

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036236**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.10.16**

**(21)** Номер заявки  
**201690447**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2014.08.20**

**(51)** Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)

---

**(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ МОНОВАЛЕНТНЫЕ ДИАТЕЛА, КОТОРЫЕ СПОСОБНЫ СВЯЗЫВАТЬСЯ С gpA33 И CD3, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** 61/869,528; 61/907,691; 13198859  
**(32)** 2013.08.23; 2013.11.22; 2013.12.20  
**(33)** US; US; EP  
**(43)** 2016.08.31  
**(86)** PCT/US2014/051793  
**(87)** WO 2015/026894 2015.02.26

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

**(56)** WO-A2-2012162067  
US-A1-20070004909  
US-A1-20040082039  
US-A1-20030229208  
US-A1-20120184716  
US-A1-20020193571  
US-A1-20100174053  
US-A1-20100196372  
US-A1-20120289418

**(72)** Изобретатель:  
**Мур Пол А., Ли Джонатан, Чэнь Франсин Чжифэнь, Джонсон Лесли С., Шах Калпана, Бонвини Эцио (US)**

**(74)** Представитель:  
**Карпенко О.Ю., Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Дементьев В.Н., Глухарёва А.О., Клюкин В.А., Строкова О.В., Христофоров А.А. (RU)**

---

**(57)** Изобретение относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат две полипептидные цепи и которые характеризуются наличием по меньшей мере одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа gpA33 (т.е. "gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело"). Изобретение также относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат домен Fc иммуноглобулина ("биспецифические моновалентные Fc-диатела") и состоят из трех полипептидных цепей и которые характеризуются наличием по меньшей мере одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа gpA33, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3 (т.е. "gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное Fc-диатело"). Биспецифические моновалентные диатела и биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно изобретению способны одновременно связываться с gpA33 и CD3. Изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные диатела или такие биспецифические моновалентные Fc-диатела. Изобретение дополнительно относится к способам применения таких диател в лечении злокачественной опухоли и других заболеваний и состояний.

---

**036236 B1**

**036236 B1**

### Ссылки на родственные заявки

Согласно заявке на данное изобретение испрашивается приоритет в соответствии с заявками на выдачу патентов США № 61/869528 (поданной 23 августа 2013 г.; в стадии рассмотрения) и 61/907691 (поданной 22 ноября 2013 г.; в стадии рассмотрения) и заявкой на выдачу европейского патента № 13198859 (поданной 20 декабря 2013 г.), каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

### Ссылка на перечень последовательностей

Настоящее изобретение включает в себя один или несколько перечней последовательностей в соответствии с 37 C.F.R. 1.821 et seq., которые раскрыты как на бумажном, так и на машиночитаемом носителе и чьи бумажные и машиночитаемые раскрытия полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

### Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат две полипептидные цепи и которые характеризуются наличием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа gpA33, и одного сайта связывания, специфического для эпитопа CD3 (т.е. "gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело"). Настоящее изобретение также относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат домен Fc иммуноглобулина ("биспецифические моновалентные Fc-диатела") и состоит из трех полипептидных цепей и которые характеризуются наличием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа gpA33, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3 (т.е. "gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное Fc-диатело"). Биспецифические моновалентные диатела и биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно настоящему изобретению способны одновременно связываться с gpA33 и CD3. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные диатела или такие биспецифические моновалентные Fc-диатела. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам применения таких диател в лечении злокачественной опухоли и других заболеваний и состояний.

### Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

#### I. gpA33.

Колоректальный рак принадлежит к числу самых распространенных злокачественных опухолей в западном мире и является ведущей причиной смертельных исходов, вызванных злокачественными опухолями (Silverberg, E. et al. (1989), "Cancer Statistics, 1989", CA Cancer J Clin. 39(1):3-20). Одной потенциально применимой мишенью для рака толстой кишки является трансмембранный гликопротеин A33 с молекулярной массой 43 кДа (gpA33) ((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. (U.S.A.) 94(2):469-474; Ritter, G. et al. (1997), "Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33 Antigen, A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium", Biochem. Biophys. Res. Commun. 236(3):682-686). gpA33 был впервые открыт путем получения моноклональных мышинных антител против происходящей из карциномы поджелудочной железы человека клеточной линии ASPC1. Обнаружили, что одно антитело (MAb A33) реагировало с белком клеточной поверхности с молекулярной массой 43 кДа, который в связи с этим обозначили как "gpA33" (Wong, N.A. et al. (2006), "EpCAM and gpA33 Are Markers Of Barrett's Metaplasia", J. Clin. Pathol. 59(3):260-263).

gpA33 представляет собой трансмембранный белок семейства адгезивных молекул, обеспечивающих межклеточный контакт; Abud, H.E. et al. (2000), "The Murine A33 Antigen Is Expressed At Two Distinct Sites During Development, The ICM Of The Blastocyst and The Intestinal Epithelium", Mech. Dev. 98(1-2):111-114; Barendsward, E.C. et al. (1998), "Rapid and Specific Targeting Of Monoclonal Antibody A33 To A Colon Cancer Xenograft In Nude Mice", Int. J. Oncol. 12(1):45-53; Panjideh, H. et al. (2008), "Biodistribution and Efficacy Of [<sup>131</sup>I]A33scFv::CDy, A Recombinant Antibody-Enzyme Protein For Colon Cancer", Int. J. Oncol. 32(4):925-930). Несмотря на то, что функциональная значимость антигена A33 еще не выяснена, было показано, что он опосредует восстановление слизистой толстой кишки в животной модели колита и равномерно экспрессируется в >95% всех колоректальных карцином. Экспрессия A33 является равномерной в течение всех стадий заболевания, а также при любой степени гистологической дифференциации, и антиген не секретируется или не выделяется в кровоток обнаруживаемым образом (Infante, J.R. et al. (2013), "Safety, Pharmacokinetics

And Pharmacodynamics Of The Anti-A33 Fully-Human Monoclonal Antibody, KRN330, In Patients With Advanced Colorectal Cancer", Eur. J. Cancer. 49(6): 1169-1175; Panjideh, H. et al. (2008), "Biodistribution And Efficacy Of [<sup>131</sup>I]A33scFv::CDy, A Recombinant Antibody-Enzyme Protein For Colon Cancer", Int. J. Oncol. 32(4):925-930). Напротив, было идентифицировано только несколько случаев экспрессии не относящегося к желудочно-кишечному тракту антигена A33 (Johnstone, C.N. et al. (2000), "Characterization Of Mouse A33 Antigen, A Definitive Marker For Basolateral Surfaces Of Intestinal Epithelial Cells", Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 279(3):G500-G510).

В связи с тем, что экспрессия антигена A33 в высокой степени ограничена, исследователи изучали возможность лечения опосредованных A33 злокачественных опухолей с помощью антител (Infante, J.R. et al. (2013), "Safety, Pharmacokinetics And Pharmacodynamics Of The Anti-A33 Fully-Human Monoclonal Antibody, KRN330, In Patients With Advanced Colorectal Cancer", *Eur. J. Cancer.* 49(6):1169-1175; Ackerman, M.E. et al. (2008), "A33 Antigen Displays Persistent Surface Expression", *Cancer Immunol. Immunother.* 57(7):1017-1027; Barendswaard, E.C. et al. (2001), "Relative Therapeutic Efficacy Of <sup>125</sup>I-And <sup>131</sup>I-Labeled Monoclonal Antibody A33 In A Human Colon Cancer Xenograft", *J. Nucl. Med.* 42(8):1251-1256; Carrasquillo, J.A. et al. (2011), "<sup>124</sup>I-huA33 Antibody PET Of Colorectal Cancer", *J. Nucl. Med.* 52(8):1173-1180; Chong, G et al. (2005), "Phase I Trial Of 131I-HuA33 In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma", *Clin. Cancer Res.* 11(13):4818-4826; Deckert, P.M. et al. (2000), "Pharmacokinetics And Microdistribution Of Polyethylene Glycol-Modified Humanized A33 Antibody Targeting Colon Cancer Xenografts", *Int. J. Cancer.* 87(3):382-390; Johnston, A.P. et al. (2012), "Targeting Cancer Cells: Controlling The Binding And Internalization Of Antibody-Functionalized Capsules" *ACS Nano.* 6(8):6667-6674; Koppe, M.J. et al. (2005), "Radioimmunotherapy And Colorectal Cancer", *Br. J. Surg. Mar.* 92(3):264-276; Sakamoto, J. et al. (2006), "A Phase I Radioimmunolocalization Trial Of Humanized Monoclonal Antibody HuA33 In Patients With Gastric Carcinoma" *Cancer Sci* 97(11): 1248-1254; Scott, A.M. et al. (2005), "A Phase I Trial Of Humanized Monoclonal Antibody A33 In Patients With Colorectal Carcinoma: Biodistribution, Pharmacokinetics, And Quantitative Tumor Uptake", *Clin. Cancer Res.* 11(13):4810-4817; Tschmelitsch, J. et al. (1997), "Enhanced Antitumor Activity Of Combination Radioimmunotherapy (<sup>131</sup>I-Labeled Monoclonal Antibody A33) With Chemotherapy (Fluorouracil)", *Cancer Res.* 57(11):2181-2186). Аналогично фрагменты таких антител также были исследованы в отношении их потенциальной терапевтической роли (Coelho, V. et al. (2007), "Design, Construction, And In Vitro Analysis Of A33scFv::CDy, A Recombinant Fusion Protein For Antibody-Directed Enzyme Produced Therapy In Colon Cancer", *Int. J. Oncol.* 31(4):951-957).

## II. CD3.

CD3 представляет собой T-клеточный корцептор, состоящий из четырех различных цепей (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(4):a005140; pages 1-14; Chetty, R. et al. (1994), "CD3: Structure, Function And The Role Of Immunostaining In Clinical Practice", *J. Pathol.* 173:303-307).

У млекопитающих комплекс CD3 содержит цепь CD3 $\gamma$ , цепь CD3 $\delta$  и две цепи CD3 $\epsilon$ . Указанные цепи связываются с молекулой, известной как T-клеточный рецептор (TCR), для создания сигнала активации в T-лимфоцитах. При отсутствии CD3 не происходит правильная сборка TCR, и они распадаются (Thomas, S. et al. (2010), "Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer", *Immunology* 129(2):170-177). CD3 обнаружен связанным с мембранами всех зрелых T-клеток и практически ни с каким другим типом клеток (см. Janeway, C.A. et al. (2005), в *Immunobiology: The Immune System In Health And Disease*", 6<sup>th</sup> ed. Garland Science Publishing, NY, pp. 214-216; Sun, Z.J. et al. (2001), "Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3 $\epsilon$ : $\gamma$  Heterodimer", *Cell* 105(7):913-923; Kuhns, M.S. et al. (2006), "Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex", *Immunity.* 2006 Feb;24(2):133-139).

## III. Биспецифические диатела.

Способность интактного, немодифицированного антитела (например, IgG) связывать эпитоп антигена зависит от присутствия варибельных доменов на легких и тяжелых цепях иммуноглобулина (т.е. доменов VL и VH соответственно). Конструкция диатела основана на одноцепочечном конструкте Fv (scFv) (см., например, Holliger et al. (1993), "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", *Proc. Natl. Acad. Sci (U.S.A.)* 90:6444-6448; патентную публикацию США № 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) *FEBS Lett.* 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005), "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004), "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", *Protein Eng. Des. Sel.* 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001), "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", *Protein Engineering* 14(2): 1025-1033; Asano et al. (2004), "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region", *Abstract 3P-683, J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000), "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009), "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy" *Cancer Res.* 69(12):4941-4944).

Взаимодействие легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела и, в частности, взаимодействие его доменов VL и VH формирует один из сайтов связывания с эпитопом антитела. Напротив, конструкт scFv содержит домен VL и VH антитела, содержащийся в одной полипептидной цепи, причем домены отделены гибким линкером, длина которого достаточна для обеспечения возможности самосборки двух доменов в функциональный сайт связывания с эпитопом. Если самосборка доменов VL и VH становится не-

возможной вследствие недостаточной длины линкера (меньше чем приблизительно 12 аминокислотных остатков), два конструкта scFv взаимодействуют друг с другом с образованием бивалентной молекулы, в которой VL одной цепи ассоциируются с VH другой (рассмотрено в Marvin et al. (2005), "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies", *Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-658).

Природные антитела способны связываться только с одним видом эпитопов (т.е. являются моноспецифическими), хотя они могут связываться с множественными копиями этого вида (т.е. проявляя бивалентность или мультивалентность). В известном уровне техники сообщалось о способности производить диатела, которые отличаются от таких природных антител тем, что они способны связывать два или больше различных видов эпитопов (т.е. проявляя биспецифичность или мультиспецифичность в дополнение к бивалентности или мультивалентности) (см., например, Holliger et al. (1993), "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) *FEBS Lett.* 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005), "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Mertens, N. et al, "New Recombinant Bi- and Trispecific Antibody Derivatives", In: *NOVEL FRONTIERS IN THE Production Of Compounds For Biomedical Use*, A. VanBroekhoven et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (2001), pages 195-208; Wu, A. et al. (2001), "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", *Protein Engineering* 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004), "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region", Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000), "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009), "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy", *Cancer Res.* 69(12):4941-4944).

Обеспечение не моноспецифическими диателами предоставляет существенное преимущество: способность колигирования и колокализации клеток, которые экспрессируют различные эпитопы. Таким образом, бивалентные диатела характеризуются широким диапазоном применений, включая в себя терапию и иммунодиагностику. Бивалентность обеспечивает возможность большой гибкости в конструировании и разработке диатела в различных применениях, обеспечивая повышенную avidность в отношении мультимерных антигенов, перекрестную сшивку различных антигенов и направленное нацеленное воздействие на конкретные типы клеток на основании присутствия обоих целевых антигенов. В связи с их повышенной валентностью низкие скорости диссоциации и быстрое выведение из циркуляции (для диател небольшого размера, составляющего ~50 кДа или ниже), известные в настоящей области техники молекулы диател, также продемонстрировали конкретное применение в области визуализации опухолей (Fitzgerald et al. (1997), "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*", *Protein Eng.* 10:1221). Особое значение представляет колигирование различных клеток, например перекрестная сшивка цитотоксических Т-клеток с опухолевыми клетками (Staerz et al. (1985), "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells", *Nature* 314:628-631, and Holliger et al. (1996), "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", *Protein Eng.* 9:299-305).

Домены связывания с эпитопом диатела также могут быть направлены на поверхностную детерминанту любой иммунной эффекторной клетки, такой как CD3, CD16, CD32 или CD64, которые экспрессируются на Т-лимфоцитах, клетках - естественных киллерах (NK) или других мононуклеарных клетках. Во многих исследованиях также обнаружили, что связывание диатела с детерминантами эффекторных клеток, например, рецепторами Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) активирует эффекторную клетку (Holliger et al. (1996), "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", *Protein Eng.* 9:299-305; Holliger et al. (1999), "Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3  $\times$  Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7  $\times$  Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins", *Cancer Res.* 59:2909-2916; международные патентные публикации № WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). Как правило, активация эффекторных клеток запускается связыванием антигена, связанного антителом, с эффекторной клеткой посредством взаимодействия Fc-Fc $\gamma$ R; таким образом, в связи с этим молекулы диател согласно настоящему изобретению могут проявлять Ig-подобную функциональность, независимо от того, содержат ли они домен Fc (например, согласно результатам любого анализа эффекторной функции, известного в настоящей области техники или представленного в качестве примера в настоящем документе (например, анализа ADCC)). Путем перекрестной сшивки опухолевых и эффекторных клеток диатело не только приводит эффекторную клетку в пространственную близость относительно опухолевых клеток, но приводит к эффективному лизису опухолевых клеток (см., например, Cao et al. (2003), "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics", *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-197).

Тем не менее, вышеперечисленные преимущества сталкиваются с существенной стоимостью. Образование таких не моноспецифических диател требует успешной сборки двух или больше отдельных и

различных полипептидов (т.е. такое образование требует, чтобы диатела образовывались посредством гетеродимеризации различных видов полипептидных цепей). Этот факт контрастирует с моноспецифическими диателами, которые образуются посредством гомодимеризации идентичных полипептидных цепей. Поскольку необходимо предоставить по меньшей мере два несходных полипептида (т.е. два вида полипептидов) для образования не моноспецифического диатела и поскольку гомодимеризация таких полипептидов приводит к неактивным молекулам (Takemura, S. et al. (2000), "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8):583-588), получение таких полипептидов должно осуществляться таким путем, который предотвратит образование ковалентных связей между полипептидами одного и того же вида (Takemura, S. et al. (2000), "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8):583-588). В связи с этим в настоящей области техники раскрыто нековалентное связывание таких полипептидов (см., например, Olafsen et al. (2004), "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Asano et al. (2004), "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region", Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000), "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005), "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672).

Тем не менее в настоящей области техники установлено, что биспецифические моновалентные диатела, состоящие из нековалентно связанных полипептидов, являются нестабильными и легко диссоциируются до нефункциональных мономеров (см. например, Lu, D. et al. (2005), "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", *J. Biol. Chem.* 280(20): 19665-19672).

Ввиду такой проблемы в настоящей области техники добились успеха в разработке стабильных, ковалентно связанных гетеродимерных не моноспецифических диател (см., например, международные патентные публикации № WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068; Johnson, S. et al. (2010), "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion", *J. Molec. Biol.* 399(3):436-449; Veri, M.C. et al. (2010), "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ<sub>2</sub> Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold", *Arthritis Rheum.* 62(7): 1933-1943; Moore, P.A. et al. (2011), "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", *Blood* 117(17):4542-4551; патентные публикации США № 2012/0294796 и 2013/0149236). Такие подходы предусматривают конструирование одного или нескольких цистеиновых остатков в каждом из используемых видов полипептидов. Например, было показано, что добавление цистеинового остатка к С-концу таких конструкторов обеспечивает образование дисульфидной связи между полипептидными цепями, стабилизируя полученный гетеродимер, не создавая помехи для характеристик связывания бивалентной молекулы.

Были описаны диатела и другие иммуноглобулины, предположительно характеризующиеся специфичностью в отношении любого или обоих из gpA33 и CD3 (см., например, патентные публикации США № 2012/0014957; 2012/0034160; 2012/0087858; 2012/0189541; 2012/0195900; 2012/0201746; 2012/0237442; 2012/0263722; 2012/0258108 и 2012/0276608).

Несмотря на такой успех, получение стабильных, функциональных гетеродимерных, не моноспецифических диател может быть дополнительно усовершенствовано путем тщательного рассмотрения и размещения используемых доменов в полипептидных цепях. Таким образом, настоящее изобретение относится к предоставлению специфических полипептидов, которые детально разработаны для получения, посредством связывания ковалентной связью, гетеродимерных диател и гетеродимерных Fc-диател, которые способны одновременно связывать gpA33 и CD3.

#### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

Настоящее изобретение относится к "gpA33 × CD3 биспецифическим моновалентным диателам". Согласно конкретным вариантам осуществления диатела согласно настоящему изобретению дополнительно содержат домен Fc-области иммуноглобулина (т.е. "домен Fc") ("gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела") или альбуминсвязывающий домен ("ABD") ("gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела с ABD") для увеличения периода полужизни *in vivo*. gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела согласно настоящему изобретению и gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно настоящему изобретению содержат две различные полипептидные цепи, которые ассоциируются друг с другом гетеродимерным образом с образованием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа gpA33, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3. Таким образом, gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела и gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно настоящему изобретению являются моновалентными в том смысле, что они способны связываться только с одной копией эпитопа gpA33

и только с одной копией эпитопа CD3, но являются биспецифическими в том смысле, что одно диатело способно связываться одновременно с эпитопом gpA33 и с эпитопом CD3.

gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела согласно настоящему изобретению состоят из двух полипептидных цепей ("первой" и "второй" полипептидных цепей), которые ковалентно связаны друг с другом, например, с помощью связывания дисульфидным мостиком цистеиновых остатков, расположенных в пределах каждой полипептидной цепи. gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно настоящему изобретению состоят из трех полипептидных цепей ("первой", "второй" и "третьей" полипептидных цепей), причем первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом. Биспецифические моновалентные диатела и биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно настоящему изобретению способны одновременно связываться с gpA33 и CD3. Настоящее изобретение относится к таким gpA33 × CD3 биспецифическим моновалентным диателам и gpA33 × CD3 биспецифическим моновалентным Fc-диателам и к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные диатела или такие биспецифические моновалентные Fc-диатела. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам применения таких диател в лечении злокачественной опухоли и других заболеваний и состояний.

Согласно настоящему изобретению предусмотрено биспецифическое моновалентное диатело, причем указанное биспецифическое моновалентное диатело способно специфически связываться с эпитопом гликопротеина A33 (gpA33) и с эпитопом CD3, причем биспецифическое моновалентное диатело содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, причем указанная первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и при этом:

А) первая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу:

i) домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 5); и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 27); причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO: 1);

ii) домен 2, причем указанный домен 2 представляет собой К-спиральный домен (SEQ ID NO: 4) или Е-спиральный домен (SEQ ID NO: 3), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (SEQ ID NO: 2);

В) вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу:

i) домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 26), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 25), причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO: 1);

ii) домен 2, причем указанный домен 2 представляет собой Е-спиральный домен (SEQ ID NO: 3) или К-спиральный домен (SEQ ID NO: 4), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (SEQ ID NO: 2); и причем указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи не представляют собой оба Е-спиральных домена или оба К-спиральных домена;

и при этом:

(a) указанный домен VL указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VH указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD3; и

(b) указанный домен VH указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VL указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом gpA33.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное диатело, в котором указанная первая полипептидная цепь содержит альбуминсвязывающий домен (SEQ ID NO: 34), причем указанный альбуминсвязывающий домен расположен на С-конце по отношению к указанному домену 2 и отделен от указанного домена 2 линкером 3 (SEQ ID NO: 32).

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное Fc-диатело, причем указанное биспецифическое моновалентное Fc-диатело способно специфически связываться с эпитопом гликопротеина A33 (gpA33) и с эпитопом CD3 и содержит домен Fc IgG, причем биспецифическое моновалентное Fc-диатело содержит первую полипептидную цепь, вторую полипептидную цепь и третью полипептидную цепь, причем указанная первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом и указанная первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и при этом:

А) первая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу:

i) домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 26), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 25), причем указан-

ные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO: 1);

ii) домен 2, причем указанный домен 2 представляет собой E-спиральный домен (SEQ ID NO: 3) или K-спиральный домен (SEQ ID NO: 4), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (SEQ ID NO: 2); и

iii) домен 3, содержащий субдомен (3A), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (SEQ ID NO: 39) и субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, имеющую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG; причем указанные домены 3 и 2 отделены друг от друга спейсерным пептидом, характеризующимся последовательностью GGG (линкер 5);

В) вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:

i) домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 5), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 27); причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO: 1);

ii) домен 2, причем указанный домен 2 представляет собой K-спиральный домен (SEQ ID NO: 4) или E-спиральный домен (SEQ ID NO: 3), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (SEQ ID NO: 2); и причем указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи не представляют собой оба E-спиральных домена или оба K-спиральных домена; и

С) третья полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу домен 3, содержащий:

(1) субдомен (3A), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (SEQ ID NO: 39); и

(2) субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, имеющую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG;

и при этом:

(a) указанные полипептидные части доменов Fc IgG указанной первой и третьей полипептидной цепи образуют указанный домен Fc IgG;

(b) указанный домен VL указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VH указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом gpA33; и

(c) указанный домен VH указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VL указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD3.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное Fc-диатело, причем указанное биспецифическое моновалентное Fc-диатело способно специфически связываться с эпитопом гликопротеина A33 (gpA33) и с эпитопом CD3 и содержит домен Fc IgG, причем биспецифическое моновалентное Fc-диатело содержит первую полипептидную цепь, вторую полипептидную цепь и третью полипептидную цепь, причем указанная первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом и указанная первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и при этом:

А) первая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:

i) домен 3, содержащий субдомен (3A), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (SEQ ID NO: 39), и субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, имеющую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG;

ii) домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 26), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 25), причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO: 1);

причем указанные домены 1 и 3 отделены друг от друга спейсерным пептидом (линкер 4) (SEQ ID NO: 38);

iii) домен 2, причем указанный домен 2 представляет собой E-спиральный домен (SEQ ID NO: 3) или K-спиральный домен (SEQ ID NO: 4), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (SEQ ID NO: 2); и

В) вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:

i) домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 5); и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 27); причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO: 1);

ii) домен 2, причем указанный домен 2 представляет собой K-спиральный домен (SEQ ID NO: 4) или E-спиральный домен (SEQ ID NO: 3), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (SEQ ID NO: 2); и причем указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи не представляют собой оба E-спиральных домена или оба K-спиральных домена; и

С) третья полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу домен 3, содержащий:  
(1) субдомен (3А), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (SEQ ID NO: 39); и  
(2) субдомен (3В), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, имеющую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG;

и при этом:

(а) указанные полипептидные части доменов Fc IgG указанных первой и третьей полипептидных цепей образуют указанный домен Fc IgG;

(б) указанный домен VL указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VH указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом gpA33; и

(с) указанный домен VH указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VL указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD3.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное Fc-диатело, в котором указанный субдомен (3В) указанной первой полипептидной цепи содержит последовательность, отличную от последовательности указанного субдомена (3В) указанной третьей полипептидной цепи.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное Fc-диатело, в котором указанный субдомен (3В) указанной первой полипептидной цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 и указанный субдомен (3В) указанной третьей полипептидной цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное Fc-диатело, в котором указанный субдомен (3В) указанной первой полипептидной цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 и указанный субдомен (3В) указанной третьей полипептидной цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное Fc-диатело, в котором указанный домен 3 указанной первой полипептидной цепи и/или указанный домен 3 указанной третьей полипептидной цепи содержит вариантную последовательность CH2-CH3 относительно последовательности CH2-CH3 области Fc дикого типа, и которая проявляет сниженное связывание с рецептором Fcγ относительно связывания, проявляемого указанной областью Fc дикого типа.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное диатело или биспецифическое моновалентное Fc-диатело, в котором указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи содержит E-спираль (SEQ ID NO: 3) и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи содержит K-спираль (SEQ ID NO: 4).

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное диатело или биспецифическое моновалентное Fc-диатело, в котором указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи содержит K-спираль (SEQ ID NO: 4) и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи содержит E-спираль (SEQ ID NO: 3).

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное диатело, причем указанное биспецифическое моновалентное диатело способно специфически связываться с эпитопом CD3 и с эпитопом гликопротеина A33 (gpA33), причем указанное биспецифическое моновалентное диатело содержит:

(1) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; или

(2) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;

причем указанная первая и указанная вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом дисульфидной связью.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное Fc-диатело, причем указанное биспецифическое моновалентное Fc-диатело способно специфически связываться с эпитопом CD3 и с эпитопом гликопротеина A33 (gpA33) и содержит домен Fc IgG, причем указанное биспецифическое моновалентное Fc-диатело содержит:

(1) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и третью полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; или

(2) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и третью полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 46;

причем указанная первая и указанная вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом первой дисульфидной связью и указанная первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом второй дисульфидной связью.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрена фармацевтическая композиция для лечения злокачественной опухоли, характеризующейся экспрессией grA33, причем указанная фармацевтическая композиция содержит биспецифическое моновалентное диатело или биспецифическое моновалентное Fc-диатело и физиологически приемлемый носитель.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено применение биспецифического моновалентного диатела или биспецифического моновалентного Fc-диатела или фармацевтической композиции в лечении злокачественной опухоли, характеризующейся экспрессией grA33.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрен полинуклеотид, который кодирует первую или вторую полипептидную цепь биспецифического моновалентного диатела или первую или вторую полипептидную цепь биспецифического моновалентного Fc-диатела.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 проиллюстрированы структуры первой и второй полипептидных цепей двухцепочечного grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела согласно настоящему изобретению.

На фиг. 2A и 2B проиллюстрированы структуры двух версий первой, второй и третьей полипептидных цепей трехцепочечного grA33 × CD3 биспецифического моновалентного Fc-диатела согласно настоящему изобретению (версия 1, фиг. 2A; версия 2, фиг. 2B)

На фиг. 3 продемонстрировано, что диатела согласно настоящему изобретению способны одновременно связываться с CD3 и с grA33.

На фиг. 4 проиллюстрирована способность диател согласно настоящему изобретению лечить злокачественную опухоль. Клетки колоректального рака или клетки рака поджелудочной железы инкубировали в присутствии grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела ("DART-1) и или PBMC человека (E:T = 25:1) или активированных Т-клеток человека (E:T = 10:1) и измеряли цитотоксичность (фиг. 4A (клетки колоректального рака Colon CSC), фиг. 4B (клетки колоректального рака Colo205), и фиг. 4C (клетки рака поджелудочной железы ASPC-1).

На фиг. 5A-5F показано, что активация Т-клеток CD8 происходила в присутствии биспецифического моновалентного диатела к CD3 ("DART-1) только в присутствии злокачественных клеток (фиг. 5A-5C: CD8 Т-клетки + клетки Colo205 (фиг. 5A), Т-клетки CD8 + клетки ASPC-1 (фиг. 5B), Т-клетки CD8 отдельно (фиг. 5C); фиг. 5D-5F: Т-клетки CD4 + клетки Colo205 (фиг. 5D), Т-клетки CD4+ клетки ASPC-1 (фиг. 5E), Т-клетки CD8 отдельно (фиг. 5F).

На фиг. 6A-6D показано, что grA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела (DART-1 и DART-2) опосредовали эквивалентную цитотоксичность в отношении клеток колоректальной аденокарциномы SW948 (фиг. 6A), клеток Colo205 (фиг. 6B) и клеток Colo205-Luc (фиг. 6C) и что ни одно диатело не опосредовало цитотоксичность grA33-отрицательной клеточной линии злокачественной опухоли, HCT116 (фиг. 6D).

На фиг. 7A-7D показана способность grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-2), grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего альбуминсвязывающий домен (DART-2 с ABD "w/ABD") и grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc иммуноглобулина IgG (DART-2 с Fc "w/Fc") стимулировать цитотоксичность злокачественных клеток в присутствии PBMC человека или яванского макака.

На фиг. 8 продемонстрирована *in vivo* способность grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-1) уменьшать объем опухоли в мышинной модели рака толстой кишки Colo205.

На фиг. 9A-9D показаны данные сцинтиграфии опухолей у мышей NOD (страдающих диабетом без ожирения) scid (с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью) гамма (NSG), которым имплантировали клетки Colo205 через два дня после получения инертного носителя (фиг. 9A) или grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-1) (фиг. 9B) и через 12 дней после получения инертного носителя (фиг. 9C) или DART-1 (фиг. 9D).

На фиг. 10 продемонстрирована *in vivo* способность grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-1) уменьшать объем опухоли в мышинной модели рака поджелудочной железы ASPC-1.

На фиг. 11 показана способность grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc иммуноглобулина IgG (версия 1DART-2 w/Fc) опосредовать резкое снижение объема опухоли в *in vivo* модели рака толстой кишки.

На фиг. 12 показана способность grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc иммуноглобулина IgG (версия 1DART-2 w/Fc) опосредовать снижение объема опухоли в *in vivo* модели рака толстой кишки даже в крайне низких дозах.

На фиг. 13 показана фармакокинетика grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-2) и grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc иммуног-

лобулина IgG (версия 1 DART-2 w/Fc) у яванских макак.

На фиг. 14A, 14B показан анализ SPR связывания версии 1 DART-2 w/Fc с иммобилизированным CD3 человека и яванского макака. Черные пунктирные линии представляют глобальную аппроксимацию 1:1 модели Ленгмюра кривых связывания, полученных при концентрациях DART-2 w/Fc, составляющих 0, 6,25, 12,5, 25, 50 или 100 нМ. Данные являются репрезентативными для трех независимых экспериментов.

На фиг. 15A, 15B показан анализ SPR связывания версии 1 DART-2 w/Fc с захваченным gpA33 человека и яванского макака. Черные пунктирные линии представляют глобальную аппроксимацию 1:1 модели Ленгмюра кривых связывания, полученных при концентрации версии 1 DART-2 w/Fc, составляющей 0, 6,25, 12,5, 25, 50 или 100 нМ. Данные являются репрезентативными для трех независимых экспериментов.

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

Настоящее изобретение относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат две полипептидные цепи и которые характеризуются наличием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа gpA33, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3 (т.е. "gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело"). Настоящее изобретение также относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат домен Fc иммуноглобулина ("биспецифические моновалентные Fc-диатела") и состоят из трех полипептидных цепей и которые характеризуются наличием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа gpA33, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3 (т.е. а "gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное Fc-диатело"). Биспецифические моновалентные диатела и биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно настоящему изобретению способны одновременно связываться с gpA33 и CD3. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные диатела или такие биспецифические моновалентные Fc-диатела. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам применения таких диател в лечении злокачественной опухоли и других заболеваний и состояний.

gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела согласно настоящему изобретению состоят из двух полипептидных цепей, которые ассоциируются друг с другом с образованием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа gpA33, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3. Отдельные полипептидные цепи диатела ковалентно связаны друг с другом, например, путем связывания дисульфидной связью цистеиновых остатков, расположенных в пределах каждой полипептидной цепи. Каждая полипептидная цепь содержит антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи, антигенсвязывающий домен переменного домена тяжелой цепи и домен гетеродимеризации. Промежуточный линкерный пептид (линкер 1) отделяет антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи от антигенсвязывающего домена переменного домена тяжелой цепи. Антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи первой полипептидной цепи взаимодействует с антигенсвязывающим доменом переменного домена тяжелой цепи второй полипептидной цепи с образованием первого функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении первого антигена (т.е. или gpA33, или CD3). Аналогично, антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи второй полипептидной цепи взаимодействует с антигенсвязывающим доменом переменного домена тяжелой цепи первой полипептидной цепи с образованием второго функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении второго антигена (т.е. или gpA33, или CD3, в зависимости от идентичности первого антигена). Таким образом, выбор антигенсвязывающего домена переменного домена легкой цепи и антигенсвязывающего домена переменного домена тяжелой цепи первой и второй полипептидных цепей скоординирован так, чтобы две полипептидные цепи совместно содержали антигенсвязывающие домены переменных доменов легкой и тяжелой цепи, способные связываться с gpA33 и CD3.

gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно настоящему изобретению состоят из первой полипептидной цепи, второй полипептидной цепи и третьей полипептидной цепи. Первая и вторая полипептидные цепи ассоциируются друг с другом с образованием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа gpA33, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3. Первая полипептидная цепь и третья полипептидная цепь ассоциируются друг с другом с образованием домена Fc иммуноглобулина. Первая и вторая полипептидные цепи биспецифического моновалентного Fc-диатела ковалентно связаны друг с другом, например, путем связывания дисульфидной связью цистеиновых остатков, расположенных в пределах каждой полипептидной цепи. Первая и третьей полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, например, путем связывания дисульфидной связью цистеиновых остатков, расположенных в пределах каждой полипептидной цепи. Каждая из первой и второй полипептидных цепей содержит антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи, антигенсвязывающий домен переменного домена тяжелой цепи и домен гетеродимеризации. Промежуточный линкерный пептид (линкер 1) отделяет антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи от антигенсвязывающего домена переменного домена тяжелой цепи.

Антигенсвязывающий домен варибельного домена легкой цепи первой полипептидной цепи взаимодействует с антигенсвязывающим доменом варибельного домена тяжелой цепи второй полипептидной цепи с образованием первого функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении первого антигена (т.е. или grA33, или CD3). Аналогично, антигенсвязывающий домен варибельного домена легкой цепи второй полипептидной цепи взаимодействует с антигенсвязывающим доменом варибельного домена тяжелой цепи первой полипептидной цепи с образованием второго функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении второго антигена (т.е. или grA33, или CD3, в зависимости от идентичности первого антигена). Таким образом, выбор антигенсвязывающего домена варибельного домена легкой цепи и антигенсвязывающего домена варибельного домена тяжелой цепи первой и второй полипептидных цепей скоординирован так, чтобы две полипептидные цепи совместно содержали антигенсвязывающие домены варибельных доменов легкой и тяжелой цепи, способные связываться с grA33 и CD3. Каждая из первой и третьей полипептидных цепей содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) SEQ ID NO: 39 и частично или полностью домен CH2 и/или частично или полностью домен CH3 полного домена Fc иммуноглобулина и цистеинсодержащий пептид. Некоторая часть или весь домен CH2 и/или некоторая часть или весь домен CH3 ассоциируются с образованием домена Fc иммуноглобулина биспецифических моновалентных Fc-диател согласно настоящему изобретению. Первая и третья полипептидные цепи биспецифических моновалентных Fc-диател согласно настоящему изобретению ковалентно связаны друг с другом, например, путем связывания дисульфидной связью цистеиновых остатков, расположенных в пределах цистеинсодержащего пептида полипептидных цепей.

Образование гетеродимеров первой и второй полипептидных цепей биспецифического моновалентного диатела или биспецифического моновалентного Fc-диатела может управляться доменами гетеродимеризации. Такие домены включают в себя GVEPKSC (SEQ ID NO: 54) (или VEPKSC; SEQ ID NO: 55) на одной полипептидной цепи и GFNRGEC (SEQ ID NO: 56) (или FNRGEC; SEQ ID NO: 57) на другой полипептидной цепи (US2007/0004909). Альтернативно, такие домены могут быть сконструированы так, чтобы они содержали спирали противоположных зарядов. Домен гетеродимеризации одной из полипептидных цепей содержит последовательность по меньшей мере из шести, по меньшей мере из семи или по меньшей мере из восьми положительно заряженных аминокислот, и домен гетеродимеризации другой полипептидной цепи содержит последовательность по меньшей мере из шести, по меньшей мере из семи или по меньшей мере из восьми отрицательно заряженных аминокислот. Например, первый или второй домен гетеродимеризации может содержать последовательность, содержащую восемь положительно заряженных аминокислот, и другие из доменов гетеродимеризации могут содержать последовательность, содержащую восемь отрицательно заряженных аминокислот. Положительно заряженная аминокислота может представлять собой лизин, аргинин, гистидин и т.д., и/или отрицательно заряженная аминокислота может представлять собой глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту и т.д. Положительно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой лизин и/или отрицательно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой глутаминовую кислоту.

Биспецифические моновалентные диатела и биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно настоящему изобретению сконструированы так, чтобы такие первые и вторые полипептидные цепи были ковалентно связаны друг с другом посредством цистеиновых остатков вдоль их длины. Такие цистеиновые остатки могут быть введены в промежуточный линкер, который отделяет домены VL и VH полипептидов. Альтернативно и более предпочтительно, второй пептид (линкер 2) введен в каждую из полипептидных цепей, например, на amino-конец полипептидных цепей или в положении, которое помещает линкер 2 между доменом гетеродимеризации и антигенсвязывающим доменом варибельного домена легкой цепи или варибельного домена тяжелой цепи.

Как указано выше, grA33 экспрессируется клетками колоректального рака. Антитела, способные иммуноспецифически связываться с grA33, способны связываться с такими клетками. CD3 экспрессируется на Т-клетках. Таким образом, антитела, способные иммуноспецифически связываться как с grA33, так и с CD3, способны направлять Т-клетки на клетки колоректального рака и другие злокачественные клетки, которые экспрессируют grA33 (например, клетки карциномы толстой кишки, клетки рака поджелудочной железы и т.д.) и, таким образом, обеспечивать улучшенную терапию для таких злокачественных опухолей.

I. Предпочтительные grA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела согласно настоящему изобретению.

A) grA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения предусмотрены grA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела, которые состоят из первой полипептидной цепи и второй полипептидной цепи, чьи последовательности позволяют полипептидным цепям ковалентно связаться друг с другом с образованием ковалентно-ассоциированного комплекса, который способен одновременно связываться как с grA33, так и с CD3.

Первая полипептидная цепь предпочтительных gpA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател содержат в направлении от N-конца к C-концу N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться или с CD3, или с gpA33 (т.е. или VL<sub>CD3</sub>, или VL<sub>gpA33</sub>), первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться или с gpA33 (если такая первая полипептидная цепь содержит VL<sub>CD3</sub>), или с CD3 (если такая первая полипептидная цепь содержит VL<sub>gpA33</sub>), цистеинсодержащий второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), стимулирующий образование гетеродимера домен и C-конец (фиг. 1).

Вторая полипептидная цепь предпочтительных gpA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател содержит в направлении от N-конца к C-концу N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться или с gpA33, или с CD3 (т.е. или VL<sub>gpA33</sub>, или VL<sub>CD3</sub>, в зависимости от домена VL, выбранного для первой полипептидной цепи диатела), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться ли с CD3 (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL<sub>gpA33</sub>), или с CD3 (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL<sub>CD3</sub>), цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2), стимулирующий образование гетеродимера домен и C-конец (фиг. 1).

Домен VL первой полипептидной цепи предпочтительных gpA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател взаимодействует с доменом VH второй полипептидной цепи предпочтительных gpA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател с образованием первого функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении первого антигена (т.е. или CD3, или gpA33). Аналогично, домен VL второй полипептидной цепи взаимодействует с доменом VH первой полипептидной цепи с образованием второго функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении второго антигена (т.е. или gpA33, или CD3, в зависимости от идентичности первого антигена). Таким образом, выбор доменов VL и VH первой и второй полипептидных цепей скоординирован так, чтобы две полипептидные цепи предпочтительных gpA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател совместно содержали домены VL и VH, способные связываться с gpA33 и CD3 (т.е. они содержат VL<sub>CD3</sub>/VH<sub>CD3</sub> и VL<sub>gpA33</sub>/VH<sub>gpA33</sub>).

Длина промежуточного линкерного пептида (линкера 1, который отделяет такие домены VL и VH) наиболее предпочтительно выбрана так, чтобы существенно или полностью предотвращать связывание доменов VL и VH полипептидной цепи друг с другом. Таким образом, домены VL и VH первой полипептидной цепи существенно или полностью не способны связываться друг с другом. Аналогично, домены VL и VH второй полипептидной цепи существенно или полностью не способны связываться друг с другом. Предпочтительный промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) характеризуется последовательностью (SEQ ID NO: 1): GGGSGGGG.

Цистеинсодержащий второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2) будет содержать 1, 2, 3 или больше цистеинов. Предпочтительный цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) характеризуется последовательностью SEQ ID NO: 2: GGCGGG.

Стимулирующие образование гетеродимера домены первого и второго полипептидов отличаются друг от друга и сконструированы, чтобы ассоциироваться друг с другом так, чтобы стимулировать ассоциацию первой и второй полипептидных цепей. Таким образом, согласно предпочтительному варианту осуществления одна из этих полипептидных цепей будет сконструирована, чтобы содержать стимулирующий образование гетеродимера "Е-спиральный" домен (SEQ ID NO: 3):

EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

чь остатки будут формировать отрицательный заряд при pH 7, тогда как другая из двух полипептидных цепей буде сконструирована так, чтобы содержать стимулирующий образование гетеродимера "К-спиральный" домен (SEQ ID NO: 4):

KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

чь остатки будут формировать положительный заряд при pH 7.

Присутствие таких заряженных доменов стимулирует ассоциацию между первым и вторым полипептидами и, таким образом, способствует гетеродимеризации. Несущественно, какая спираль обеспечивается какой цепью при условии, что спирали, используемые на первой и второй полипептидных цепях, различаются так, чтобы способствовать гетеродимеризации между такими цепями.

1. gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело, "DART-1".

Первая и вторая полипептидные цепи предпочтительного gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела, обозначенного в настоящем документе как "DART-1", содержат полипептидные домены, характеризующиеся следующими последовательностями:

Домен VL антитела, которое связывает CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 5):

QAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWT  
PARFSGSLLGGKAALITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG

Антигенсвязывающий домен VL<sub>CD3</sub> содержит

CDR1 с последовательностью (SEQ ID NO: 6): RSSTGAVTTTSNYAN;

CDR2 с последовательностью (SEQ ID NO: 7): GTNKRAP и

CDR3 с последовательностью (SEQ ID NO: 8): ALWYSNLWV.

Домен VH антитела, которое связывает CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 9):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT  
YYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLT  
VTVSS

Антигенсвязывающий домен VH<sub>CD3</sub> содержит

CDR1 с последовательностью (SEQ ID NO: 10): TYAMN;

CDR2 с последовательностью (SEQ ID NO: 11); RIRSKYNNYATYYADSVKD и

CDR3 с последовательностью (SEQ ID NO: 12): HGNFGNSYVSWFAY.

Домен VL мышиноного антитела, которое связывает gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 13):

QIVLTQSPAIMSASPGERVTMTCSARSSISFMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLSAGVFPVR  
FSGSGSSTSYSLTISRMEAEADAATYYCQWSSYPLTFSGGSKLELK

Антигенсвязывающий домен VL<sub>gpA33</sub> содержит

CDR1 с последовательностью (SEQ ID NO: 14): SARSSISFMY;

CDR2 с последовательностью (SEQ ID NO: 15): DTSNLS и

CDR3 с последовательностью (SEQ ID NO: 16): QWSSYPLT.

Домен VH мышиноного антитела, которое связывает gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 17):

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFSGSWMNWVKQRPQGQGLEWIGRIYPGDGETNY  
NGKFKDKATLTADKSSSTAYMELSSLTSDSAVYFCARIYGNVYFDVWGAGTTVTVSS

Антигенсвязывающий домен VH<sub>gpA33</sub> содержит

CDR1 с последовательностью (SEQ ID NO: 18): GSWMN;

CDR2 с последовательностью (SEQ ID NO: 19): RIYPGDGETNYNGKFKD и

CDR3 с последовательностью (SEQ ID NO: 20): IYGNVYFDV.

Первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) характеризуется последовательностью (SEQ ID NO: 1): GGGSGGGG. Цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) характеризуется последовательностью SEQ ID NO: 2: GCGGGG.

Стимулирующий образование гетеродимера домен первой полипептидной цепи представляет собой "Е-спиральный" домен (SEQ ID NO: 3). Стимулирующий образование гетеродимера домен второй полипептидной цепи представляет собой "К-спиральный" домен (SEQ ID NO: 4).

Таким образом, первая полипептидная цепь DART-1 характеризуется последовательностью (SEQ ID NO: 21):

QAVVTQEPVSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWT  
PARFSGSLLGGKAALITGAQAEDEADYYCALWYNSLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGQV  
QLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFSGSWMNWVKQRPQGQGLEWIGRIYPGDGETNYNG  
KFKDKATLTADKSSSTAYMELSSLTSDSAVYFCARIYGNVYFDVWGAGTTVTVSSGGC  
GGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

Следует принимать во внимание, что остатки 1-110 SEQ ID NO: 21 представляют собой домен VL антитела, которое связывает CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 5); остатки 111-118 SEQ ID NO: 21 представляют собой первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (SEQ ID NO: 1); остатки 119-237 SEQ ID NO: 21 представляют собой домен VH мышиноного антитела, которое связывает gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 17), остатки 238-243 SEQ ID NO: 21 представляют собой цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (SEQ ID NO: 2) и остатки 244-271 SEQ ID NO: 21 представляют собой стимулирующий образование гетеродимера "Е-спиральный" домен (SEQ ID NO: 3).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует первую полипептидную цепь DART-1, характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO: 22):

caggctgtggtgactcaggagccttcaactgaccgtgtccccaggcggaaactgtgaccctg  
acatgcagatccagcacaggcagcagtgaccacatctaactacgccaattgggtgcagcag  
aagccaggacaggcaccaggcctgatcgggggtacaaacaaaaggcctccctggacc  
cctgcacgggttttctggaagtctgctgggaggaaaggccgctctgactattaccggggca  
caggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtgggtgttc  
gggggtggcacaactgactgtgctgggaggtggtggatccggcggagggtggacaggtc  
cagctgcagcagctctggacctgactggtgaaagcctgggacctcagtgaaagatttctgc  
aaagcttcaggctacacattcagtggtctcttgatgaactgggtgaagcagaggcctgga  
cagggtcttgagtgattggacggatctaccctggagatggagaaactaactacaatggg  
aagtttaaggacaaggccacactgactgcagacaaatcatccaccacagcctacatggag  
ctcagcagcctgacctctgtggactctgcgggtctatttctgtgcaagaatctatggtaat  
aacgtttactctgatgtctggggcagggaccacggteaccgtgtcttccggaggatgt  
ggcgggtggagaagtggccgactggagaaagaggttctgcttttgagaaggaggtcgct  
gcacttgaaaaaggaggtcgcagccctggagaaa

Вторая полипептидная цепь DART-1 характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO: 23):

QIVLTQSPAIMSASPGERVMTCSARSSISFMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAGVFPVR  
FSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYCQQWSSYPLTFGSGTKLELKRGGGSGGGGEVQLV  
ESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADS  
VKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS  
GGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Следует принимать во внимание, что остатки 1-107 SEQ ID NO: 23 представляют собой домен VL мышинового антитела, которое связывает gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 13); остатки 108-115 SEQ ID NO: 23 представляют собой первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (SEQ ID NO: 1); остатки 116-240 SEQ ID NO: 23 представляют собой домен VH антитела, которое связывает CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 9), остатки 241-246 SEQ ID NO: 23 представляют собой цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (SEQ ID NO: 2) и остатки 247-274 SEQ ID NO: 23 представляют собой стимулирующий образование гетеродимера "К-спиральный" домен (SEQ ID NO: 4).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует вторую полипептидную цепь DART-1, характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO: 24):

Caattgttctcaccagtcctccagcaatcatgtctgcatctccaggaggagagggtcacc  
atgacctgcagtgccaggtcaagtataagtttcatgtactggtagcagcagaagccagga  
tcctccccagactcctgatttatgacacatccaacctggcttctggagtcctgttcgc  
ttcagtgccagtggtctgggacctcttattctctcacaatcagccgaatggaggctgaa  
gatgctgccacttattactgccagcagtgaggtagttaccactcacgttcggttctggg  
accaagctggagctgaaacgggtggaggatccggcggaggcggagaggtgcagctggg  
gagctctggggaggttgggtccagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagcctct  
ggattcacctcaacacatacgtatgaattgggtccgccagggtccagggaaggggctg  
gagtggtggtgcaaggatcaggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccagactct  
gtgaaggatagattcaccatctcaagagatgattcaagaactcactgtatctgcaaatg  
aacagcctgaaaaccgaggacacggcctgtattactgtgtgagacacggtaacttcggc  
aattcttacgtgtcttgggttcttattggggacaggggacactgggtgactgtgtcttcc  
ggaggatgtggcgggtgaaaagtggccgactgaaggagaaagttgctgctttaaagag  
aaggctcggcacttaaggaaaaggtcgcagccctgaaagag

## 2. gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело, "DART-2".

Первая и вторая полипептидные цепи второго предпочтительного gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела, обозначенного в настоящем документе как "DART-2", содержат полипептидные домены, характеризующиеся следующими последовательностями:

Домен VL антитела, которое связывает CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 5):

QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWT  
PARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG

Антигенсвязывающий домен VL<sub>CD3</sub> содержит

CDR1 с последовательностью (SEQ ID NO: 6) RSSTGAVTTSNYAN;

CDR2 с последовательностью (SEQ ID NO: 7): GTNKRAP и

CDR3 с последовательностью (SEQ ID NO: 8): ALWYSNLWV

Домен VH антитела, которое связывает CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 25):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYAT  
YYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVSWFAYWGQGLT  
LTVTVSS

Антигенсвязывающий домен VH<sub>CD3</sub> содержит

CDR1 с последовательностью (SEQ ID NO: 10): TYAMN;

CDR2 с последовательностью (SEQ ID NO: 11): RIRSKYNNYATYYADSVKD и

CDR3 с последовательностью: (SEQ ID NO: 12) HGNFNGNSYVSWFAY.

Обсуждаемое выше мышиноое антитело, которое связывается с gpA33 человека, гуманизировали для получения доменов VL и VH предпочтительного диатела DART-2. Указанные гуманизированные домены представлены ниже:

Домен VL гуманизированного антитела, которое связывает gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 26):

DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSARSSISFMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLAGVPSR  
FSGSGSGTEFTLTISLLEAEADAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIK

Антигенсвязывающий домен VL<sub>gpA33</sub> содержит

CDR1 с последовательностью (SEQ ID NO: 14): SARSSISFMY;

CDR2 с последовательностью (SEQ ID NO: 15): DTSNLAS и

CDR3 с последовательностью (SEQ ID NO: 16): QQWSSYPLT.

Домен VH гуманизированного антитела, которое связывает gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 27):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGSMNWVRQAPGQGLEWIGRIYPGDGETNY  
NGKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGNVYFDVWGQGLTITVTVSS

Антигенсвязывающий домен VH<sub>gpA33</sub> содержит

CDR1 с последовательностью (SEQ ID NO: 18): GSWMN;

CDR2 с последовательностью (SEQ ID NO: 19): RIYPGDGETNYNGKFKD и

CDR3 с последовательностью (SEQ ID NO: 20): IYGNVYFDV.

Первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) характеризуется последовательностью (SEQ ID NO: 1): GGGSGGGG. Цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) характеризуется последовательностью SEQ ID NO: 2: GCGGGG.

Стимулирующий образование гетеродимера домен первой полипептидной цепи представляет собой "Е-спиральный" домен (SEQ ID NO: 3). Стимулирующий образование гетеродимера домен второй полипептидной цепи представляет собой "К-спиральный" домен (SEQ ID NO: 4).

Таким образом, первая полипептидная цепь DART-2 характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO: 28):

```
QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPKGQAPRGLIGGTNKRAPWT
PARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYICALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGQV
QLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTGSMNWVRQAPGGLEWIGRIYPGDGETNYNG
KFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGNVYFDVWGQGTITVTVSSGGC
GGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK
```

Следует принимать во внимание, что остатки 1-110 SEQ ID NO: 28 представляют собой домен VL антитела, которое связывает CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 5); остатки 111-118 SEQ ID NO: 28 представляют собой первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (SEQ ID NO: 1); остатки 119-237 SEQ ID NO: 28 представляют собой домен VH антитела, которое связывает gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 27), остатки 238-243 SEQ ID NO: 28 представляют собой цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (SEQ ID NO: 2) и остатки 244-271 SEQ ID NO: 28 представляют собой стимулирующий образование гетеродимера "Е-спиральный" домен (SEQ ID NO: 3)

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует первую полипептидную цепь DART-2, характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO: 29):

```
caggctgtggtgactcaggagccttcaactgaccgtgtccccaggcgaactgtgaccctg
acatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgccaattgggtgcagcag
aagccaggacagggcaccgaagggcctgatcgggggtacaacaagaaggctccctggacc
cctgcacgggttttctggaagtctgctgggaggaaaggccgctctgactattaccggggca
caggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtgggtgttc
gggggtggcacaaaactgactgtgctgggagggtgggtgatccggcggagggtggacaggtc
cagctggtccagagcggggccgaagtcaaaaaaccggagcaagcgtgaaggctctcctgc
aaagcatcaggctatacattacaggcagctggatgaactgggtgaggcaggctccagga
cagggactggagtgatcgggcatctaccctggagacggcgaaactaactataatgga
aagttcaagaccgagtgaccatcacagccgataagtctactagtaccgctacatggag
ctgagctccctgcggtctgaagataccgcccgtctactattgcttagaatttacggaaac
aatgtctattttgacgtgtggggcagggaaacaactgtgactgtctcctccggaggatgt
ggcgggtggagaagtggccgactggagaaagaggttgctgctttggagaaggaggctcgt
gcacttgaaaaggaggtcgcagccctggagaaa
```

Вторая полипептидная цепь DART-2 характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO: 30):

```
DIQLTQSPSFLSASVGDRTVITCSARSSISFMYWYQKPKGKAPKLLIYDTSNLAGVPSR
FSGSGSTEFTLTISSLEAEDAATYYCQWSSYPLTFGQGTKLEIKGGSGGGGEVQLVE
SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSV
KDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFVNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSG
GCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
```

Следует принимать во внимание, что остатки 1-106 SEQ ID NO: 30 представляют собой домен VL антитела, которое связывает gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 26); остатки 107-114 SEQ ID NO: 30 представляют собой первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (SEQ ID NO: 1); остатки 115-239 SEQ ID NO: 30 представляют собой домен VH антитела, которое связывает CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 25), остатки 240-245 SEQ ID NO: 30 представляют собой цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (SEQ ID NO: 2) и остатки 246-273 SEQ ID NO: 30 представляют собой стимулирующий образование гетеродимера "К-спиральный" домен (SEQ ID NO: 4).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует вторую полипептидную цепь DART-2, характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO: 31):

```
Gacattcagctgactcagtcacctcttttctgtccgcatccgctcggagatcgagtgact
attacttgctctgctaggtcctcaatcagcttcatgtactggatcagcagaagcccggc
aaagcacctaaagctgctgactacgacacaagcaacctggcctccggggtgccatctcgg
ttctctggcagtggggtcaggaactgagttaccctgacaattagctccctggaggctgaa
gatgccgctacctactattgccagcagtgagcagctatcctctgacctcggacagggg
actaaactggaatcaaggggtggaggatccggcggcggaggcggaggtgcagctggtggag
tctgggggaggttgggtccagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagcctctgga
ttcaccttcagcacatacagctatgaattgggtccgccaaggtccagggaaaggggctggag
tgggttgaaggatcaggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccgactctgtg
aaggatagattcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaatgaaac
agcctgaaaaccgaggacacggcctgtattactgtgtgagacacggtaactcggcaat
tcttacgtgtcttgggttgcctattggggacaggggacactgggtgactgtgtctccgga
ggatgtggcgggtgaaaagtggccgactgaaggagaaagtgtgctgttgaagagaag
gtcggccgacttaaggaaaaggtcgcagcctgaaagag
```

3. gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело, содержащее альбуминсвязывающий домен (ABD) ("DART-2 w/ABD").

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело будет содержать альбуминсвязывающий домен ("ABD") (gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело с ABD").

Как раскрыто в международной патентной публикации WO 2012/018687, для улучшения *in vivo* фармакокинетических свойств молекул диател молекулы могут быть модифицированы так, чтобы они содержали полипептидную часть белка, связывающегося с сывороточными белками, на одном или нескольких концах молекулы диатела. Наиболее предпочтительно, такая полипептидная часть белка, связывающегося с сывороточными белками, будет встроена на С-конце молекулы диатела. Особенно предпочтительная полипептидная часть белка, связывающегося с сывороточными белками, для этой цели представляет собой альбуминсвязывающий домен (ABD) из белка G стрептококка. Альбуминсвязывающий домен 3 (ABD3) белка G штамма *Streptococcus G148* является особенно предпочтительным.

Альбуминсвязывающий домен 3 (ABD3) белка G штамма *Streptococcus G148* состоит из 46 аминокислотных остатков, образующих стабильный трехспиральную структуру и характеризуется широкой альбуминсвязывающей специфичностью (Johansson, M.U. et al. (2002), "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules", *J. Biol. Chem.* 277(10):8114-8120). Альбумин представляет собой наиболее распространенный белок в плазме и характеризуется периодом полувыведения, составляющим 19 дней у людей. Альбумин содержит несколько низкомолекулярных сайтов связывания, которые позволяют ему нековалентно связываться с другими белками и, тем самым, продлевать их периоды полужизни в сыворотке.

Таким образом, первая полипептидная цепь или вторая полипептидная цепь gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего альбуминсвязывающий домен, содержит третий линкер (линкер 3), который отделяет E-спираль (или K-спираль) такой полипептидной цепи от альбуминсвязывающего домена. Предпочтительная последовательность такого линкера 3 представляет собой GGGG (SEQ ID NO: 32) или GGGNS (SEQ ID NO: 33). Предпочтительный альбуминсвязывающий домен (ABD) характеризуется следующей аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 34):

```
LAQAKEAAIRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAAALP
```

Чтобы проиллюстрировать этот аспект настоящего изобретения, первая полипептидную цепь описанного выше DART-2 модифицировали так, чтобы она содержала альбуминсвязывающий домен, приводя в результате к образованию gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего ABD, обозначенного в настоящем документе как "DART-2 w/ABD."

Первая полипептидная цепь такого DART-2 w/ABD характеризуется следующей аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 35):

```
QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWT
PARFSGSLLGGKAALITGAQAEDADYYCALWYNSLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGQV
QLVQSGAEVKKKPGASVKVSKASGYTFTGSMNWRVQAPGGLEWIGRIYPGDGETNYNG
KFKDRVITADKSTSTAYMELSLRSEDTAVYYCARIYGNVYFDVWGQGTITVTVSSGGC
GGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGSLAQAKEAAIRELDKYGVSDYYKNLID
NAKSAEGVKALIDEILAAALP
```

Следует принимать во внимание, что остатки 1-271 SEQ ID NO: 35 являются идентичными остаткам 1-271 DART-2 и, таким образом, представляют, в направлении от N-конца к С-концу, домен VL антитела, которое связывает CD3 (VLCD3) (SEQ ID NO: 5); первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (SEQ ID NO: 1); домен VH антитела, которое связывает gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 27), цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (SEQ ID NO: 2), стимулирующий образование гетеродимера "E-спиральный" домен (SEQ ID NO: 3) и С-конец. Остатки 272-275 представляют собой линкер 3 (SEQ ID NO: 32), и остатки 276-321 представляют собой альбуминсвязывающий домен (SEQ ID NO: 34).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует первую полипептидную цепь DART-2 w/ABD, характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO: 36):

```
caggctgtggtgactcaggagccttactgaccgtgtccccaggcggaaactgtgaccctg
acatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgcccaattgggtgacagcag
aagccaggacaggcaccaggcggcctgatcgggggtacaaacaaaaggcctccctggacc
cctgcacggttttctggaagtctgctggggcggaaaggccgctctgactattaccggggca
caggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtgggtgttc
gggggtggcacaaaactgactgtgctgggaggggggtggatccggcggagggtggacaggtc
cagctggtccagagcggggccgaagtcaaaaaaccggagcaagcgtgaaggtctcctgc
aaagcatcaggctatacatttacaggcagctggatgaactgggtgaggcaggctccagga
cagggactggagtggatcggggcgcattaccctggagacggcggaaactaactataatgga
aagttcaagaccgagtgaccatcacagccgataagtctactagtaccgctacatggag
ctgagctccctgaggctgaagataccggcgtctactattgcgctagaatttacggaaac
aatgtctatthttgacgtgtggggcagggaacaactgtgactgtctcctccggaggatgt
ggcgggtggagaagtggccgcaactggagaagagggttctgctttggagaaggaggctcgt
gcacttgaaaaggaggctcgcagccctggagaagggcggcgggtctctggcccaggcaaaa
gaggcagccatccgcgaactggataaatatggcgtgagcgattattataagaacctgatt
gacaacgcaaaatccggcgaaggcgtgaaagcaactgattgatgaaattctggccgcctgc
cct
```

Вторая полипептидная цепь DART-2 w/ABD является такой же, как обсуждаемая выше вторая полипептидная цепь DART-2 (SEQ ID NO: 30).

В. gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела, содержащие домен Fc IgG ("DART-2 w/Fc").

Согласно дополнительному варианту осуществления настоящее изобретение предусматривает gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела, содержащие домен Fc IgG. Соответственно, такие диатела в настоящем документе называется "gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела". Домен Fc Fc-диател согласно настоящему изобретению может представлять собой либо полную область Fc (например, полную область Fc IgG) или только фрагмент полной области Fc. Хотя домен Fc биспецифических моновалентных Fc-диател согласно настоящему изобретению может обладать способностью связываться с одним или несколькими рецепторами Fc (например, FcγR), более предпочтительно такой домен Fc будет вызывать сниженное связывание с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого областью Fc дикого типа) или будет существенно устранять способность такого домена Fc связываться с таким(и) рецептор(ами). Домен Fc биспецифических моновалентных Fc-диател согласно настоящему изобретению может включать в себя частично или полностью домен CH2 и/или частично или полностью домен CH3 полной области Fc или может содержать вариантную последовательность CH2 и/или вариантную последовательность CH3 (которая может включать в себя, например, одну или несколько вставок и/или одну или несколько делеций относительно доменов CH2 или CH3 полной области Fc). Домен Fc биспецифических моновалентных Fc-диател согласно настоящему изобретению может содержать не относящиеся к Fc полипептидные части, или может содержать части не встречающихся в природе полных областей Fc, или может содержать не встречающиеся в природе ориентации доменов CH2 и/или CH3 (такие как, например, два домена CH2 или два домена CH3, или, в направлении от N-конца к С-концу, домен CH3, соединенный с доменом CH2, и т.д.).

Согласно первому варианту осуществления, обозначенному как "версия 1" и показанному на фиг. 2А, первая полипептидная цепь иллюстративного gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного Fc-диатела будет содержать, в направлении от N-конца к С-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться или с gpA33, или с CD3 (т.е. или VL<sub>gpA33</sub>, или VL<sub>CD3</sub>), промежуточный спейсерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться или с gpA33 (если такая первая полипептидная цепь содержит VL<sub>CD3</sub>), или с CD3 (если такая первая полипептидная цепь содержит VL<sub>gpA33</sub>), цистеинсодержащий второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), стимулирующий образование гетеродимера домен, спейсерный пептид (линкер 5), цистеинсодержащий пептид (пептид 1), домен Fc IgG (предпочтительно все или часть доменов CH2 и CH3 области Fc антитела) и С-конец.

Согласно второму варианту осуществления, обозначенному как "версия 2" и показанному на фиг. 2В, первая полипептидная цепь иллюстративного gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного Fc-диатела будет содержать в направлении от N-конца к С-концу N-конец, цистеинсодержащий пептид (пептид 1), домен Fc IgG (предпочтительно все или часть доменов CH2 и CH3 области Fc антитела), промежуточный спейсерный пептид (линкер 4); домен VL моноклонального антитела, способного связываться или с gpA33, или с CD3 (т.е. или VL<sub>gpA33</sub>, или VL<sub>CD3</sub>), промежуточный спейсерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться или с gpA33 (если такая первая полипептидная цепь содержит VL<sub>CD3</sub>), или с CD3 (если такая первая полипептидная цепь содержит VL<sub>gpA33</sub>), цистеинсодержащий второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), стимулирующий образование гетеродимера домен и С-конец.

Предпочтительно согласно любому варианту осуществления домен Fc первой полипептидной цепи будет вызывать сниженное связывание с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого областью Fc дикого типа) или будет существенно устранять способность такого домена Fc связываться с таким(и) рецептором(ами). Варианты и мутантные формы Fc, способные опосредовать такое измененное связывание, хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя аминокислотные замены в положениях 234 и 235, замену в положении 265 или замену в положении 297 (см., например, патент США № 5624821, включенный в настоящий документ посредством ссылки). Согласно предпочтительному варианту осуществления домен CH2 и CH3 включает в себя замену в положении 234 на аланин и в положении 235 на аланин.

Вторая полипептидная цепь таких иллюстративных grA33 × CD3 биспецифических моновалентных Fc-диател (версии 1 и версии 2) будет содержать, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться или с grA33, или с CD3 (т.е. или VL<sub>grA33</sub>, или VL<sub>CD3</sub>, в зависимости от домена VL, выбранного для первой полипептидной цепи диатела), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться или с CD3 (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL<sub>grA33</sub>), или с CD3 (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL<sub>CD3</sub>), цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2), стимулирующий образование гетеродимера домен (предпочтительно К-спиральный домен) и C-конец.

Иллюстративные grA33 × CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела (версия 1 и версия 2) будут дополнительно содержать третью полипептидную цепь, которая будет содержать в направлении от N-конца к C-концу N-конец, цистеинсодержащий пептид (пептид 1), домен Fc IgG (предпочтительно все или часть доменов CH2 и CH3 области Fc антитела), характеризующийся таким же изотипом, что и домен Fc первой полипептидной цепи, и C-конец. Домен Fc третьей полипептидной цепи предпочтительно будет вызывать снижение связывания с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого областью Fc дикого типа) или будет существенно устранять способность такого домена Fc связываться с таким(и) рецептором(ами), как обсуждалось выше, по отношению к первой полипептидной цепи иллюстративных grA33 × CD3 биспецифических моновалентных Fc-диател.

Необязательно, присутствующий промежуточный спейсерный пептид (линкер 4) будет предпочтительно содержать аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 37): APSSS и более предпочтительно характеризуется аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 38): APSSSPME.

Цистеинсодержащий пептид (пептид 1) первой и третьей полипептидных цепей и могут состоять из одной и той же аминокислотной последовательности или из различных аминокислотных последовательностей и будут содержать 1, 2, 3 или больше цистеиновых остатков. Особенно предпочтительный пептид 1 характеризуется аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 39): DKTHTCPPCP.

Промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) предпочтительно характеризуется последовательностью SEQ ID NO: 1, описанной выше. Цистеинсодержащий второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2) предпочтительно характеризуется последовательностью SEQ ID NO: 2, описанной выше.

Стимулирующий образование гетеродимера домен первой и второй полипептидных цепей grA33 × CD3 биспецифических моновалентных Fc-диател будет предпочтительно представлять собой описанный выше E-спиральный домен (SEQ ID NO: 3) и К-спиральный домен (SEQ ID NO: 4) и будет выбран так, чтобы одна из таких полипептидных цепей содержала E-спиральный домен, тогда как другая содержала К-спиральный домен, как обсуждалось выше.

Предпочтительный спейсерный пептид (линкер 5) характеризуется последовательностью GGG.

Домены CH2 и/или CH3 первого и третьего полипептидов необязательно должны быть идентичными и предпочтительно модифицированы так, чтобы содействовать образованию комплекса между двумя полипептидами. Например, аминокислотная замена (предпочтительно замена на аминокислоту, содержащую объемную боковую группу, образующую "выступ", например триптофан) может быть введена в домен CH2 или CH3 так, чтобы стерическое влияние предотвращало взаимодействие с аналогично мутированным доменом и вынуждало мутированный домен образовывать пару с доменом, в котором была сконструирована комплементарная, или обеспечивающая размещение мутация, т.е. "впадина" (например, замена на глицин). Такие наборы мутаций можно сконструировать в любой паре полипептидов, содержащих молекулу биспецифического моновалентного Fc-диатела, и, кроме того, сконструировать в любой части полипептидных цепей указанной пары. Способы белковой инженерии, чтобы способствовать гетеродимеризации вместо гомодимеризации, хорошо известны в настоящей области техники, в частности в отношении инженерии иммуноглобулиноподобных молекул, и предусмотрены в настоящем документе (см., например, Ridgway et al. (1996), "Knobs-Into-Holes" Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization, " Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997), "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library", J. Mol. Biol. 270:26-35, и Xie et al. (2005), "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis", J. Immunol. Methods 296:95-101; каждая из которых полностью включена в на-

стоящий документ посредством ссылки). Предпочтительно, что "выступ" конструируют в доменах CH2-CH3 первой полипептидной цепи, а "впадину" конструируют в доменах CH2-CH3 третьей полипептидной цепи. Таким образом, "выступ" будет содействовать в предотвращении гомодимеризации первой полипептидной цепи посредством своих доменов CH2 и/или CH3. Поскольку третья полипептидная цепь предпочтительно содержит замену, обеспечивающую образование "впадины", она будет гетеродимеризоваться с первой полипептидной цепью, а также гомодимеризоваться самой с собой. Предпочтительный выступ создается путем модификации домена Fc нативной области Fc IgG так, чтобы она содержала модификацию T366W. Предпочтительная впадина создается путем модификации домена Fc нативной области Fc IgG, чтобы она содержала модификацию T366S, L368A и Y407V. Для содействия в очищении гомодимера третьей полипептидной цепи от конечного биспецифического моновалентного Fc-диатела, содержащего первую, вторую и третью полипептидные цепи, сайт связывания с белком А доменов CH2 и CH3 третьей полипептидной цепи предпочтительно подвергают мутации с помощью аминокислотной замены в положении 435 (H435R). Для содействия в очищении третьей полипептидной цепи гомодимера третьей полипептидной цепи от конечного биспецифического моновалентного Fc-диатела, содержащего первую, вторую и третью полипептидные цепи, сайт связывания с белком А доменов CH2 и CH3 третьей полипептидной цепи предпочтительно подвергают мутации с помощью аминокислотной замены. Таким образом, гомодимер третьей полипептидной цепи не будет связываться с белком А, тогда как биспецифическое моновалентное Fc-диатело будет сохранять свою способность связывать белок А через сайт связывания с белком А на первой полипептидной цепи.

Предпочтительная последовательность для доменов CH2 и CH3 домена Fc антитела, присутствующего в первой полипептидной цепи, представляет собой (SEQ ID NO: 40):

```
APFAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTT
LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKL
TVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

Предпочтительная последовательность для доменов CH2 и CH3 домена Fc антитела, присутствующего в третьей полипептидной цепи, представляет собой (SEQ ID NO: 41):

```
APFAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTT
LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK
```

#### 1. Версия 1 DART-2 w/Fc.

Первая, вторая и третья полипептидные цепи предпочтительного gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного Fc-диатела, обозначенного в настоящем документе как "версия 1 DART-2 w/Fc", содержат полипептидные домены, характеризующиеся следующими последовательностями:

Первая полипептидная цепь такой версии 1 DART-2 w/Fc характеризуется следующей аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 42):

```
DIQLTQSPSFLSASVGDRTVITCSARSSISFMYWYQQKPKGKAPKLLIYDTSNLSAGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISLSLEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIKGGGSGGGGEVQLVE
SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSV
KDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVSWFAYWGQGLTIVTSSG
GCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFP
FKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTTLPPSREEMTKNQV
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

Следует принимать во внимание, что остатки 1-106 SEQ ID NO: 42 представляют собой домен VL антитела, которое связывает gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 26); остатки 107-114 SEQ ID NO: 42 представляют собой первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (SEQ ID NO: 1); остатки 115-239 SEQ ID NO: 42 представляют собой домен VH антитела, которое связывает CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 25); остатки 240-245 SEQ ID NO: 42 представляют собой цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (SEQ ID NO: 2); остатки 246-273 SEQ ID NO: 42 представляют собой стимулирующий образование гетеродимера "Е-спиральный" домен (SEQ ID NO: 3); остатки 274-276 представляют собой спейсерный пептид GGG (линкер 5); остатки 277-286 представляют собой пептид 1 (SEQ ID NO: 39), остатки 277-503 представляют собой последовательность для доменов CH2 и CH3 домена Fc антитела (SEQ ID NO: 40).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует первую полипептидную цепь версии 1 DART-2 w/Fc, характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO: 43):

```
gacattcagctgactcagtcctccctcttttctgtccgcatccgctcggagatcgagtgact
attacttgctctgctaggtcctcaatcagcttcatgtactggatcagcagaagcccgccg
aaagcacctaagctgctgatctacgacacaagcaacctggcctccgggggtgccatctcgg
```

ttctctggcagtgggtcaggaactgagtttacctgacaattagctccctggaggctgaa  
gatgccgctacctactattgccagcagtgaggcagctatcctctgacctcggacagggg  
actaaactggaatcaaggggtggagatccggcgggcggaggcgagggtgcagctggagg  
tctgggggaggttgggtccagcctggagggtccctgagactctcctgtgacacctctgga  
ttcaccttcagcacatacagctatgaattgggtccgccaggtccaggaaggcctctgga  
tgggttgaaggatcaggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccgactctgtg  
aaggatagattcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaatgaac  
agcctgaaaaccgaggacacggcctgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaat  
tcttacgtgtcttgggttcttatggggacaggggacactggtgactgtgtctccgga  
ggatgtggcgggtggagaagtggccgactggagaaagaggttggctgcttggagaaggag  
gtcgtgctcacttgaagaggaggtcgcagccctggagaaaggcggcggggacaaaactcac  
acatgccaccgtgccagcacctgaagcccggggggaccgtcagttctcctctcccc  
ccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctgggtggtg  
gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtg  
cataatgccaagacaagcccgggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagc  
gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggctctcc  
aacaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccga  
gaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagc  
ctgtggtgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaat  
gggcagcggagagaacaactacaagaccagcctcccgctgctggactccgacggctccttc  
ttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctca  
tgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtct  
ccgggtaaa

Вторая полипептидная цепь такой версии 1 DART-2 w/Fc характеризуется следующей аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 44):

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWT  
PARFSGSLLGGKAALITGAQAEDEADYYCALWYSLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGGQV  
QLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTGSMNWRQAPGQGLEWIGRIYPGDGETNYNG  
KFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARTYGNVYFDVWGQGTITVTVSSGGC  
GGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Следует принимать во внимание, что остатки 1-110 SEQ ID NO: 44 представляют собой домен VL антитела, которое связывает CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 5); остатки 111-118 SEQ ID NO: 44 представляют собой первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (SEQ ID NO: 1); остатки 119-237 SEQ ID NO: 44 представляют собой домен VH антитела, которое связывает gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 27), остатки 238-243 SEQ ID NO: 44 представляют собой цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (SEQ ID NO: 2) и остатки 244-271 SEQ ID NO: 44 представляют собой стимулирующий образование гетеродимера "К-спиральный" домен (SEQ ID NO: 4).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует вторую полипептидную цепь версии 1 DART-2 w/Fc, характеризуется последовательностью (SEQ ID NO: 45):

caggctgtggtgactcaggagccttcaactgacctgctccccaggcggactgtgacctg  
acatgcagatccagcacaggcagtcagtgaccacatctaactacgccaattgggtgcagcag  
aagccaggacagggcaccaggcctgatcgggggtacaaacaaaaggctccctggacc  
cctgcacggttttctggaagtctgctggggcggaaaggccgctctgactattaccggggca  
caggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtgggtgttc  
gggggtggcacaactgactgtgctgggaggggtggatccggcggagggtggacaggtc  
cagctggtccagagcggggccgaagtcaaaaaaccggagcaagcgtgaaggctcctctgc  
aaagcatcaggctatacatttacaggcagctggatgaactgggtgaggcaggtccaggga  
caggactggagtggatcgggcgcatctaccctggagacggcgaactaactataatgga  
aagttcaagaccgagtgaccatcacagccgataagttacttagtaccgctacatggag  
ctgagctccctgcggtctgaagataccgctctactattgcgctagaatttacggaaac  
aatgtctatttgacgtgtggggcaggggaacaactgtgactgtctcctccggaggatgt  
ggcgggtgaaaagtggccgactgaaggagaaagttgctgcttggaaagagaaggctcgc  
gcacttaaggaaaaggctgcagccctgaaagag

Третья полипептидная цепь такой версии 1DART-2 w/Fc характеризуется следующей аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 46):

DKTHTCPFCFAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK  
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD  
DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMNEALHNRYTQKSLSLSPGK

Следует принимать во внимание, что остатки 1-10 SEQ ID NO: 46 представляют собой пептид 1 (SEQ ID NO: 39) и остатки 11-227 представляют собой домены CH2 и CH3 домена Fc антитела (SEQ ID NO: 41).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует третью полипептидную цепь версии 1 DART-2 w/Fc, характеризуется следующей последовательностью (SEQ ID NO: 47):

```
Gacaaaactcacacatgccaccctgcccagcaccctgaagcccgccgggggaccgtcagtc
ttcctcttcccccaaaaacccaaggaacacctcatgatctcccggacccttgaggtcaca
tgcgtggtggtgacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataaatgccaagacaaagcccgccggaggagcagtagacaacagcacgtac
cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaag
tgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaa
gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccccgggagagatgaccaag
aaccaggtcagcctgagttgcccagtcacaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactcc
gacggctccttcttctcgtcagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
aacgtcttctcatgctcctgtagatgaggtctctgcacaaccgctacacgcagaagagc
ctctccctgtctccgggtaaa
```

## 2. Версия 2 DART-2 w/Fc.

Первая, вторая и третья полипептидные цепи второго предпочтительного gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного Fc-диатела, обозначенного в настоящем документе как "версия 2 DART-2 w/Fc", содержат полипептидные домены, характеризующиеся следующими последовательностями. Среди прочих отличий, версия 1 DART-2 w/Fc отличается от версии 2 DART-2 w/Fc в расположении последовательностей CH2 и CH3 первой полипептидной цепи; указанные последовательности расположены на C-конце относительно последовательностей VL и VH версии 1 DART-2 w/Fc, тогда как они расположены на N-конце относительно последовательностей VL и VH версии 2 DART-2 w/Fc.

Первая полипептидная цепь такой версии 2 DART-2 w/Fc характеризуется следующей аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 48):

```
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDL
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAPSSSPMEDIQLT
QSPSFLSASVGDRTVITCSARSSISFMYWYQQKPKGKAPKLLIYDTSNLAGVPSRFSGSG
SGTEFTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIKGGGSGGGGEVQLVESGGGL
VQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFT
ISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVSWFAYWGQGLTIVTSSGGCGGG
KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
```

Следует принимать во внимание, что остатки 1-10 SEQ ID NO: 48 представляют собой пептид 1 (SEQ ID NO: 39); остатки 11-227 SEQ ID NO: 48 представляют собой последовательность для доменов CH2 и CH3 домена Fc антитела (SEQ ID NO: 40); остатки 228-235 SEQ ID NO: 48 представляют собой промежуточный спейсерный пептид (линкер 4) (SEQ ID NO: 38); остатки 236-341 SEQ ID NO: 48 представляют собой домен VL антитела, которое связывает gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 26); остатки 342-349 SEQ ID NO: 48 представляют собой первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (SEQ ID NO: 1); остатки 350-474 SEQ ID NO: 48 представляют собой домен VH антитела, которое связывает CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 25); остатки 475-480 SEQ ID NO: 48 представляют собой цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (SEQ ID NO: 2); и остатки 481-508 SEQ ID NO: 48 представляют собой стимулирующий образование гетеродимера "К-спиральный" домен (SEQ ID NO: 4).

Вторая полипептидная цепь такой версии 2 DART-2 w/Fc характеризуется аминокислотной последовательностью первой полипептидной цепи DART-2 (т.е. SEQ ID NO: 28) (описанной выше).

Третья полипептидная цепь такой версии 2 DART-2 w/Fc характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46 (описанной выше).

### Фармацевтические композиции.

Композиции согласно настоящему изобретению включают в себя композиции нерасфасованного лекарственного средства, пригодные в производстве фармацевтических композиций (например, неочищенных или нестерильных композиций) и фармацевтических композиций (т.е. композиций, которые являются подходящими для введения субъекту или пациенту), которые можно использовать в получении стандартных лекарственных форм. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество gpA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател или gpA33 × CD3 биспецифических моновалентных Fc-диател, раскрытых в настоящем документе, и дополнительное терапевтическое средство и фармацевтически приемлемый носитель. Композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно содержат профилактически или терапевтически эффективное количество одной или нескольких молекул согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие такие gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела или gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела и второе терапевтическое антитело (например, специфическое к антигену злокачественной опухоли моноклональное антитело), которое является специфическим в отношении конкретного антигена, связанного со злокачественной опухолью, и фармацевтически приемлемый носи-

тель.

Согласно конкретному варианту осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регуляторным органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и более конкретно у людей. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, например адьюванту Фрейнда (полному и неполному), вспомогательное вещество или инертный носитель, с которым водят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая в себя масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и подобное. Вода представляет собой предпочтительный носитель, если фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и растворы глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают в себя крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицерин моностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и подобное. Композиция при необходимости также может содержать незначительные количества смачивающих средств или эмульгаторов, или pH буферных средств. Указанные композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, драже, капсул, порошков, составов замедленного высвобождения и подобное.

Как правило, ингредиенты композиций согласно настоящему изобретению поставляются либо отдельно, либо смешанными вместе в стандартной лекарственной форме, например в виде сухого лиофилизованного порошка или безводного концентрата, в герметически запаянном контейнере, таком как ампула или саше с указанием количества активного средства. Если композиция предназначена для введения с помощью инфузии, она может продаваться с инфузионным флаконом, содержащим стерильную воду или солевой раствор фармацевтической степени чистоты. Если композиция предназначена для введения с помощью инъекции, ампула со стерильной водой для инъекций или соевым раствором может быть предоставлена с тем, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены в состав в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают в себя без ограничения соли, образованные такими анионами, как анионы, происходящие из соляной, ортофосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные катионами, такими как катионы, происходящие из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрен фармацевтический пакет или набор, содержащий одна или несколько контейнеров, заполненных такими раскрытыми gpA33 × CD3 биспецифическими моновалентными диателами или gpA33 × CD3 биспецифическими моновалентными Fc-диателами (отдельно или с дополнительным(и) терапевтическим(и) средством(ами)) и таким фармацевтически приемлемым носителем. Кроме того, одно или несколько других профилактических или терапевтических средств, пригодных для лечения заболевания, также могут быть включены в фармацевтический пакет или набор. Согласно настоящему изобретению также предусмотрен фармацевтический пакет или набор, содержащий один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению. Необязательно такой(ие) контейнер(ы) может сопровождать уведомление в форме, предусмотренной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, причем указанное уведомление отражает разрешение соответствующим органом производства, применения или продажи для введения людям.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены наборы, которые можно использовать в описанных выше способах. Согласно одному варианту осуществления набор содержит одну или несколько молекул согласно настоящему изобретению. Согласно другому варианту осуществления набор дополнительно содержит одно или несколько других профилактических или терапевтических средств, пригодных для лечения злокачественной опухоли, в одном или нескольких контейнерах. Согласно другому варианту осуществления набор дополнительно содержит одно или несколько антител, которые связывают один или несколько антигенов, ассоциированных со злокачественной опухолью. Согласно определенным вариантам осуществления другое профилактическое или терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство. Согласно другим вариантам осуществления профилактическое или терапевтическое средство представляет собой биологическое или гормональное терапевтическое средство.

Применения композиций согласно настоящему изобретению.

gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела или gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно настоящему изобретению характеризуются способностью осуществлять лечение любого заболевания или состояния, связанного с экспрессией gpA33 или характеризующегося его экспрессией. Таким образом, без ограничения фармацевтические композиции, содержащие такие мо-

лекулы, можно использовать в диагностике или лечении злокачественных опухолей толстой кишки, колоректальных злокачественных опухолей и злокачественных опухолей поджелудочной железы.

Способы введения.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть предусмотрены для лечения, профилактики и уменьшения интенсивности одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием, нарушением или инфекцией, путем введения субъекту эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Согласно предпочтительному аспекту такие композиции являются по существу очищенными (т.е. по существу не содержат веществ, которые ограничивают ее действие или производят нежелательные побочные эффекты). Согласно конкретному варианту осуществления субъект представляет собой животное, предпочтительно млекопитающее, такое как не относящееся к приматам млекопитающее (например, корова, лошадь, кошка, собака, грызун и т.д.) или примат (например, обезьяна, такая как, яванский макак, человек и т.д.). Согласно предпочтительному варианту осуществления субъект представляет собой человека.

Известны различные системы доставки, и их можно использовать для введения композиций согласно настоящему изобретению, например инкапсулирование в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать антитело или слитый белок, опосредованный рецептором эндцитоз (см., например, Wu et al. (1987), "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System", J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструкция из нуклеиновой кислоты в виде части ретровирусного или другого вектора и т.д.

Способы введения gpA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател или gpA33 × CD3 биспецифических моновалентных Fc-диател согласно настоящему изобретению включают в себя без ограничения парентеральное введение (например, интрадермальное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и мукозальное введение (например, интраназальный и пероральный пути). Согласно конкретному варианту осуществления молекулы согласно настоящему изобретению вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции можно вводить любым удобным путем, например с помощью инфузии или болюсной инъекции, путем поглощения через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Кроме того, пульмонарное введение также можно использовать, например, с помощью применения ингалятора или небулайзера и состава с аэрозольным средством. См., например, патенты США № 6019968; 5985320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540 и 4880078 и международные патентные публикации согласно PCT № WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346 и WO 99/66903, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено, что gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела или gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно настоящему изобретению упакованы в такой герметически запаянный контейнер, как ампула или саше, с указанием количества таких молекул. Согласно одному варианту осуществления gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела или gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно настоящему изобретению поставляют в виде сухого стерилизованного лиофилизованного порошка или безводного концентрата в герметически запаянном контейнере и его можно развести, например, водой или солевым раствором до соответствующей концентрации для введения субъекту. gpA33 × CD3 диатела или gpA33 × CD3 Fc-диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно поставляют в виде сухого стерильного лиофилизованного порошка в герметически запаянном контейнере в стандартной дозировке, составляющей по меньшей мере 5 мкг, более предпочтительно по меньшей мере 10 мкг, по меньшей мере 15 мкг, по меньшей мере 25 мкг, по меньшей мере 50 мкг, по меньшей мере 100 мкг или по меньшей мере 200 мкг.

Лиофилизованные gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела или gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно настоящему изобретению необходимо хранить при температуре от 2 до 8°C в их оригинальном контейнере, и молекулы необходимо вводить не позднее чем через 12 ч, предпочтительно не позднее чем через 6 ч, не позднее чем через 5 ч, не позднее чем через 3 ч или не позднее чем через 1 ч после их разведения. Согласно альтернативному варианту осуществления gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела или gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно настоящему изобретению поставляют в жидкой форме в герметически запаянном контейнере с указанием количества и концентрации молекулы, слитого белка или конъюгированной молекулы. Жидкую форму таких биспецифических моновалентных диател или биспецифических моновалентных Fc-диател предпочтительно поставляют в герметически запаянном контейнере, в котором молекулы находятся в концентрации, составляющей по меньшей мере 1 мкг/мл, более предпочтительно по меньшей мере 2,5 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл или по меньшей мере 100 мкг/мл.

Количество gpA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател или gpA33 × CD3 биспецифиче-

ских моновалентных Fc-диател согласно настоящему изобретению, которое будет эффективным в лечении, профилактике или уменьшении интенсивности одного или нескольких связанных с нарушением симптомов, можно определить с помощью стандартных клинических техник. Точная доза, применяемая в составе, также будет зависеть от пути введения и серьезности состояния, и должна определяться в соответствии с решением лечащего врача и всех соответствующих обстоятельств пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых зависимости от дозы из *in vitro* тестовых систем или тестовых систем - животных моделей.

Для grA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател или grA33 × CD3 биспецифических моновалентных Fc-диател, предусмотренных настоящим изобретением, вводимая пациенту дозировка составляет, как правило, по меньшей мере приблизительно 0,01 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,05 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,1 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,2 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,5 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 1 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 2 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 3 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 5 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 10 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 20 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 30 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 50 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,1 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,15 мг/кг массы тела субъекта или больше.

Дозировку и частоту введения биспецифических моновалентных диател или биспецифических моновалентных Fc-диател согласно настоящему изобретению можно снизить или изменить путем усиления поглощения и проникновения биспецифических моновалентных Fc-диател в ткани с помощью таких модификаций, как, например, липидизация.

Согласно одному варианту осуществления вводимую пациенту дозировку grA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател или grA33 × CD3 Fc биспецифических моновалентных диател согласно настоящему изобретению можно рассчитать для применения в качестве монотерапии. Согласно другому варианту осуществления биспецифические моновалентные диател или биспецифические моновалентные Fc-диател согласно настоящему изобретению используют в комбинации с другими терапевтическими композициями, и вводимая пациенту дозировка является ниже, чем при использовании таких биспецифических моновалентных диател или биспецифических моновалентных Fc-диател в качестве монотерапии.

Согласно конкретному варианту осуществления может быть необходимым введение фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению местно в нуждающуюся в лечении область; этого можно достичь, например, без ограничения с помощью местной инфузии, инъекции или посредством имплантата, причем указанный имплантат изготовлен из пористого, непористого или желатинообразного материала, включая в себя такие мембраны, как мембраны Sialastic, или волокна. При введении молекулы согласно настоящему изобретению предпочтительно необходимо уделить внимание применению материалов, которые не абсорбируют молекулу.

Согласно другому варианту осуществления композиции могут быть доставлены в везикуле, в частности липосоме (см. Langer (1990), "New Methods Of Drug Delivery", *Science*, 249:1527-1533); Treat et al., в *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, p. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, p. 317-327; см., главным образом, там же).

Согласно другому варианту осуществления композиции могут быть доставлены в системе контролируемого или замедленного высвобождения. Любую технику, известную специалисту в настоящей области техники, можно использовать для получения составов замедленного высвобождения, содержащих одну или несколько молекул согласно настоящему изобретению. См., например, патент США № 4526938; международные патентные публикации согласно PCT № WO 91/05548; WO 96/20698; Ning et al. (1996), "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song et al. (1995), "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek et al. (1997), "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; и Lam et al. (1997), "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Согласно одному варианту осуществления насос можно использовать в системе контролируемого высвобождения (См. Langer, ранее; Sefton, (1987), "Implantable Pumps", *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201-240; Buchwald et al. (1980), "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis", *Surgery* 88:507-516; и Saudek et al. (1989), "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery", *N. Engl. J. Med.* 321:574-579). Согласно другому варианту осуществления полимерные материалы можно использовать для достижения контролируемого высвобождения антител (см., например, *MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);

Levy et al. (1985), "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate", *Science*, 228:190-192; During et al. (1989), "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization", *Ann. Neurol.* 25:351-356; Howard et al. (1989), "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits", *J. Neurosurg.* 7(1):105-112); патенты США № 5679377; 5916597; 5912015; 5989463; 5128326; международные патентные публикации согласно РСТ № WO 99/15154 и WO 99/20253). Примеры полимеров, используемых в составах замедленного высвобождения, включают в себя без ограничения полимер 2-гидроксиэтилметакрилата, полимер метилметакрилата, полимер акриловой кислоты, сополимер этилена и винилацетата, полимер метакриловой кислоты, полигликолиды (PLG), полиангидриды, полимер N-винилпирролидона, полимер винилового спирта, полиакриламид, полиэтиленгликоль, полилактиды (PLA), сополимер лактидов и гликолидов (PLGA) и полиортоэферы. Согласно другому варианту осуществления систему контролируемого высвобождения можно разместить вблизи к терапевтической мишени (например, легким), таким образом, будет необходима только доля системной дозы (см., например, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, р. 2, р. 115-138 (1984)). Согласно другому варианту осуществления полимерные композиции, пригодные в качестве имплантатов контролируемого высвобождения, используются согласно Dunn с соавт. (см. патент США № 5945155). Указанный конкретный способ основан на терапевтическом эффекте *in situ* контролируемого высвобождения биоактивного материала из полимерной системы. Имплантация, как правило, происходит в любом месте в организме пациента, нуждающегося в терапевтическом лечении. Согласно другому варианту осуществления используют неполимерную систему замедленной доставки, при помощи которой неполимерный имплантат в организме субъекта используется в качестве системы доставки лекарственного средства. При имплантации в организм органический растворитель имплантата будет рассеиваться, диспергироваться или выщелачиваться из композиции в окружающую тканевую жидкость, и неполимерный материал будет постепенно коагулировать или осажаться с образованием твердой, микропористой матрицы (см. патент США № 5888533).

Системы контролируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery", *Science* 249:1527-1533). Любую технику, известную специалисту в настоящей области техники, можно использовать для получения составов замедленного высвобождения, содержащих одно или несколько терапевтических средств согласно настоящему изобретению. См., например, патент США № 4526938; международные патентные публикации № WO 91/05548 и WO 96/20698; Ning et al. (1996), "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology*, 39:179-189, Song et al. (1995), "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, 50:372-397; Cleek et al. (1997), "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; и Lam et al. (1997), "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно конкретному варианту осуществления, в случае если композиция согласно настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое моновалентное диатело или биспецифическое моновалентное Fc-диатело согласно настоящему изобретению, нуклеиновая кислота может быть введена *in vivo* для стимуляции экспрессии кодируемого ею биспецифического моновалентного диатела или биспецифического моновалентного Fc диатела, путем конструирования ее в виде части соответствующего нуклеиновокислотного экспрессионного вектора и введения ее так, чтобы она стала внутриклеточной, например, путем применения ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286), или путем прямой инъекции, или путем использования бомбардировки микрочастицами (например, генной пушки; Biolistic, Dupont), или покрытия липидами, или рецепторами клеточной поверхности, или средствами трансфекции, или путем введения ее, соединенной с гомеобокс-подобным пептидом, который, как известно, проникает в ядро (см., например, Joliot et al. (1991), "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:1864-1868) и т.д. Альтернативно, нуклеиновая кислота может быть введена внутриклеточно и встроена в ДНК клетки-хозяина для экспрессии путем гомологичной рекомбинации.

Лечение субъекта с помощью терапевтически или профилактически эффективного количества grA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател или grA33 × CD3 биспецифических моновалентных Fc-диател согласно настоящему изобретению может включать в себя однократное лечение или предпочтительно может включать в себя серию лечений. Согласно предпочтительному примеру субъект получает лечение с помощью молекул согласно настоящему изобретению один раз в неделю приблизительно 1-10 недель, предпочтительно 2-8 недель, более предпочтительно приблизительно 3-7 недель и даже более предпочтительно в течение приблизительно 4, 5 или 6 недель. Согласно другим вариантам осуществления фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению вводят один раз в день, два раза в день или три раза в день. Согласно другим вариантам осуществления фармацевтические композиции вводят один раз в неделю, два раза в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, каждые шесть недель, один раз в два месяца, дважды в год или один раз в год. Также следует понимать, что эффективная дозировка молекул, используемых для лечения, может увеличиваться или уменьшаться в

течение курса конкретного лечения.

Представив описание настоящего изобретения в общих чертах, оно станет более понятным со ссылкой на следующие примеры, которые представлены для иллюстрации, и не предусмотрено, что они ограничивают настоящее изобретение, если не указано иное.

Пример 1.

Характеристики моноклонального антитела к gpA33 человека.

Мышиное моноклональное антитело, способное специфически связываться с gpA33 человека, подвергали химеризации и гуманизации. Цепи VL и VH исходного мышиного антитела характеризуются последовательностями SEQ ID NO: 13 и 17, соответственно. Цепи VL и VH гуманизованного антитела характеризуются последовательностями SEQ ID NO: 26 и 27, соответственно.

Антигенсвязывающий домен VL<sub>gpA33</sub> содержит

CDR1 с последовательностью (SEQ ID NO: 14): SARSSISFMY;

CDR2 с последовательностью (SEQ ID NO: 15): DTSNLAS и

CDR3 с последовательностью (SEQ ID NO: 16): QQWSSYPLT.

Антигенсвязывающий домен VH<sub>gpA33</sub> содержит

CDR1 с последовательностью (SEQ ID NO: 18): GSWMN;

CDR2 с последовательностью (SEQ ID NO: 19): RIYPGDGETNYNGKFKD и

CDR3 с последовательностью (SEQ ID NO: 20): IYGNNVYFDV.

В табл. 1 показан эффект таких изменений на кинетику связывания.

Таблица 1

Антитело	KD	ka	kd
Мышиное mAb 1	2,3 нМ	$3,3 \times 10^5$	$7,5 \times 10^{-4}$
Химерное mAb 1	2,4 нМ	$5,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-3}$
Гуманизованное mAb 1	3,4 нМ	$5,6 \times 10^5$	$1,9 \times 10^{-3}$

Данные показывают, что модификации, приводящие к гуманизации доменов VL и VH антитела, не оказывают существенное влияние на кинетику связывания с gpA33.

Пример 2.

Конструкция gpA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател и Fc-диател и контрольных диател.

В табл. 2 содержится перечень последовательностей полипептидных цепей предпочтительных gpA33 × CD3 диател и gpA33 × CD3 Fc-диател, которые экспресировали и очищали. Обнаружили, что диатела способны одновременно связываться с gpA33 и CD3, судя по обнаружению такого одновременного связывания иллюстративными gpA33 × CD3 биспецифическими моновалентными диателами, DART-1 и DART-2, и иллюстративным gpA33 × CD3 биспецифическим моновалентным Fc-диателом (DART-2 w/Fc). Кроме того, получили контрольное биспецифическое моновалентное диатело ("контрольное DART"), которое являлось биспецифическим моновалентным в отношении CD3 и FITC, и было обнаружено, что оно способно одновременно связываться с CD3 и FITC.

Таблица 2

Диатело	Полипептиды - заместители (в направлении от N-конца к С-концу)
gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело (DART-1)	<b>SEQ ID NO:21</b> <b>SEQ ID NO:23</b>
gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело (DART-2)	<b>SEQ ID NO:28</b> <b>SEQ ID NO:30</b>
gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело, содержащее альбуминсвязывающий домен (DART-2 w/ABD), содержит альбуминсвязывающий домен (ABD) для увеличения периода полужизни <i>in vivo</i>	<b>SEQ ID NO:35</b> <b>SEQ ID NO:30</b>
gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело, содержащее версию 1 домена Fc IgG (версия 1 DART-2 w/Fc), содержит домен Fc для увеличения периода полужизни <i>in vivo</i>	<b>SEQ ID NO:42</b> <b>SEQ ID NO:44</b> <b>SEQ ID NO:46</b>
gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело, содержащее версию 2 домена Fc IgG (версия 2 DART-2 w/Fc), содержит домен Fc для увеличения периода полужизни <i>in vivo</i>	<b>SEQ ID NO:48</b> <b>SEQ ID NO:28</b> <b>SEQ ID NO:46</b>

gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела представляют собой гетеродимеры, состоящие из двух полипептидных цепей (одна цепь каждой перечисленной последовательности), и gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела представляют собой гетеродимеры, состоящие из трех полипептидных цепей (одна цепь каждой перечисленной аминокислотной последовательности). Способы образования биспецифических моновалентных диател представлены в международных патентных публикациях № WO 2006/113665, WO 2008/157379, WO 2010/080538, WO 2012/018687, WO 2012/162068 и WO 2012/162067.

Было обнаружено, что контрольное CD3 x FITC биспецифическое моновалентное диатело способно одновременно связываться с CD3 и с FITC. Было обнаружено, что описанные выше gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела и gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc-диатела способны одновременно связываться с gpA33 и с CD3. Чтобы продемонстрировать такое одновременное связывание, gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-1 инкубировали в присутствии растворимого фрагмента CD3, который был иммобилизован на твердой подложке. Обнаружение связывания оценивали с помощью способности иммобилизованных антител дополнительно связывать gpA33. Результаты подтверждают способность описанных выше gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател и gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных Fc-диател опосредовать одновременное связывание с gpA33 и CD3 (фиг. 3)

Пример 3.

gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела являются цитотоксическими в отношении злокачественных клеток.

Способность gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател согласно настоящему изобретению лечить злокачественную опухоль проиллюстрировали путем инкубации клеток колоректального рака или клеток рака поджелудочной железы в присутствии gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного DART-1 и либо PBMC человека (E:T = 25:1), либо активированных Т-клеток человека (E:T = 10:1). gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-1 проявило сильную способность к перенаправленному цитолизу с концентрациями, требующими достижения 50% максимальной активности (EC50) в диапазоне от суб-нг/мл до приблизительно 1 нг/мл. Напротив, цитотоксичность не наблюдалась при использовании gpA33-отрицательных клеточных линий злокачественной опухоли (например, HCT116). Результаты исследования показаны на фиг. 4А (клетки колоректального рака, сходные со стволовыми (клетки Colon CSCL), На фиг. 4В (клетки колоректального рака Colo205) и на фиг. 4С (клетки рака поджелудочной железы ASPC-1). Результаты обобщенно представлены в табл. 3.

Таблица 3

Целевая клеточная линия	EC50 gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела (нг/мл)	Эффектор:мишень (E:T)	Максимальный наблюдаемый цитолиз в %
Colon CSLC	0,9015	25:1	38
Colo205	0,5853	10:1	35
ASPC-1	1,142	10:1	25

Пример 4.

Т-клеточная активация в присутствии gpA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател.

Для того чтобы дополнительно показать способность диател согласно настоящему изобретению лечить злокачественную опухоль, дремлющие Т-клетки человека инкубировали с gpA33 × CD3 биспецифическими моновалентными DART-1 в присутствии или при отсутствии злокачественных клеток (colo205 или ASPC-1). Для получения характеристик Т-клеточной активации во время опосредованного gpA33 × CD3 биспецифическим моновалентным диателом (DART-1) процесса перенаправленного цитолиза, Т-клетки из анализов перенаправленного цитолиза окрашивали в отношении маркера Т-клеточной активации CD25 и анализировали с помощью FACS. CD25 подвергался положительной регуляции в CD8 (фиг. 5A, 5B) и CD4 (фиг. 5D, 5E) Т-клетках зависимым от дозы образом, указывая на то, что gpA33 × CD3 биспецифические моновалентные диатела индуцировали Т-клеточную активацию в процессе перенаправленного цитолиза. Напротив, при отсутствии клеток-мишеней не наблюдалась активация CD8 (фиг. 5C) или CD4 (фиг. 5F) Т-клеток, что указывает на то, что gp-A33 × CD3 диатела не активируют Т-клетки при отсутствии клеток-мишеней. Аналогично, CD8 или CD4 Т-клетки не были активированы при инкубации с клетками-мишенями и контрольным биспецифическим моновалентным диателом (контрольным DART) (фиг. 5A, 5B и 5D-5F соответственно), что указывает на необходимость перекрестной сшивки Т-клетки и клетки - мишени с gpA33 × CD3 биспецифическими моновалентными диателами.

Пример 5.

Эквивалентность gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-1), характеризующегося последовательностями мышиного переменного домена антитела к gpA33 человека, и gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-2), характеризующегося последовательностями гуманизированного переменного домена антитела к gpA33 человека

Как обсуждалось выше, gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-1 содержит домены VL<sub>gpA33</sub> и VH<sub>gpA33</sub> мышиного моноклонального антитела, тогда как gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-2 содержит гуманизированный домен VL<sub>gpA33</sub> и гуманизированный домен VH<sub>gpA33</sub> того же мышиного антитела. Чтобы продемонстрировать способность гуманизированных доменов VL<sub>gpA33</sub> и VH<sub>gpA33</sub> стимулировать нацеливание Т-клеток на экспрессирующие gpA33 злокачественные клетки, злокачественные клетки, которые экспрессируют gpA33, инкубировали в присутствии дремлющих Т-клеток (анализ LDH; E:T = 10:1) в присутствии либо DART-1, DART-1, либо контрольного биспецифического моновалентного диатела (контрольного DART). Результаты настоящего анализа (показанного на фиг. 6A-6D) показали, что DART-1 и DART-2 опосредовали эквивалентную цитотоксичность в отношении клеток колоректальной аденокарциномы SW948 (фиг. 6A) и клеток colo205 (фиг. 6B). Как DART-1, так и DART-2 опосредовали цитотоксичность экспрессирующей люциферазу клеточной линии Colo205, которая была стабильно трансфектирована с геном люциферазы светлячка (luc2) (Colo205-Luc), что измеряли по сниженной люминесценции (фиг. 6C). Ни DART-1, ни DART-2 не опосредовали цитотоксичность gpA33-отрицательной клеточной линии злокачественной опухоли, HCT116 (фиг. 6D). Как показано в табл. 4, DART-1 и DART-2 проявили сходную эквивалентную биоактивность против множественных опухолевых клеточных линий.

Таблица 4

Эффектор/мишень		Анализ LDH		Люциферазный анализ	
Донорная Т-клетка	Опухолевая клеточная линия	gpA33xCD3 DART-2	gpA33xCD3 DART 1	gpA33xCD3 DART-2	gpA33xCD3 DART 1
D54677	SW948	0,79	1,34		
D54677	Colo205	1,17	2,52		
D51031	Colo205-Luc	2,29	3,53	2,53	4,55
D41440	Colo205	2,29	3,37		
D41440	Colo205-Luc	2,80	4,26	2,57	3,26

Пример 6.

Перекрестная реактивность grA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател, grA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател, содержащих альбуминсвязывающий домен, и grA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател, содержащих домен Fc IgG, с РВМС яванского макака.

Как показано выше, гуманизированный домен VL<sub>grA33</sub> и гуманизированный домен VH<sub>grA33</sub> grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела DART-2 опосредуют цитотоксичность grA33-экспрессирующих злокачественных клеток в присутствии Т-клеток человека. Неожиданно обнаружили, что домены VL<sub>CD3</sub> и VH<sub>CD3</sub> grA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател согласно настоящему изобретению также способны связываться с CD3 Т-клеток яванского макака и перенаправлять указанные клетки на уничтожение экспрессирующих grA33 клеток.

Как показано на фиг. 7А-7Д, было обнаружено, что все из grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела DART-2, grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего альбуминсвязывающий домен (DART-2 w/ABD), и grA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела DART-2, содержащего домен Fc IgG (DART-2 w/Fc) были способны стимулировать цитотоксичность злокачественных клеток в присутствии РВМС человека или яванского макака. На фиг. 7А, 7В показана способность трех диател опосредовать цитотоксичность клеток Colo205-Лус, которые инкубировали с РВМС человека, которую измеряли с помощью анализа LDH (фиг. 7А) или люциферазного анализа (фиг. 7В). На фиг. 7С, 7Д показана соответствующая способность трех диател опосредовать цитотоксичность клеток Colo205-Лус, которые инкубировали с РВМС яванского макака, которую измеряли с помощью анализа LDH (фиг. 7А) или люциферазного анализа (фиг. 7В).

Как показано в табл. 5, grA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-2 и grA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело, содержащее альбуминсвязывающий домен (DART-2 w/ABD), проявляли сопоставимую CTL -активность. Биспецифические моновалентные диатела проявили сходную активность в отношении эффекторных клеток РВМС как человека, так и яванского макака (супо).

Таблица 5

DART	ЕС50 – CTL активность (нг/мл) Клетки - мишени Colo205			
	Анализ LDH		Люциферазный анализ	
	РВМС человека	РВМС супо	РВМС человека	РВМС супо
grA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело (DART-2)	4,09	3,81	2,73	1,55
grA33 × CD3 биспецифическое диатело, содержащее альбуминсвязывающий домен (DART-2 w/ABD)	5,52	4,63	3,07	1,63

Пример 7.

In vivo реактивность grA33 × CD3 диатела в мышинной модели опухоли толстой кишки.

Чтобы продемонстрировать in vivo способность grA33 × CD3 диател согласно настоящему изобретению обеспечивать лечение злокачественной опухоли, клетки colo205 имплантировали совместно с активированными Т-клетками в страдающих диабетом без ожирения с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью мышей (Agliaño, A. et al. (2008), "Human Acute Leukemia Cells Injected In NOD/Ltsz-Scid/IL-2Rgamma Null Mice Generate A Faster And More Efficient Disease Compared To Other NOD/Scid-Related Strains", Int. J. Cancer, 123(9):2222-2227; Sanchez, P.V. et al. (2009), "A Robust Xenotransplantation Model For Acute Myeloid Leukemia", Leukemia, 23(11):2109-2117; Racki, W.J. et al. (2010), "NOD-Scid IL2rgamma(Null) Mouse Model Of Human Skin Transplantation And Allograft Rejection", Transplantation, 89(5):527-536; Choi, B. et al. (2011), "Human B Cell Development And Antibody Production In Humanized NOD/SCID/IL-2Rγ(Null) (NSG) Mice Conditioned By Busulfan", J. Clin. Immunol. 31(2):253-264; Sartelet, H. et al. (2012), "Description Of A New Xenograft Model Of Metastatic Neuroblastoma Using NOD/SCID/Il2rg Null (NSG) Mice", In Vivo, 26(1):19-29; Spranger, S. et al. (2012), "NOD/scid IL-2Rg(null) Mice: A Preclinical Model System To Evaluate Human Dendritic Cell-Based Vaccine Strategies in vivo", J. Transl. Med. 10:30; von Bonin, M. et al. (2013), "in vivo Expansion Of Co-Transplanted T Cells Impacts On Tumor Re-Initiating Activity Of Human Acute Myeloid Leukemia In NSG Mice", PLoS One. 8(4):e60680).

grA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-1 вводили внутривенно мышам один раз в день в течение 4 дней (QD×4), начиная со дня имплантации. Обнаружили, что объем опухоли Colo205 увеличился у мышей, получающих контроль - инертный носитель (фиг. 8). Тем не менее, обна-

ружили, что животные, получающие DART-1, проявляли пониженный объем опухоли Colo205 или ее отсутствие (фиг. 8).

Изображение мышей NSG, которым имплантировали клетки Colo205, показало, что на 2 день лечения мыши, получающие инертный носитель (фиг. 9A) или gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-1 (фиг. 9B), характеризовались наличием значительных опухолей. Тем не менее, на 12 день лечения мыши, получающие gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-1, характеризовались резко уменьшенными объемами опухолей (фиг. 9D). На 12 день лечения мыши, получающие инертный носитель, продемонстрировали увеличенный объем опухоли (фиг. 9C).

В качестве дополнительного доказательства *in vivo* способности gpA33 × CD3 диател согласно настоящему изобретению обеспечивать лечение злокачественной опухоли, описанную выше модель опухоли проводили с использованием клеток опухоли поджелудочной железы ASPC-1 и активированных Т-клеток человека (Е:Т = 1:1). gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-1, контрольное биспецифическое моновалентное диатело (контрольное DART) или инертный носитель вводили внутривенно один раз в день в течение 9 дней (QD×9), начиная со дня имплантации. Обнаружили, что объем опухоли ASPC-1 увеличивался у мышей, получающих контроль - инертный носитель (фиг. 10). Тем не менее, обнаружили, что животные, получающие DART-1, проявляли уменьшенный объем опухоли, зависимым от дозы образом (фиг. 10).

Пример 8.

Определение эффективности версии 1 gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc IgG (версии 1 DART-2 w/Fc).

Для определения эффективности версии 1 gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc IgG (версии 1 DART-2 w/Fc), мышам проводили инфузию (с использованием осмотических насосов) в течение 7 дней с описанной выше версией 1 DART-2 w/Fc при различных уровнях дозирования. Через 48 ч после имплантации насоса (т.е. в присутствии устойчивого уровня циркулирующей в крови версии 1 DART-2 w/Fc), смесь опухолевых клеток Colo205 и Т-клеток имплантировали подкожно в организм мышей и осуществляли мониторинг степени роста опухоли. В табл. 6 обобщенно представлена схема исследования; каждая группа содержала по 8 самок мышей.

Таблица 6

Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	Путь / Схема	Клеточный(е) имплантат(ы)
1	Инертный носитель	0	IV/QDx5	COLO205 (5E6)
2	gpA33xCD3 биспецифическое моновалентное диатело, содержащее домен Fc IgG (версия 1 DART-2 w/Fc)	3,1	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
3	Версия 1 DART-2 w/Fc	1,5	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
4	Версия 1 DART-2 w/Fc	0,75	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
5	Версия 1 DART-2 w/Fc	0,375	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
6	Версия 1 DART-2 w/Fc	0,5	IV/QDx5	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)

Результаты настоящего исследования показаны на фиг. 11 и указывают на то, что введение описанных выше gpA33 × CD3 биспецифических моновалентных диател, содержащих домен Fc IgG (версии 1 DART-2 w/Fc), опосредовало резкое снижение объема опухоли во всех исследованных дозировках.

В свете резкого снижения объема опухоли, полученного в представленном выше исследовании, провели дополнительное исследование для оценки эффективности в намного меньших дозах. В табл. 7 обобщенно представлена схема этого дополнительного исследования; каждая группа содержала по 8 самок мышей.

Таблица 7

Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	Путь / Схема	Клеточный(е) имплантат(ы)
1	Инертный носитель	0	IV/QDx5	COLO205 (5E6)
2	gpA33xCD3 биспецифическое Моновалентное диатело, содержащее домен Fc IgG (версия 1 DART-2 w/Fc)	0,2	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
3	Версия 1 DART-2 w/Fc	0,04	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
4	Версия 1 DART-2 w/Fc	0,008	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
5	Версия 1 DART-2 w/Fc	0,0016	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
6	Версия 1 DART-2 w/Fc	0,5	IV/QDx5	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)

Результаты этого дополнительного исследования показаны на фиг. 12, на которой каждый символ обозначает животное, которое получило указанную дозировку описанного выше gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc IgG (версии 1 DART-2 w/Fc), или инертного носителя. Данные показывают эффективность во всех исследованных дозировках.

Пример 9.

Фармакокинетический профиль gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-2) и gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc IgG (DART-2 w/Fc), у яванского макака.

Способность доменов VL<sub>CD3</sub> и VH<sub>CD3</sub> диател согласно настоящему изобретению связываться с CD3 яванского макака обеспечивает возможность применения этих животных для измерения *in vivo* фармакокинетики диател согласно настоящему изобретению.

Для измерения таких фармакокинетических параметров описанное выше gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело (DART-2) или gpA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело, содержащее домен Fc IgG (версия 1 DART-2 w/Fc) вводили с помощью инъекции яванским макакам (10 мкг/кг/день) и подвергали мониторингу концентрацию таких молекул, оставшихся в кровотоке. На фиг. 13 показан результат этого исследования и указано, что DART-2 и версия 1 DART-2 w/Fc проявляют кинетику выведения первого порядка.

Пример 10.

Анализ SPR связывания gpA33 × CD3 биспецифического моновалентного Fc-диатела (версии 1 DART-1 w/Fc) с CD3 и gpA33 человека и яванского макака.

Связывание gpA33 × CD3 биспецифического Fc-диатела (версии 1 DART-2 w/Fc) с растворимыми версиями рецептора CD3 человека и яванского макака анализировали с помощью SPR на биосенсоре BIACore 3000 (GE, Healthcare). Рецепторы иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 согласно процедуре, рекомендуемой производителем. Кратко, карбоксильные группы на поверхности сенсорного чипа активировали инъекцией раствора, содержащего 0,2 М N-этил-N-(3-диэтиламинопропил)карбодиимида и 0,05 М N-гидрокси-сукцинимид. Рецептор растворимого CD3 (1 мкг/мл) затем впрыскивали на активированную поверхность CM5 в 10 mM ацетата натрия, pH 5,0, с объемной скоростью потока, составляющей 5 мкл/мин, с последующим добавлением 1 М этаноламина для деактивации.

Растворимые версии CD3 яванского макака и человека, используемые в таком анализе, экспрессировали в клетках млекопитающих в виде CD3ε/CD3δ гетеродимера, стабилизированного противоположно заряженными стимулирующими образование гетеродимера E-спиральными и K-спиральными последовательностями на их C-концах. Растворимый CD3ε яванского макака содержал первые 118 аминокислотных остатков CD3ε яванского макака с аллелем V35 (FN18+), за которым следовал описанный выше E-спиральный домен (SEQ ID NO: 3) на карбокси-конце. Аминокислотная последовательность аллеля

V35 (FN18+) CD3ε яванского макака представляет собой следующее (SEQ ID NO: 49):

MQSGTRWRVL GLCLLSIGVW GQDGNEEMGS ITQTPYQVSI SGTTVILTCS  
 QHLGSEAQWQ HNGKNKEDSG DRLFLPEFSE MEQSGYYVCY PRGSNPEDAS  
 HHLYLKARVC ENCMEMDVMA VATIVIVDIC ITLGLLLLVI YWSKNRKAKA  
 KPVTRGAGAG GRQRGQNKER PPPVNPDPYE PIRKGGQDLY SGLNQRR I

Растворимый CD3δ яванского макака содержал первые 101 аминокислотный остаток CD3δ яванского макака, за которым следовал описанный выше К-спиральный домен (SEQ ID NO: 4) на карбокси-конце. Аминокислотная последовательность CD3δ яванского макака представляет собой следующее (SEQ ID NO: 50):

MEHSTFLSGL VLATLLSQVS PFKIPVEELE DRVFKCNTS VTWVEGTVGT  
 LLTNTRLDL GKRIIDPRGI YRCNGTDIYK DKESAVQVHY RMCQNCVELD  
 PATLAGIIVT DVIATLLAL GVFCFAGHET GRLSGAADTQ ALLRNDQVYQ  
 PLRDRDDAQY SRLGGNWARN K

Два белка коэкспрессировали в клетках CHO-S млекопитающего и очищали с использованием mAb к E/K-спирали, прикрепленном к SEPHAROSE®.

Растворимый CD3ε человек содержал остатки 1-127 CD3ε человека с C119S и C122S, за которыми следовал описанный выше E-спиральный домен (SEQ ID NO: 3) на карбокси-конце. Аминокислотная последовательность CD3ε человека представляет собой следующее (SEQ ID NO: 51):

MQSGTHWRVL GLCLLSVGVW GQDGNEEMGG ITQTPYKVI SGTTVILTCP  
 QYPGSEILWQ HNDKNIGGDE DDKNIGSDED HLSLKEFSEL EQSGYYVCYP  
 RGSKPEDANF YLYLRARVCE NCMEMDVMSV ATIVIVDICI TGGLLLLVIY  
 WSKNRKAKAK PVTRGAGAGG RQRGQNKERP PPVNPDPYEP IRKGGQDLYS  
 GLNQRR I

Растворимый CD3δ человека содержал остатки 1-101 CD3δ человека, за которыми следовал описанный выше К-спиральный домен (SEQ ID NO: 4) на карбокси-конце. Два белка коэкспрессировали в клетках CHO-S млекопитающего и очищали с использованием с использованием аффинной колонки к E/K-спирали. Аминокислотная последовательность CD3δ человека представляет собой следующее (SEQ ID NO: 52):

FKIPIEELE DRVFNVCNTS ITWVEGTVGT LLSIDITRLDL GKRIIDPRGI  
 YRCNGTDIYK DKESTVQVHY RMCQSCVELD PATVAGIIVT DVIATLLAL  
 GVFCFAGHET GRLSGAADTQ ALLRNDQVYQ PLRDRDDAQY SHLGGNWARN K

Растворимый gpA33 человека содержал остатки 1-235 gpA33 человека с (SEQ ID NO: 53) повторами ННННН ("6His") на карбокси-конце. Растворимый gpA33 яванского макака содержал остатки 1-314 gpA33 яванского макака от Met 1 до Gln 314 с 6 His повторами на карбокси-конце. Белки экспрессировали в клетках CHO-S млекопитающего и очищали с использованием Ni SEPHAROSE®.

Эксперименты по связыванию проводили в буфере HBS-EP, который содержит 10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,005% поверхностно-активное вещество P20. Связывание версии 1 DART-2 w/Fc анализировали (в двух параллелях) в концентрациях, составляющих 0, 6,25, 12,5, 25, 50 и 100 нМ, впрыскиваемых в течение 120 с с объемной скоростью потока, составляющей 30 мкл/мин.

Восстановление поверхности иммобилизованного рецептора проводили путем импульсной инъекции 10 mM глицина, pH 1,5. Стандартные кривые получали путем впрыскивания каждого разведения DART-2 w/Fc на обработанную поверхность без иммобилизованного белка. Кривые связывания в нулевой концентрации вычитали как фон. Данные KD определяли путем глобальной аппроксимации кривых связывания с моделью связывания 1:1 Ленгмюра (программное обеспечение BIAevaluation™ v4.1).

Анализ SPR связывания gpA33 × CD3 биспецифического Fc-диатела (версии 1 DART-2 w/Fc) с CD3 и gpA33 человека и яванского макака продемонстрировал существенное сходство молекул из двух различных видов (фиг. 14A, 14B; фиг. 15A, 15B). В табл. 8 представлены равновесные константы диссоциации (KD), рассчитанные путем глобальной аппроксимации к константам аффинности и кинетическим константам 1:1 модели Ленгмюра для взаимодействий DART-2 w/Fc. Значения KD версии 1 DART-2 w/Fc для CD3 человека и яванского макака являются почти идентичными при 23 и 26 нМ соответственно, несмотря на некоторое различие в реакциях максимального связывания между двумя антигенами. Случайная ориентация антигенов с различными аминокислотными последовательностями, непосредственно иммобилизованными на поверхности, может привести к различным плотностям доступных сайтов связывания на поверхности. Значения KD для взаимодействия версии 1 DART-2 w/Fc с gpA33 человека и обезьяны представляют собой 2,2 и 12 нМ соответственно (табл. 8). Различие в аффинности является результатом небольшого снижения константы скорости ассоциации и увеличения константы скорости диссоциации для взаимодействия версии 1 DART-2 w/Fc с gpA33 яванского макака (табл. 8). Данные представляют собой средние значения от трех независимых экспериментов в двух параллелях (SD = стандартное отклонение; h, человек; суно, яванский макак).

Таблица 8

Равновесные константы диссоциации (KD) для связывания версии 1 DART-2 W/Fc с антигенами из различных видов

Антигены	$K_a (\pm SD)$ ( $M^{-1}c^{-1}$ )	$k_d (\pm SD)$ ( $c^{-1}$ )	$K_D (\pm SD)$ ( $nM$ )
hCD3 $\epsilon/\delta$	$1,5(\pm 0,1) \times 10^5$	$3,5(\pm 0,06) \times 10^{-3}$	$23 \pm 2,0$
cytoCD3 $\epsilon/\delta$	$1,3(\pm 0,02) \times 10^5$	$3,4(\pm 0,02) \times 10^{-3}$	$26 \pm 0,6$
hgpA33-His	$4,2(\pm 0,3) \times 10^5$	$9,0(\pm 0,5) \times 10^{-4}$	$2,2 \pm 0,2$
cytogpA33-His	$2,3(\pm 0,2) \times 10^5$	$2,8(\pm 0,1) \times 10^{-3}$	$12 \pm 1,0$

Все упомянутые в настоящем описании изобретения публикации и патенты включены в настоящий документ в той же степени, как если бы было предусмотрено, что каждая отдельная публикация или патентная заявка специально и индивидуально включена посредством ссылки во всей своей полноте. Наряду с тем, что настоящее изобретение было описано с использованием конкретных его вариантов осуществления, следует понимать, что возможны дополнительные модификации, и предусмотрено, что настоящий документ охватывает любые изменения, применения или адаптации настоящего изобретения, следуя в целом принципам настоящего изобретения и включая в себя такие отклонения от настоящего раскрытия, которые согласуются с известной или общепринятой практикой в настоящей области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение, и которые могут быть применены к основным признакам, изложенным выше в настоящем документе.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое моновалентное диатело, способное специфично связываться с эпитопом гликопротеина A33 (gpA33) и с эпитопом CD3, содержащее первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, причем указанная первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и при этом:

А) первая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:

i) домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 5); и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 27); причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO: 1);

ii) домен 2, представляющий собой K-спиральный домен (SEQ ID NO: 4) или E-спиральный домен (SEQ ID NO: 3), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (SEQ ID NO: 2);

В) вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:

i) домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 26), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 25), причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO: 1);

ii) домен 2, представляющий собой E-спиральный домен (SEQ ID NO: 3) или K-спиральный домен (SEQ ID NO: 4), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (SEQ ID NO: 2); и причем указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи не представляют собой оба E-спиральных домена или оба K-спиральных домена; и при этом:

(а) указанный домен VL указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VH указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфично связываться с эпитопом CD3; и

(b) указанный домен VH указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VL указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфично связываться с эпитопом gpA33.

2. Биспецифическое моновалентное диатело по п.1, в котором указанная первая полипептидная цепь содержит альбуминсвязывающий домен (SEQ ID NO: 34), причем указанный альбуминсвязывающий домен расположен на C-конце по отношению к указанному домену 2 и отделен от указанного домена 2 линкером 3 (SEQ ID NO: 32).

3. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело, способное специфично связываться с эпитопом гликопротеина A33 (gpA33) и с эпитопом CD3 и содержит домен Fc IgG, содержащее первую полипептидную цепь, вторую полипептидную цепь и третью полипептидную цепь, причем указанная первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом и указанная первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и при этом:

А) первая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:

i) домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 26), и субдомен (1B), который содержит домен

VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 25), причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO: 1);

ii) домен 2, представляющий собой E-спиральный домен (SEQ ID NO: 3) или K-спиральный домен (SEQ ID NO: 4), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (SEQ ID NO: 2); и

iii) домен 3, содержащий субдомен (3A), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (SEQ ID NO: 39), и субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, имеющую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG; причем указанные домены 3 и 2 отделены друг от друга спейсерным пептидом, характеризующимся последовательностью GGG (линкер 5);

В) вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:

i) домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 5), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 27); причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO: 1);

ii) домен 2, представляющий собой K-спиральный домен (SEQ ID NO: 4) или E-спиральный домен (SEQ ID NO: 3), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (SEQ ID NO: 2); и причем указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи не представляют собой оба E-спиральных домена или оба K-спиральных домена; и

С) третья полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу домен 3, содержащий:

(1) субдомен (3A), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (SEQ ID NO: 39); и

(2) субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, имеющую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG;

и при этом:

(a) указанные полипептидные части доменов Fc IgG указанных первой и третьей полипептидной цепей образуют указанный домен Fc IgG;

(b) указанный домен VL указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VH указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфично связываться с эпитопом gpA33; и

(c) указанный домен VH указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VL указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфично связываться с эпитопом CD3.

4. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело, способное специфично связываться с эпитопом гликопротеина A33 (gpA33) и с эпитопом CD3 и содержит домен Fc IgG, содержащее первую полипептидную цепь, вторую полипептидную цепь и третью полипептидную цепь, причем указанная первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом и указанные первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и при этом:

А) первая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:

i) домен 3, содержащий субдомен (3A), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (SEQ ID NO: 39), и субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, имеющую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG;

ii) домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 26), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 25), причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO: 1);

причем указанные домены 1 и 3 отделены друг от друга спейсерным пептидом (линкер 4) (SEQ ID NO: 38);

iii) домен 2, представляющий собой E-спиральный домен (SEQ ID NO: 3) или K-спиральный домен (SEQ ID NO: 4), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (SEQ ID NO: 2); и

В) вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:

i) домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 5), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 27); причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO: 1);

ii) домен 2, представляющий собой K-спиральный домен (SEQ ID NO: 4) или E-спиральный домен (SEQ ID NO: 3), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (SEQ ID NO: 2); и причем указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи не представляют собой оба E-спиральных домена или оба K-спиральных домена; и

С) третья полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу домен 3, содержащий:

(1) субдомен (3A), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (SEQ ID NO: 39); и

(2) субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, имеющую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG;

и при этом:

(a) указанные полипептидные части доменов Fc IgG указанных первой и третьей полипептидной цепей образуют указанный домен Fc IgG;

(b) указанный домен VL указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VH указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфично связываться с эпитопом grA33; и

(c) указанный домен VH указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VL указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфично связываться с эпитопом CD3.

5. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело по любому из пп.3, 4, в котором указанный субдомен (3B) указанной первой полипептидной цепи содержит последовательность, отличную от последовательности указанного субдомена (3B) указанной третьей полипептидной цепи.

6. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело по п.5, в котором указанный субдомен (3B) указанной первой полипептидной цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 и указанный субдомен (3B) указанной третьей полипептидной цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

7. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело по п.5, в котором указанный субдомен (3B) указанной первой полипептидной цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 и указанный субдомен (3B) указанной третьей полипептидной цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

8. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело по любому из пп.3-7, в котором указанный домен 3 указанной первой полипептидной цепи и/или указанный домен 3 указанной третьей полипептидной цепи содержит вариантную последовательность CH2-CH3 относительно последовательности CH2-CH3 области Fc дикого типа, которая проявляет сниженное связывание с рецептором Fcγ относительно связывания, проявляемого указанной областью Fc дикого типа.

9. Биспецифическое моновалентное диатело по любому из пп.1, 2 или биспецифическое моновалентное Fc-диатело по любому из пп.3-8, в котором указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи содержит E-спираль (SEQ ID NO: 3) и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи содержит K-спираль (SEQ ID NO: 4).

10. Биспецифическое моновалентное диатело по любому из пп.1, 2 или биспецифическое моновалентное Fc-диатело по любому из пп.3-8, в котором указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи содержит K-спираль (SEQ ID NO: 4) и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи содержит E-спираль (SEQ ID NO: 3).

11. Биспецифическое моновалентное диатело, способное специфично связываться с эпитопом CD3 и с эпитопом гликопротеина A33 (grA33), содержащее:

(1) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; или

(2) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;

причем указанная первая и указанная вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом дисульфидной связью.

12. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело, способное специфично связываться с эпитопом CD3 и с эпитопом гликопротеина A33 (grA33) и содержит домен Fc IgG, содержащее:

(1) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и третью полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; или

(2) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и третью полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46;

причем указанная первая и указанная вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом первой дисульфидной связью и указанная первая и указанная третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом второй дисульфидной связью.

13. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественной опухоли, характеризующейся экспрессией grA33, содержащая биспецифическое моновалентное диатело по любому из пп.1, 2 или 9-11 или биспецифическое моновалентное Fc-диатело по любому из пп.3-10 или 12; и физиологически приемлемый носитель.

14. Применение биспецифического моновалентного диатела по любому из пп.1, 2 или 9, 10 в лечении злокачественной опухоли, характеризующейся экспрессией grA33.

15. Применение биспецифического моновалентного диатела по п.11 в лечении злокачественной опухоли, характеризующейся экспрессией grA33.

16. Применение биспецифического моновалентного Fc-диатела по любому из пп.3-10 в лечении злокачественной опухоли, характеризующейся экспрессией grA33.

17. Применение биспецифического моновалентного Fc-диатела по п.12 в лечении злокачественной опухоли, характеризующейся экспрессией grA33.

18. Применение фармацевтической композиции по п.13 в лечении злокачественной опухоли, характеризующейся экспрессией grA33.

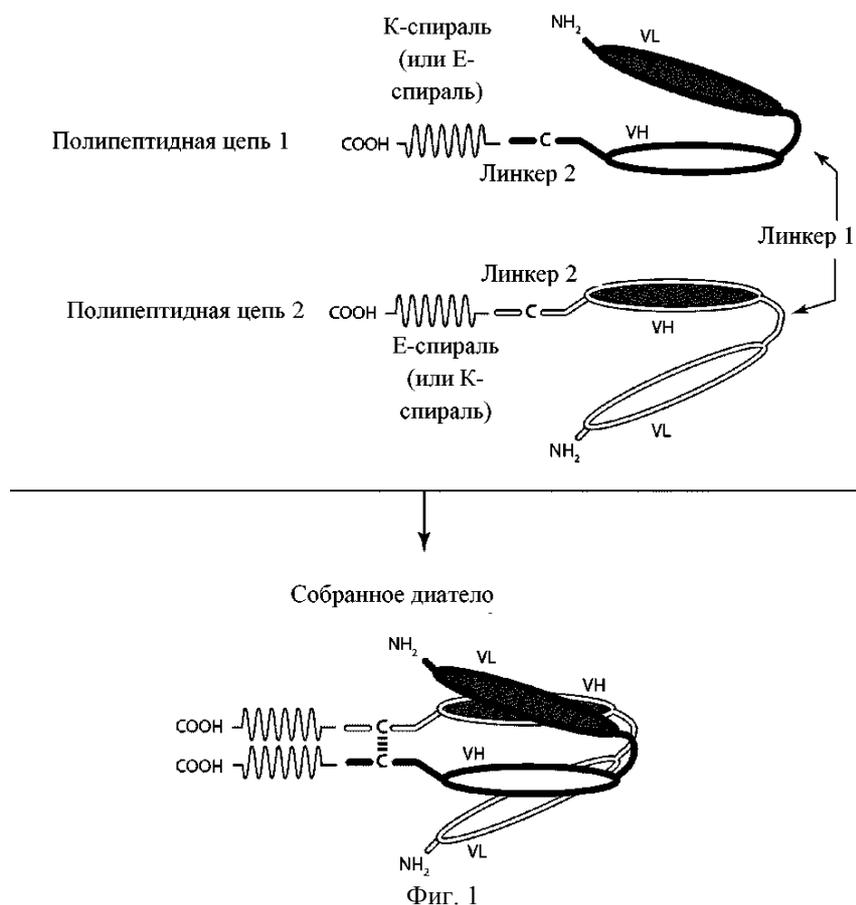
19. Применение по любому из пп.14-18, где указанная злокачественная опухоль представляет собой колоректальный рак, рак толстой кишки, рак желудка или рак поджелудочной железы.

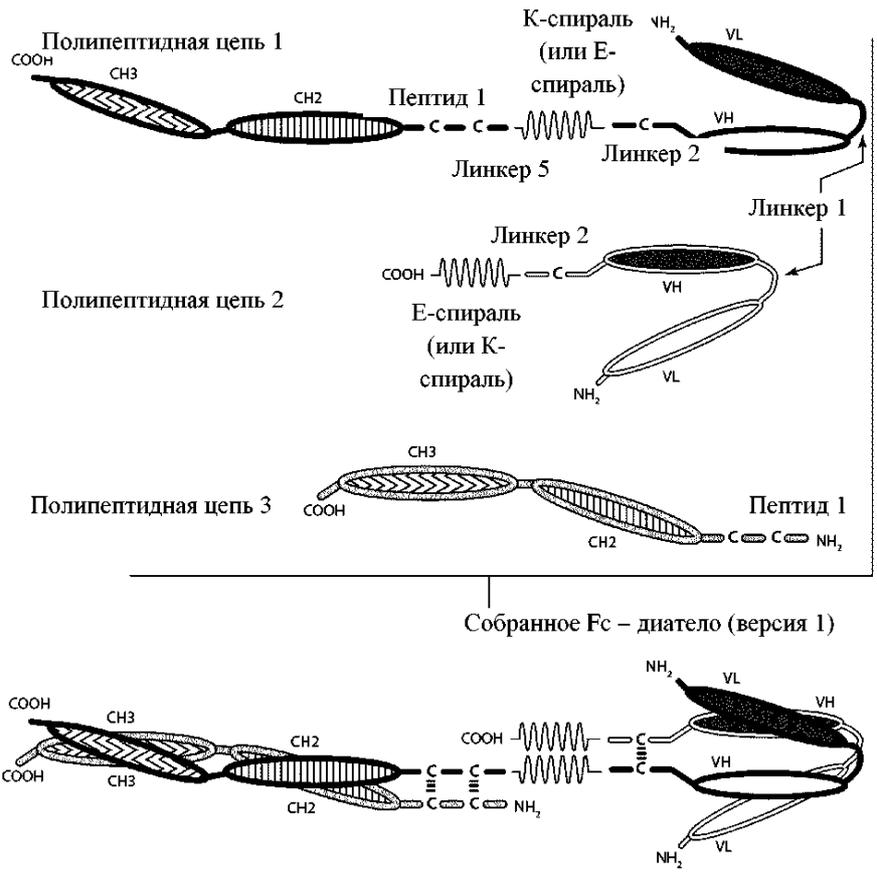
20. Полинуклеотид, который кодирует указанную первую полипептидную цепь биспецифического моновалентного диатела по любому из пп.1, 2 или 9-11.

21. Полинуклеотид, который кодирует указанную вторую полипептидную цепь биспецифического моновалентного диатела по любому из пп.1, 2 или 9-11.

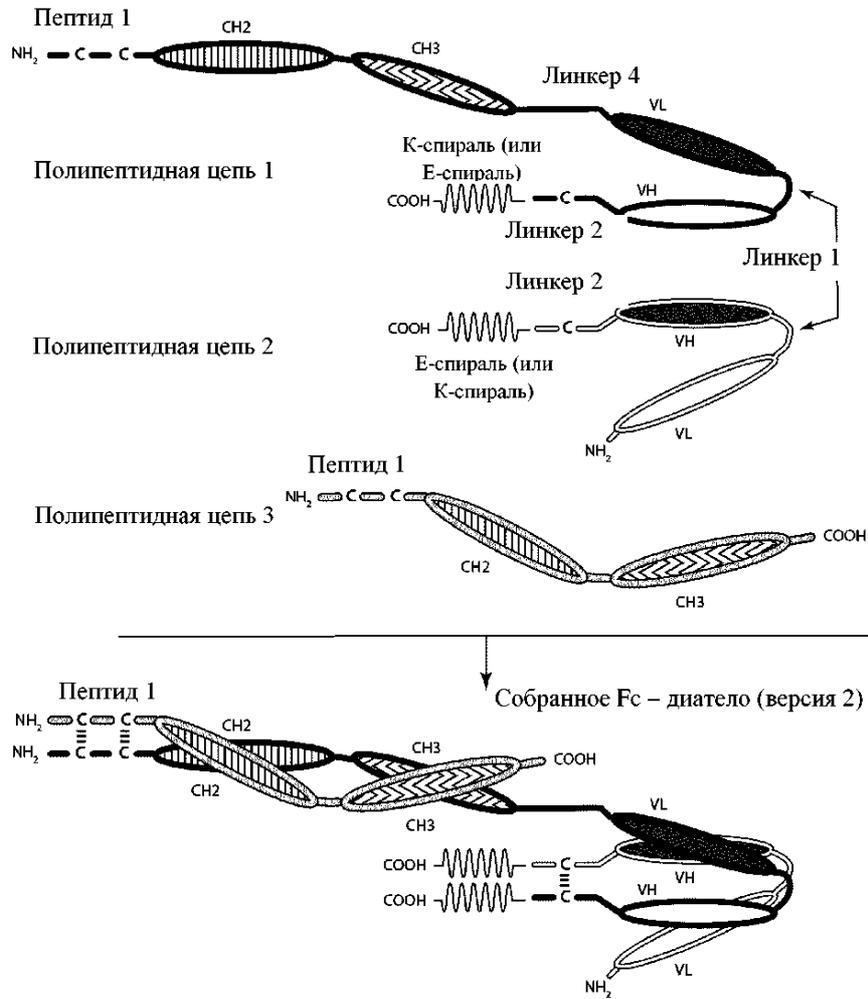
22. Полинуклеотид, который кодирует указанную первую полипептидную цепь биспецифического моновалентного Fc-диатела по любому из пп.3-10 или 12.

23. Полинуклеотид, который кодирует указанную вторую полипептидную цепь биспецифического моновалентного Fc-диатела по любому из пп.3-10 или 12.



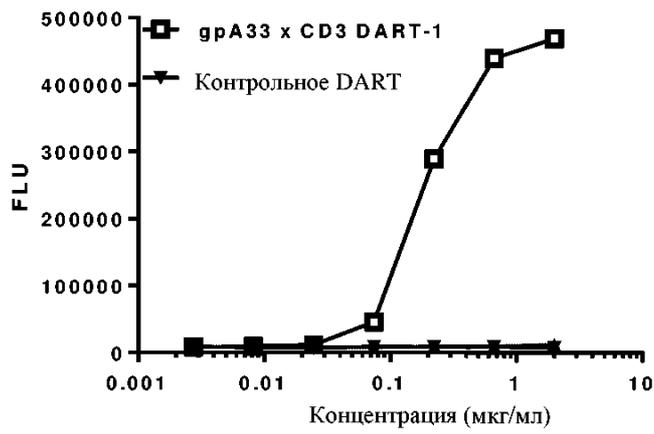


Фиг. 2А



Фиг. 2В

Захват shCD3/обнаружение grA33



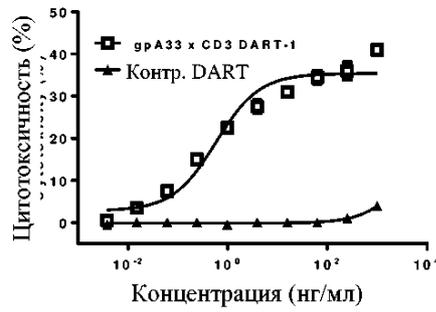
Фиг. 3

Клетки CSLC толстой кишки  
PBMC человека – E:E=25:1



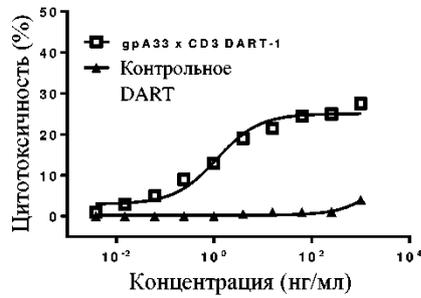
Фиг. 4А

Клетки колоректального рака Colo205  
Активированные Т-клетки – E:E=10:1



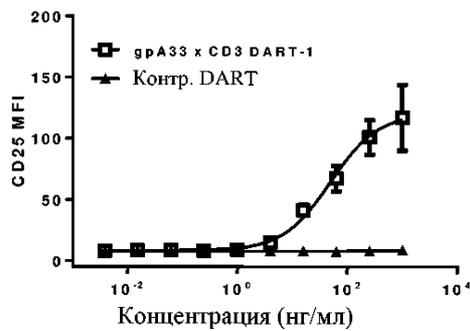
Фиг. 4В

Клетки рака поджелудочной железы ASPC  
Активированные Т-клетки – E:E=10:1



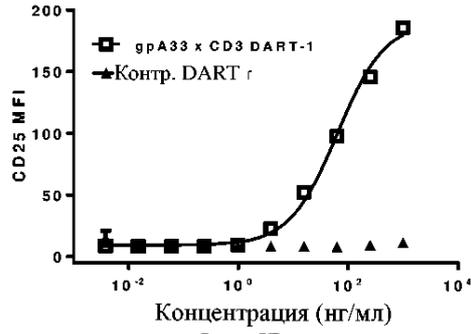
Фиг. 4С

Colo205 + CD8 Т-клетки



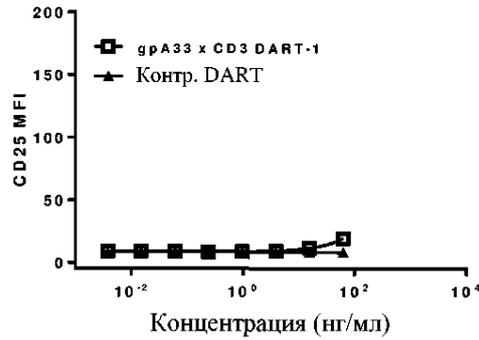
Фиг. 5А

**ASPC-1 + CD8 T-клетки**



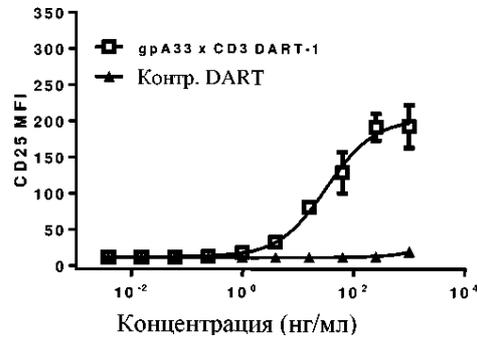
Фиг. 5B

**CD8 T-клетки отдельно**



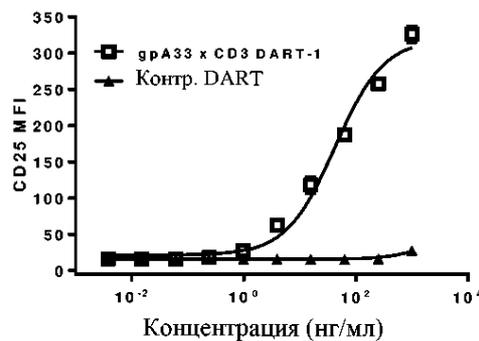
Фиг. 5C

**Colo205 + CD4 T-клетки**



Фиг. 5D

**ASPC-1 + CD4 T-клетки**



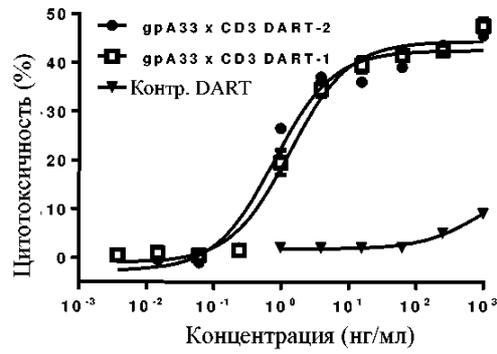
Фиг. 5E

CD4 T-клетки отдельно



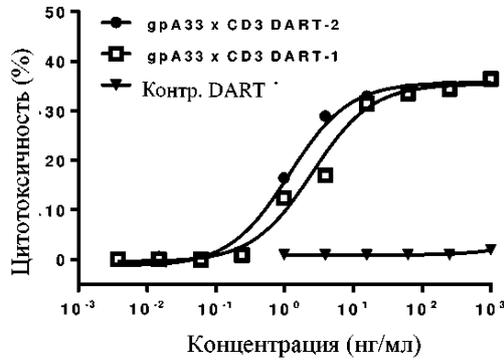
Фиг. 5F

SW 948 + дремлющие T-клетки (LDH) E:T=10:1



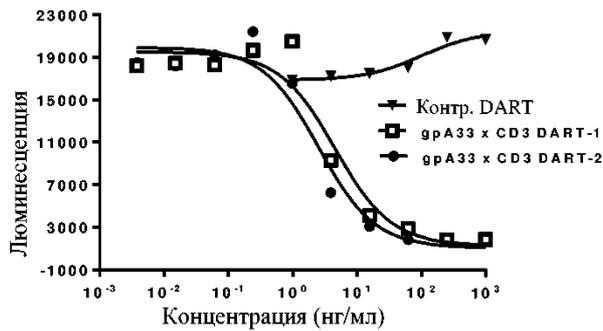
Фиг. 6A

Colo205 + дремлющие T-клетки (LDH) E:T=10:1



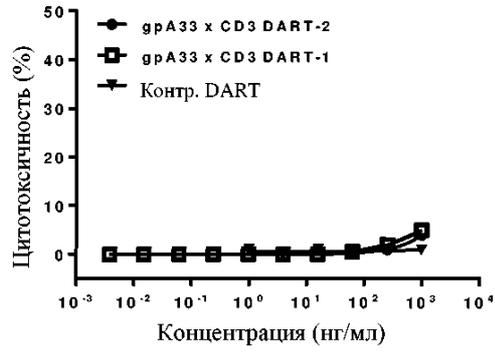
Фиг. 6B

Colo205-Luc + дремлющие T-клетки (LUM) E:T=10:1



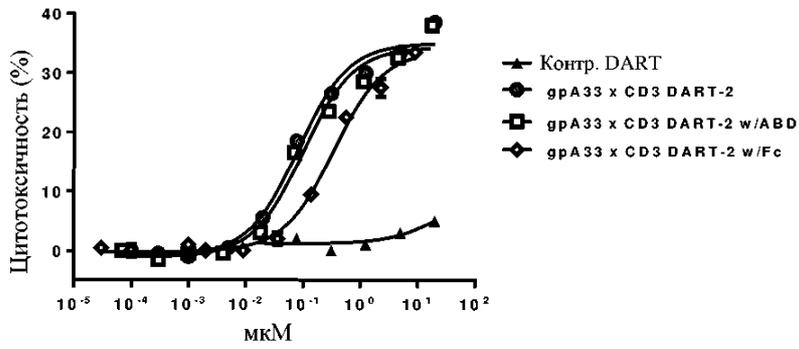
Фиг. 6C

НСТ116 (A33-ve) + дремлющие Т-клетки  
(LDH) E:T=10:1



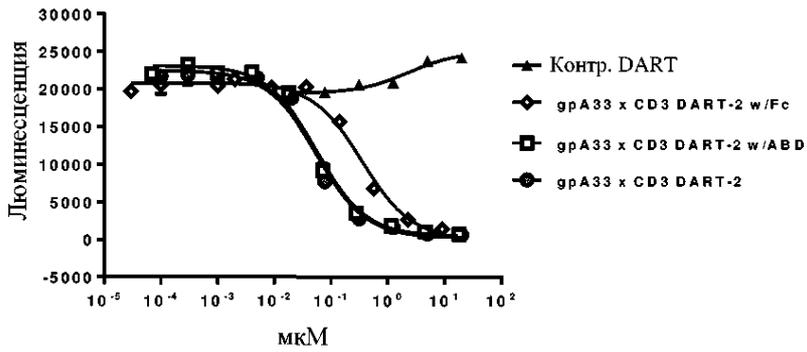
Фиг. 6D

Colo205-Luc + РВМС человека  
(LDH) E:T=30:1 24 ч



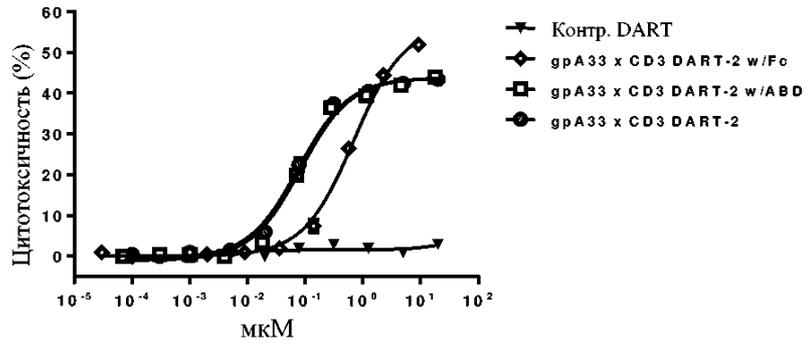
Фиг. 7А

Colo205-Luc + РВМС человека  
(LUM) E:T=30:1 24 ч



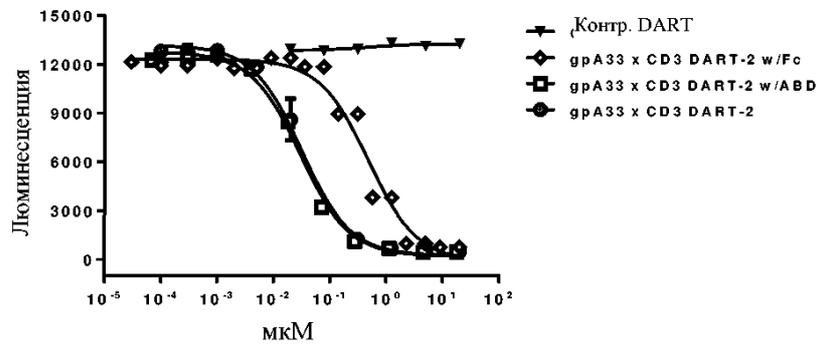
Фиг. 7B

Colo205-Luc + РВМС яванского макака  
(LDH) E:T=30:1 24 ч

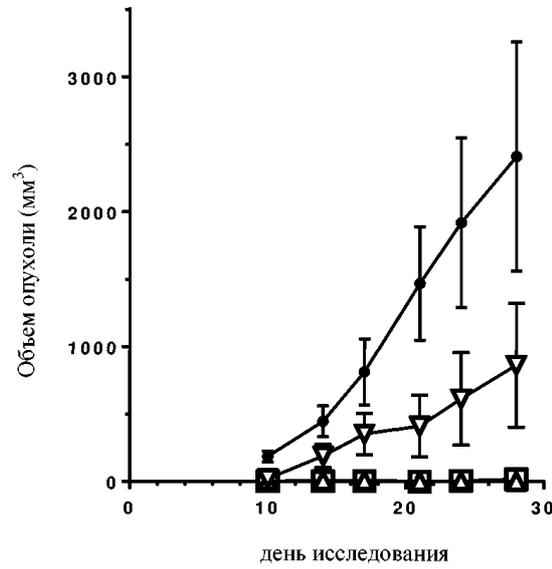


Фиг. 7C

Colo205-Luc + РВМС яванского макака  
(LUM) E:T=30:1 24 ч

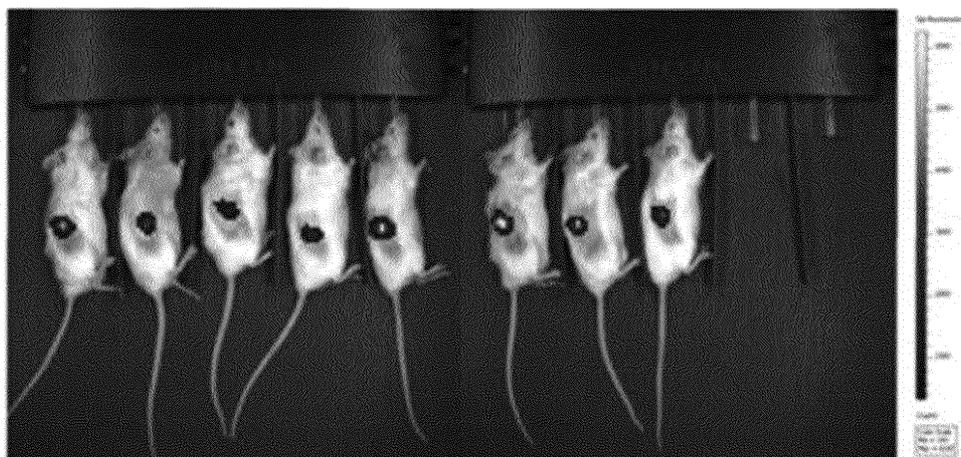


Фиг. 7D



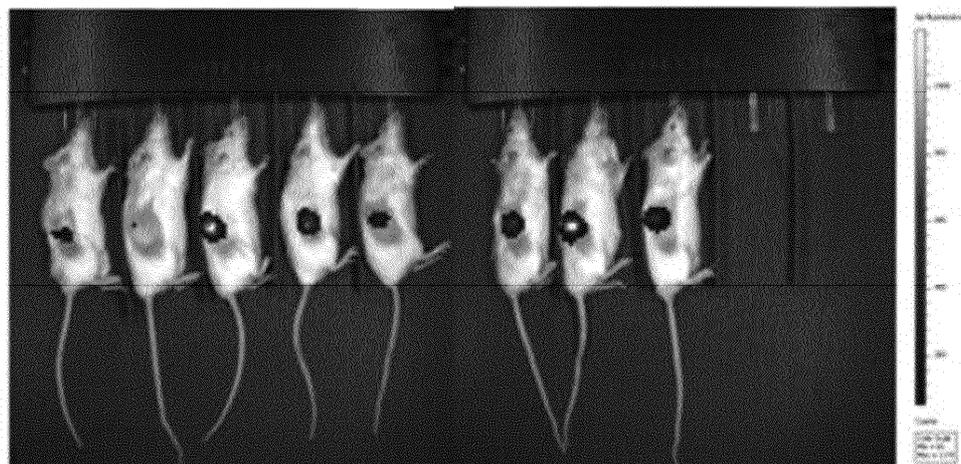
Фиг. 8

**День 2 Визуальные данные (инертный носитель):**



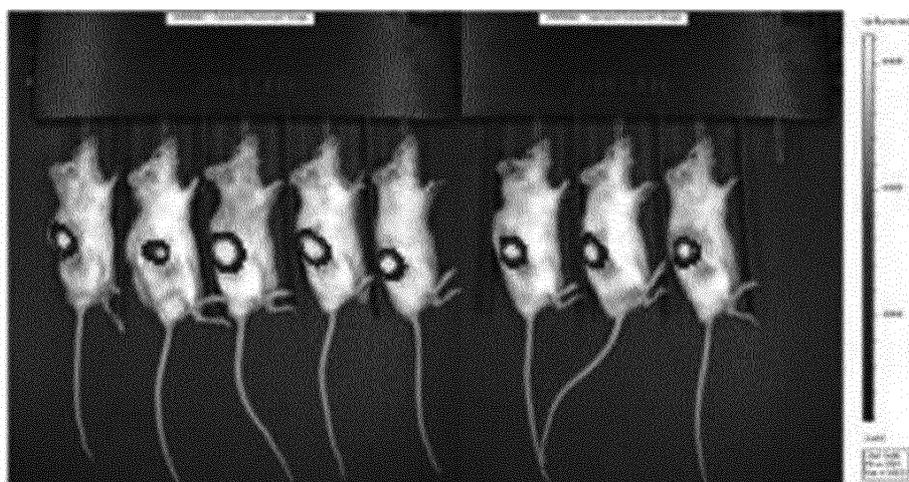
Фиг. 9А

**День 2 Визуальные данные (gpA33 x CD3 DART-1  
(0,5 мг/кг)):**



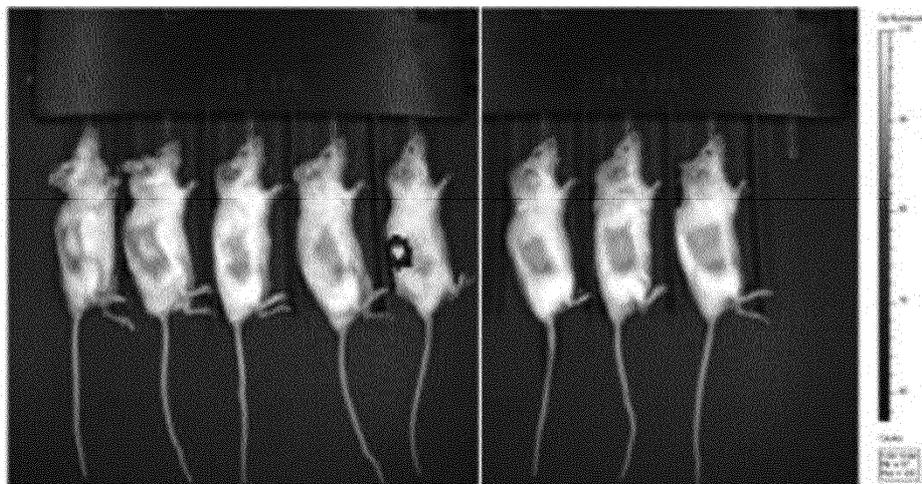
Фиг. 9В

**День 12 Визуальные данные (инертный носитель):**

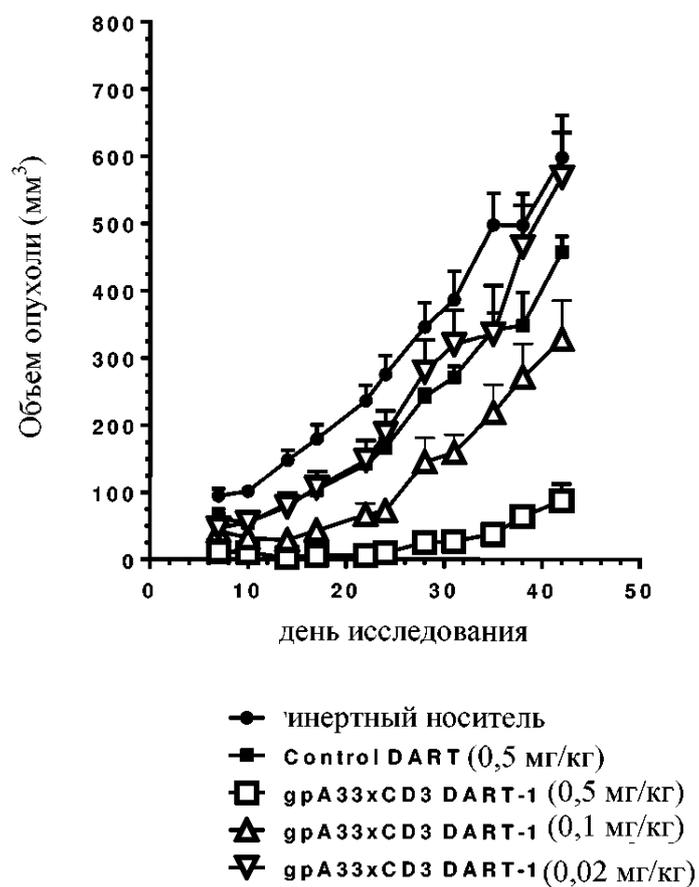


Фиг. 9С

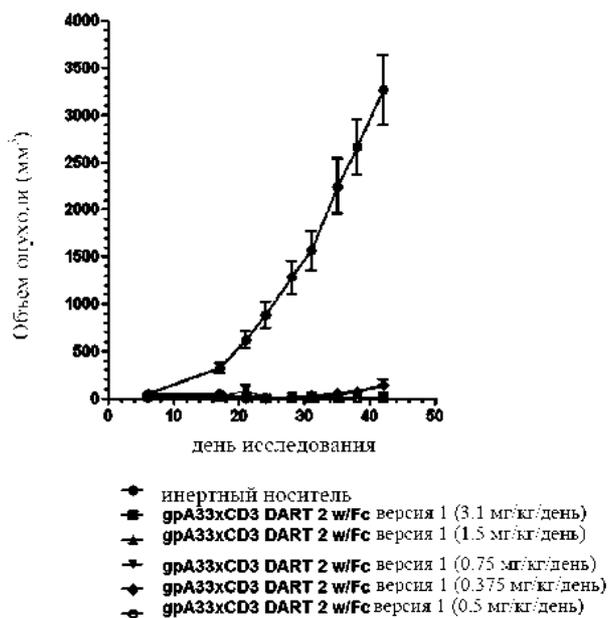
День 12 Визуальные данные (gpA33 x CD3 DART-1  
(0,5 мг/кг)):



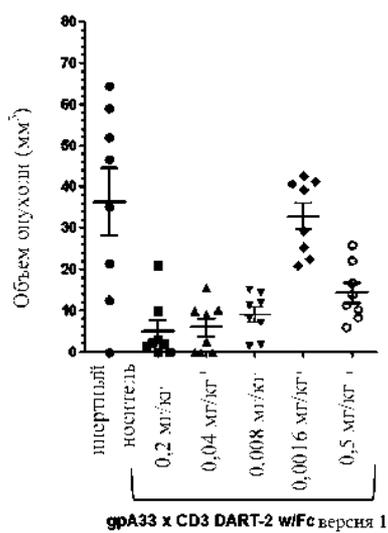
Фиг. 9D



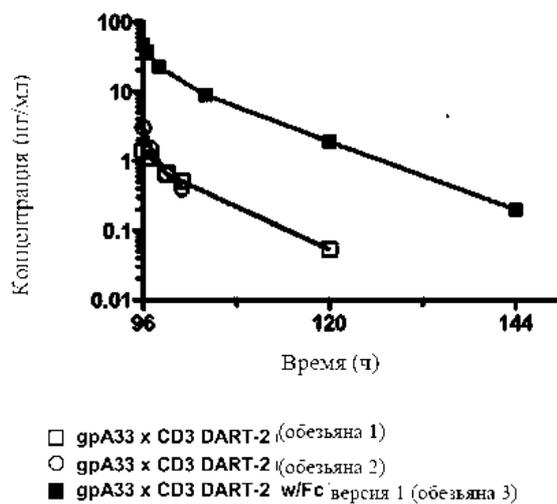
Фиг. 10



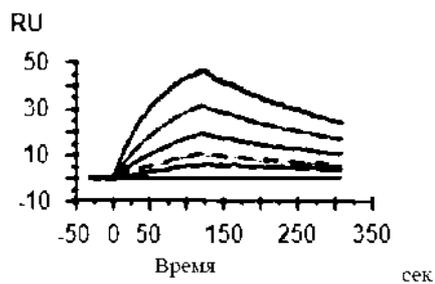
Фиг. 11



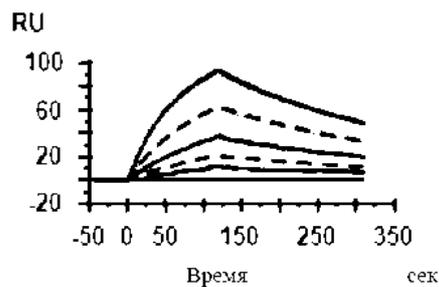
Фиг. 12



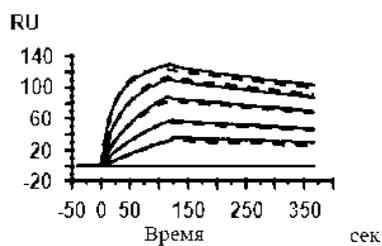
Фиг. 13



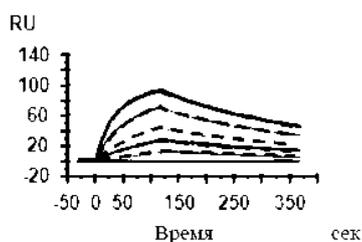
Связывание версии 1 DART-2 w/Fc с CD3 человека  
Фиг. 14А



Фиг. 14В



Связывание версии 1 DART-2 w/Fc с gpA33 человека  
Фиг. 15А



Связывание версии 1 DART-2 w/Fc с gpA33 яванского макака  
Фиг. 15В

