetuximab And Trastuzumab Within Solid Tumors" BMC Cancer 10: 255; pages 1-11; Bryant, J.A. et al. (2004) "EGF Activates Intracellular And Intercellular Calcium Signaling By Distinct Pathways In Tumor Cells", Cancer Biol. Ther. 3(12): 1243-1249) и определяли степень перенаправленного уничтожения, опосредуемого различными диателами DART™, в присутствии клеток PMBC-эффекторов (E:T=30:1).

Клетки инкубировали в присутствии или диатела DART™ ERBITUX™-h-mAb2, диатела DART™ ERBITUX™-m-mAb2 или диатела DART™ 4420-h-mAb2 (в качестве отрицательно контроля) или контрольного второго антитела. Связывание с клетками-мишенями определяли с помощью измерения MFI. Перенаправленное уничтожение определяли посредством измерения % цитотоксичности.

Результаты этого исследования представлены на фиг. 16A-16D. Было установлено, что диатела, обладающие специфичностью в отношении CD3 и EGFR, способны к связыванию с клетками A498 или A431 (фиг. 16A и 16C соответственно) и к опосредованному перенаправленного уничтожения этих клеток (фиг. 16B и 16D соответственно).

Все публикации и патенты, упомянутые в этом описании, включены сюда посредством ссылки в той же степени, как если бы было специально и отдельно указано, что каждая отдельная публикация или заявка на патент включена посредством ссылки в ее полном объеме. Хотя настоящее изобретение было описано применительно к конкретным вариантам его осуществления, будет понятно, что возможны дальнейшие модификации, и что эта заявка, как предполагается, охватывает любые вариации, применения или адаптации настоящего изобретения, следующие, в общем, принципам настоящего изобретения и включающие такие отклонения от описания настоящего изобретения, которые подпадают под известную или обычную практику в области техники, к которой относится настоящее изобретение и которые могут быть применимы к существенным признакам, изложенным выше.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. CD3-связывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий фрагмент антитела, причем указанный антигенсвязывающий фрагмент содержит CD3-специфический VL-домен антитела и CD3-специфический VH-домен антитела, причем указанный CD3-специфический VL-домен и указанный CD3-специфический VH-домен образуют антигенсвязывающий домен, способный к иммуноспецифическому связыванию как с эпитопом CD3 человека, так и с эпитопом CD3 млекопитающего, не являющегося человеком, причем:

(I) указанный CD3-специфический VL-домен выбран из группы, состоящей из
 VL-4 h-mab2 (SEQ ID NO: 22),
 VL-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 26),
 VL-7 h-mab2 (SEQ ID NO: 28),
 VL-8 h-mab2 (SEQ ID NO: 30),
 VL-9 h-mab2 (SEQ ID NO: 32) и
 VL-10 h-mab2 (SEQ ID NO: 34); и

(II) указанный CD3-специфический VH-домен выбран из группы, состоящей из
 VH-1 h-mab2 (SEQ ID NO: 36),
 VH-2 h-mab2 (SEQ ID NO: 38),
 VH-3 h-mab2 (SEQ ID NO: 40),
 VH-4 h-mab2 (SEQ ID NO: 42),
 VH-5 h-mab2 (SEQ ID NO: 44),
 VH-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 46),
 VH-7 h-mab2 (SEQ ID NO: 48) и
 VH-8 h-mab2 (SEQ ID NO: 50).

2. CD3-связывающая молекула по п.1, в которой указанным CD3-специфическим VL-доменом является VL-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 26).

3. CD3-связывающая молекула по п.1 или 2, в которой указанным CD3-специфическим VH-доменом является VH-8 h-mab2 (SEQ ID NO: 50) или VH-4 h-mab2 (SEQ ID NO: 42).

4. CD3-связывающая молекула по любому из пп.1-3, которая является антителом.

5. CD3-связывающая молекула по п.4, причем указанное антитело не содержит Fc-области.

6. CD3-связывающая молекула по п.4, причем указанное антитело содержит Fc-область, которая:

(i) лишена эффекторной функции; или

(ii) обладает пониженной эффекторной функцией; или

(iii) у него ограничена способность Fc-области антитела связываться с Fc-рецептором, причем указанное отсутствие эффекторной функции, указанная пониженная эффекторная функция и указанная ограниченная связывающая способность сравнивается с функцией Fc-рецептора дикого типа.

7. CD3-связывающая молекула, содержащая CD3-специфический VL-домен антитела и CD3-специфический VH-домен антитела, причем указанная молекула представляет собой CD3-связывающее диатело, которое содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, указанные цепи ковалентно связаны друг с другом, причем:

(I) указанная первая полипептидная цепь содержит аминоконеч (N-) конец и карбоксиконеч (C-) конец и расположена от N-конца к C-концу:

(i) домен (A), содержащий указанный CD3-специфический VL-домен, причем указанный CD3-специфический VL-домен выбран из группы, состоящей из

VL-4 h-mab2 (SEQ ID NO: 22),
VL-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 26),
VL-7 h-mab2 (SEQ ID NO: 28),
VL-8 h-mab2 (SEQ ID NO: 30),
VL-9 h-mab2 (SEQ ID NO: 32) и
VL-10 h-mab2 (SEQ ID NO: 34);

(ii) домен (B), содержащий связывающую область вариабельного домена тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2); и

(iii) домен (C),

причем указанные домены (A) и (B) не связываются друг с другом с образованием эпитопсвязывающего сайта; и

(II) указанная вторая полипептидная цепь содержит аминоконеч (N-) конец и карбоксиконеч (C-) конец и находится от N-конца к C-концу:

(i) домен (D), содержащий связывающую область вариабельного домена легкой цепи указанного второго иммуноглобулина (VL2);

(ii) домен (E), содержащий указанный CD3-специфический VH-домен, причем указанный CD3-специфический VH-домен выбран из группы, состоящей из

VH-1 h-mab2 (SEQ ID NO: 36),
VH-2 h-mab2 (SEQ ID NO: 38),
VH-3 h-mab2 (SEQ ID NO: 40),
VH-4 h-mab2 (SEQ ID NO: 42),
VH-5 h-mab2 (SEQ ID NO: 44),
VH-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 46),
VH-7 h-mab2 (SEQ ID NO: 48) и
VH-8 h-mab2 (SEQ ID NO: 50); и

(iii) домен (F);

причем указанные домены (D) и (E) не связаны друг с другом с образованием эпитопсвязывающего сайта,

причем:

(1) указанные домены (A) и (E) связаны с образованием указанного антигенсвязывающего домена, который способен к иммуноспецифическому связыванию как с CD3 человека, так и с CD3 млекопитающего, являющегося человеком;

(2) указанные домены (B) и (D) связаны с образованием сайта связывания, который иммуноспецифически связывается со вторым эпитопом, указанный второй эпитоп отличается от эпитопа CD3, с которым связывается антигенсвязывающий домен, образованный вследствие указанного связывания указанных доменов (A) и (E); и

(3) указанные домены (C) и (F) ковалентно связаны вместе.

8. CD3-связывающая молекула по п.7, в которой указанный второй эпитоп не является эпитопом CD3.

9. CD3-связывающая молекула по п.7, в которой указанным вторым эпитопом является эпитоп CD3, который отличается от эпитопа CD3, с которым связывается антигенсвязывающий домен, образованный вследствие указанного связывания указанных доменов (A) и (E).

10. CD3-связывающая молекула по любому из пп.1-9, которая гуманизирована.

11. CD3-связывающая молекула по любому из пп.1-3 или 7-10, которая способна к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и флуоресцеином.

12. CD3-связывающая молекула по любому из пп.7-10, которая способна к иммуноспецифическому связыванию и с (i) CD3, и с (ii) (a) опухолеспецифическим антигеном или (ii) (b) антигеном клеточной поверхности, рецептором или лигандом рецептора клеточной поверхности.

13. CD3-связывающая молекула по п.12, которая способна к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и с опухолеспецифическим антигеном, экспрессированным на опухолевой клетке, причем указанной опухолевой клеткой является клетка злокачественной опухоли, выбранной из группы, состоящей из

рака молочной железы, рака предстательной железы, рака желудка, рака легкого, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичника, рака ротовой полости, рака глотки, рака пищевода, рака гортани, рака кости, рака кожи, меланомы, рака матки, рака яичек, рака мочевого пузыря, рака почки, рака головного мозга, глиобластомы, рака щитовидной железы, лимфомы, миеломы и лейкоза.

14. CD3-связывающая молекула по п.12, которая способна к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и с антигеном, рецептором или лигандом рецептора клеточной поверхности, причем указанным антигеном, рецептором или лигандом рецептора клеточной поверхности является HER2/neu, B7-H3, CD20, PSMA, IGF-1R или Ep-CAM.

15. CD3-связывающая молекула по п.12, которая способна к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и с антигеном, рецептором или лигандом рецептора клеточной поверхности, причем указанным антигеном, рецептором или лигандом рецептора клеточной поверхности является молекула, которая вовлечена в указанное связывание Т-клетки с В-клеткой,

указанная молекула, которая вовлечена в указанное связывание Т-клетки с В-клеткой, выбрана из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD32B, CD38, CD40, CD79a, CD79b, CD80, CD86, LFA-I, LFA-3 и CFA-I.

16. CD3-связывающая молекула по любому из пп.7-10 и 12-14, причем указанный второй эпитоп-связывающий сайт способен связываться с B7-H3.

17. CD3-связывающая молекула по любому из пп.7-16, в которой CD3-специфический VL-домен представляет собой h-mab2 VL-6 (SEQ ID NO: 26).

18. CD3-связывающая молекула по любому из пп.7-17, в которой CD3-специфический VH-домен представляет собой h-mab2 VH-8 (SEQ ID NO: 50) или h-mab2 VH-4 (SEQ ID NO: 42).

19. CD3-связывающая молекула по п.18, в которой:

(A) CD3-специфический VL-домен представляет собой h-mab2 VL-6 (SEQ ID NO: 26) и

(B) CD3-специфический VH-домен представляет собой h-mab2 VH-4 (SEQ ID NO: 42).

20. CD3-связывающая молекула по любому из пп.7-19, в которой CD3-связывающее диатело содержит Fc-домен или его часть.

21. CD3-связывающая молекула по любому из пп.7-20, в которой:

(A) указанный первый полипептид содержит последовательность E-спирали и указанный второй полипептид содержит последовательность K-спирали или

(B) указанный первый полипептид содержит последовательность K-спирали и указанный второй полипептид содержит последовательность E-спирали.

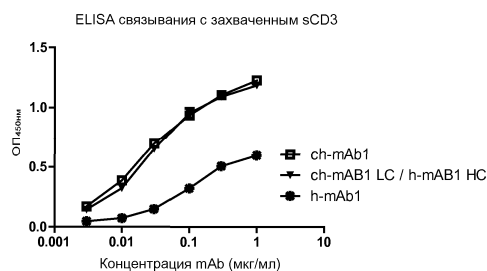
22. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественного новообразования, аутоиммунного или воспалительного заболевания, которая содержит CD3-связывающую молекулу по любому из пп.1-21 и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

23. Применение CD3-связывающей молекулы по любому из пп.1-21 для получения лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, аутоиммунного или воспалительного заболевания.

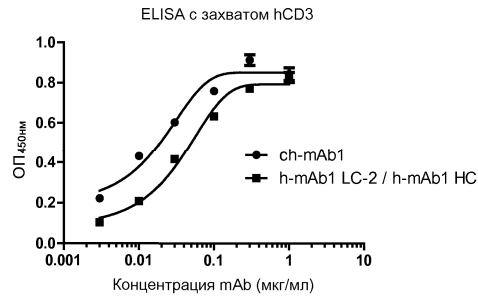
24. Применение фармацевтической композиции по п.22 для получения лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, аутоиммунного или воспалительного заболевания.

25. Применение по п.23 или 24, причем аутоиммунное или воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из инсулинозависимого диабета типа I, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, рассеянного склероза, воспалительного заболевания кишечника, миастении гравис, целиакии, синдрома Шегрена, болезни Грейвса, болезни Крона, аутоиммунного гепатита, псориаза, псориатического артрита, астмы, аллергического ринита, эффектов вследствие трансплантации органа или болезни трансплантат против хозяина (GVHD).

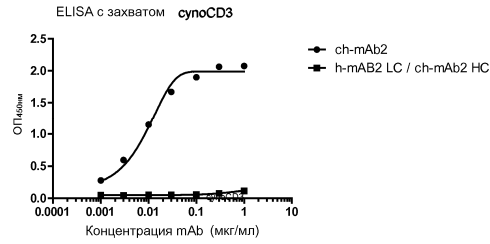
26. Применение по п.25, причем указанное аутоиммунное или воспалительное заболевание представляет собой инсулинозависимый диабет типа I.



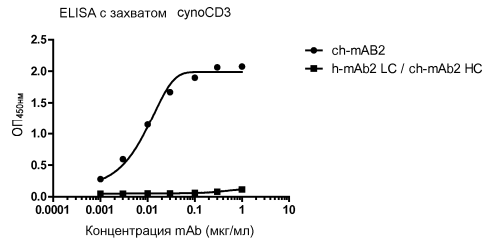
Фиг. 1А



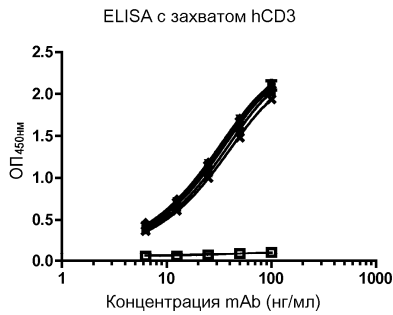
Фиг. 1В



Фиг. 2А

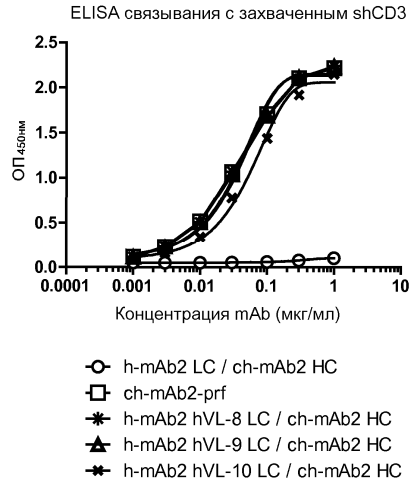


Фиг. 2В

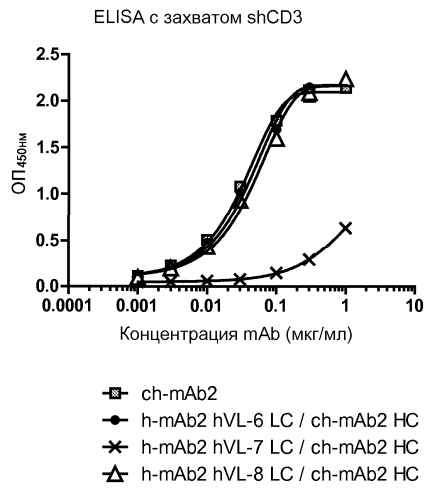


- ch-mAb2
- mAb2-41G LC / ch-mAb HC
- ▲ mAb2-42Q LC / ch-mAb HC
- ▼ mAb2-43A LC / ch-mAb HC
- ◆ mAb2-44P LC / ch-mAb HC
- ✱ mAb2-45R LC / ch-mAb HC
- ▣ mAb2-46T LC / ch-mAb HC

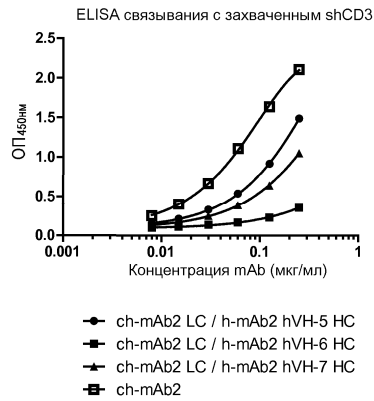
Фиг. 3



Фиг. 4

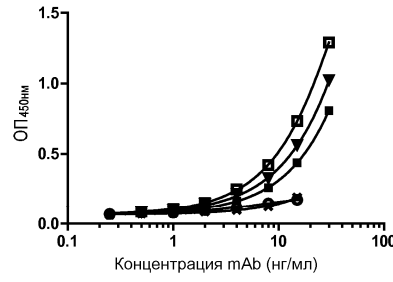


Фиг. 5



Фиг. 6

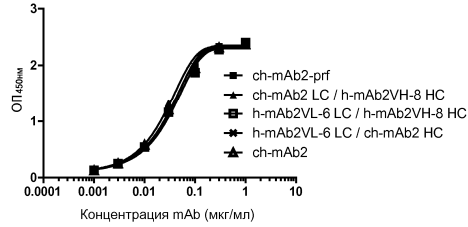
ELISA связывания с захваченным shCD3



- ch-mAb2
- ▼ h-mAb2VH-8 HC / ch-mAb2 LC
- h-mAb2VH-7 HC / ch-mAb2 LC
- ★ h-mAb2VH-4 HC / ch-mAb2 LC
- h-mAb2 HC / ch-mAb2 LC

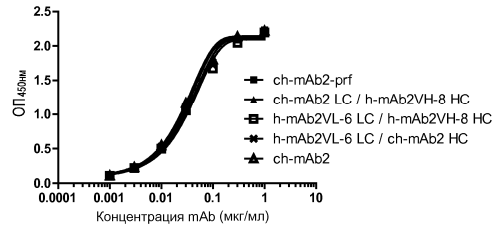
Фиг. 7

ELISA с захватом shCD3



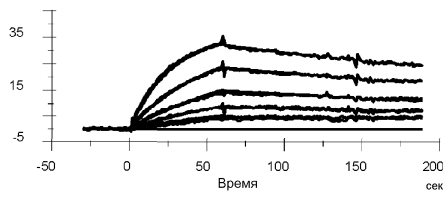
Фиг. 8А

ELISA с захватом scynoCD3



Фиг. 8В

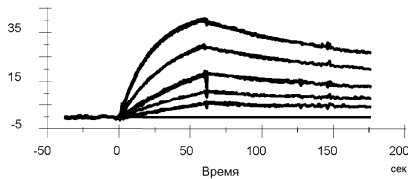
Резонансные единицы



ch-mAb2 / shCD3
 $K_a = 1.7 \times 10^5$ $K_d = 2.5 \times 10^{-3}$ $K_D = 14.7 \text{ нМ}$

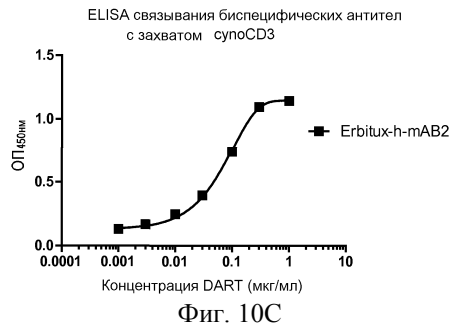
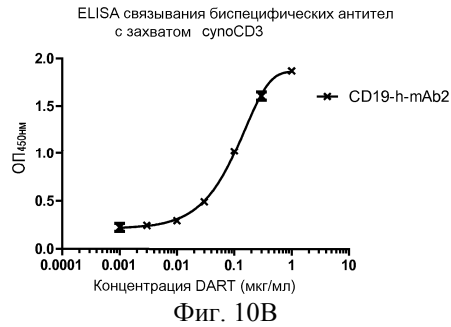
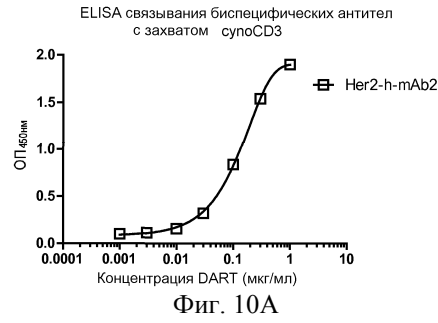
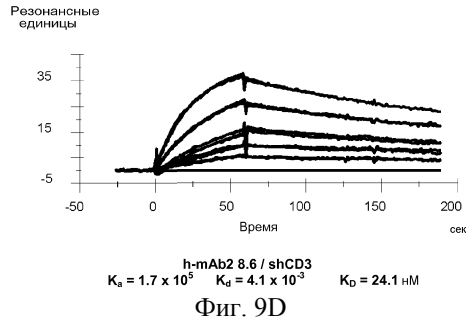
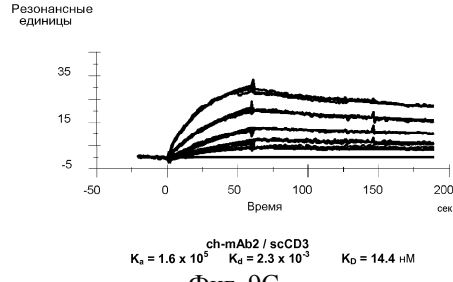
Фиг. 9А

Резонансные единицы

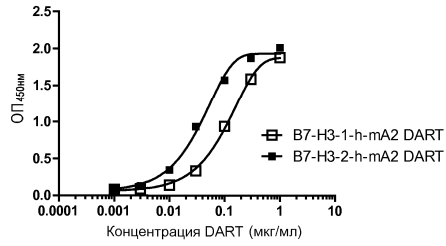


h-mAb2 8.6 / shCD3
 $K_a = 1.9 \times 10^5$ $K_d = 3.8 \times 10^{-3}$ $K_D = 20.0 \text{ нМ}$

Фиг. 9В

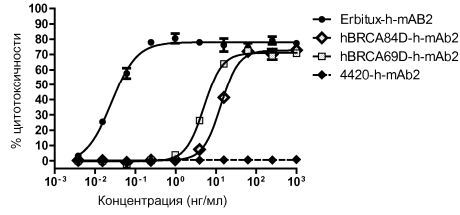


ELISA связывания биспецифических антител
с захватом sCD3-shB7H3



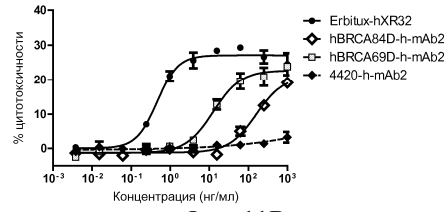
Фиг. 10D

A498 (20K) + PBMC (LDH)
E:T=30:1 D#38123



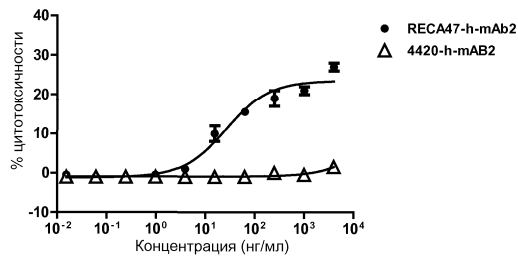
Фиг. 11A

RECA905021E (20K) + PBMC (LDH)
E:T=30:1



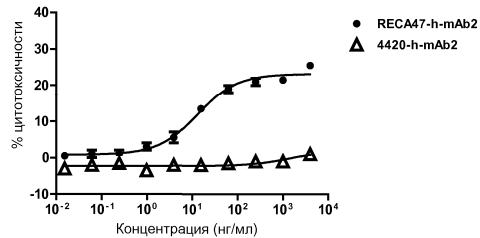
Фиг. 11B

Colo205 + Покоящиеся PBMC (LDH)
E:T=30:1

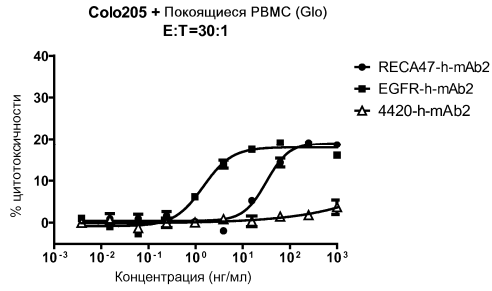


Фиг. 12A

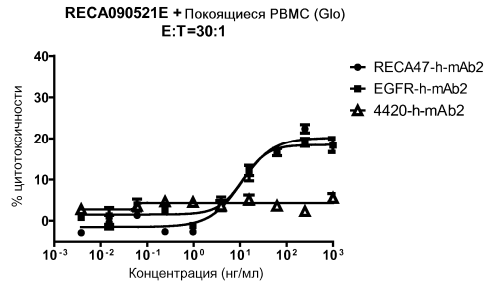
RECA090521E + Покоящиеся PBMC (LDH)
E:T=30:1



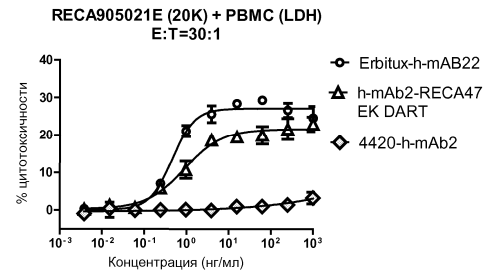
Фиг. 12B



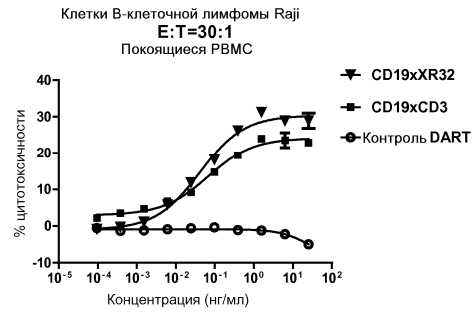
Фиг. 12С



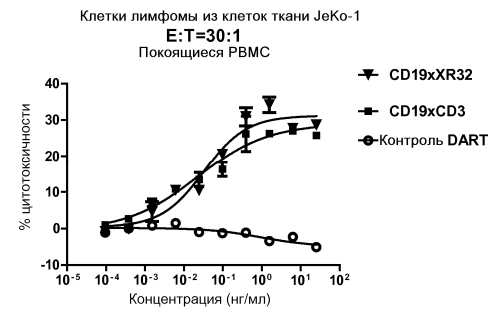
Фиг. 12D



Фиг. 12E



Фиг. 13А



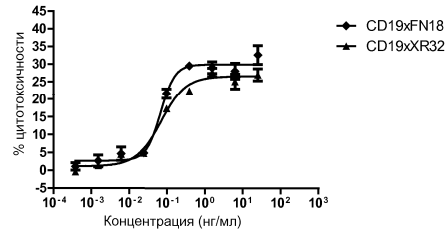
Фиг. 13В

Клетки рака толстой кишки HT-29-мишени
РВМС человека-эфффекторы



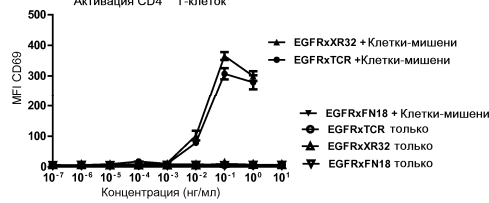
Фиг. 14А

Клетки рака толстой кишки HT-29-мишени
Линия Т-клеток яванского макака-эфффекторов



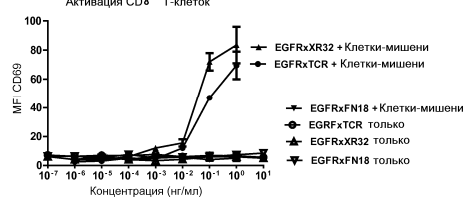
Фиг. 14В

Активация CD4⁺ Т-клеток



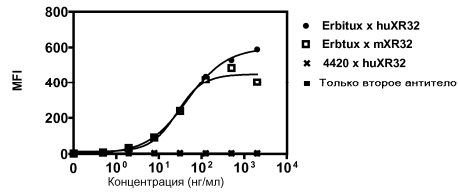
Фиг. 15А

Активация CD8⁺ Т-клеток



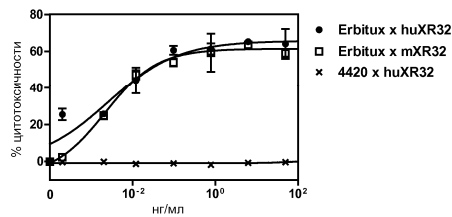
Фиг. 15В

Связывание с клетками A498

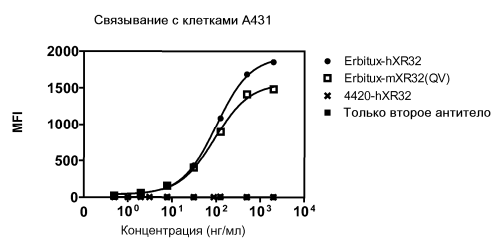


Фиг. 16А

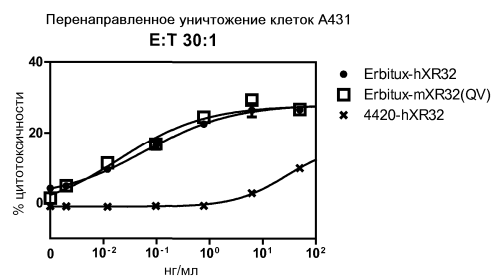
Перенаправленное уничтожение клеток A498
Е:Т 30:1



Фиг. 16В



Фиг. 16С



Фиг. 16D

