

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038958**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

**2021.11.15**

(21) Номер заявки

**201790307**

(22) Дата подачи заявки

**2015.08.03**(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)**(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, АКТИВИРУЮЩИЕ Т-КЛЕТКИ**(31) **14179764.7; 15170866.6**(32) **2014.08.04; 2015.06.05**(33) **EP**(43) **2017.07.31**(86) **PCT/EP2015/067776**(87) **WO 2016/020309 2016.02.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**Ф. ХОФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)**

(72) Изобретатель:

**Аст Оливер, Бакац Марина (CH),  
Имхоф-Юнг Забине (DE), Егер  
Кристиане, Клайн Кристиан (CH),  
Клостерманн Штефан, Мольхой  
Михаэль, Регула Йёрг Томас, Шефер  
Вольфганг (DE), Умана Пабло (CH)**

(74) Представитель:

**Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,  
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов  
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,  
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2015150447****EP-A1-2647707****WO-A1-2014081955****WO-A1-2009089004**

**DATABASE Geneseq [Online] 5 June 2014 (2014-06-05), "Anti-CD3 antibody CH2527 (VL\_7-46(13)) VL, SEQ 173.", XP002747363, retrieved from EBI accession no. GSP:BBF28775 Database accession no. BBF28775 the whole document**

**DATABASE Geneseq [Online] 5 June 2014 (2014-06-05), "Anti-CD3 antibody CH2527 (VH\_3-23(12)) VH, SEQ 169.", XP002747364, retrieved from EBI accession no. GSP:BBF28771 Database accession no. BBF28771 the whole document**

**DATABASE Geneseq [Online] 8 May 2014 (2014-05-08), "humanized GA101 antibody light chain region, SEQ ID 10.", XP002747365, retrieved from EBI accession no. GSP:BBE23705 Database accession no. BBE23705 the whole document**

**DATABASE Geneseq [Online] 8 May 2014 (2014-05-08), "humanized GA101 antibody heavy chain variable (VH) region, SEQ ID 7.", XP002747366, retrieved from EBI accession no. GSP:BBE23702 Database accession no. BBE23702 the whole document**

**CHRISTIAN KLEIN ET AL.: "Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies", MABS, vol. 4, no. 6, November 2012 (2012-11), pages 653-663, XP055106060, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.21379 cited in the application figure 5**

(57) В патенте описаны в целом новые биспецифические антигенсвязывающие молекулы для активации Т-клеток и их переориентации к конкретным клеткам-мишеням. Также описаны полинуклеотиды, кодирующие указанные биспецифические антигенсвязывающие молекулы, и векторы и клетки-хозяева, содержащие указанные полинуклеотиды. Описаны также способы получения биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, и способы применения указанных биспецифических антигенсвязывающих молекул для лечения заболевания.

**B1****038958****038958 B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится в целом к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, предназначенным для активации Т-клеток. Кроме того, настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим указанные биспецифические антигенсвязывающие молекулы, и к векторам и клеткам-хозяевам, содержащим указанные полинуклеотиды. Изобретение относится также к способам получения биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, и к способам применения таких биспецифических антигенсвязывающих молекул для лечения заболевания.

### Предпосылки создания изобретения

В различных клинических ситуациях часто требуется избирательная деструкция индивидуальной клетки или конкретного типа клеток. Например, основной задачей при терапии рака является разрушение именно опухолевых клеток с сохранением при этом в интактном и неповрежденном состоянии здоровых клеток и тканей.

Перспективным подходом для достижения этой цели является индукция иммунного ответа против опухоли, при котором иммунные эффекторные клетки, такие как естественные клетки-киллеры (NK) или цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), атакуют и разрушают опухолевые клетки. CTL представляют собой наиболее эффективные эффекторные клетки иммунной системы, однако они не могут активироваться эффекторным механизмом, опосредуемым Fc-доменом канонических терапевтических антител.

В этом плане в последние годы возрос интерес к биспецифическим антителам, предназначенным для связывания с помощью одного "плеча" с поверхностным антигеном на клетках-мишенях, а с помощью второго "плеча" с активирующим инвариантным компонентом комплекса Т-клеточного рецептора (TCR). Одновременное связывание такого антитела с обеими его мишенями должно приводить к временному взаимодействию между клеткой-мишенью и Т-клеткой, вызывая активацию любой цитотоксической Т-клетки и последующий лизис клетки-мишени. Таким образом, иммунный ответ переориентируется к клеткам-мишеням и не зависит от презентации пептидного антигена клеткой-мишенью или от специфичности Т-клетки, что имеет место при нормальной ограниченной ГКГС активации CTL. В этом контексте решающее значение имеет то, что CTL активируются только тогда, когда клетка-мишень презентует им биспецифическое антитело, т.е. имеет место имитация иммунологического синапса. Наиболее предпочтительными являются биспецифические антитела, для которых не требуется предварительное кондиционирование или костимуляция лимфоцитов для того, чтобы вызывать эффективный лизис клеток-мишеней.

Разработано несколько форматов биспецифических антител и изучена возможность их применения для опосредуемой Т-клетками иммунотерапии. Среди них очень хорошо охарактеризованы так называемые молекулы BiTE (биспецифический активатор Т-клетки), и уже установлена их определенная перспективность в клинических исследованиях (см. обзор Nagorsen и Bäuerle, *Exp Cell Res* 317, 12011, сс. 255-1260). BiTE представляют собой тандемные молекулы scFv, в которых две молекулы scFv слиты с помощью гибкого линкера. Кроме того, для активации (вовлечения в процесс) Т-клеток исследовали биспецифические форматы, включая димерные антитела (диабоди) (Holliger и др., *Prot Eng* 9, 1996, сс. 299-305) и их производные, такие как тандемные димерные антитела (Kirgizyanov и др., *J Mol Biol* 293, 1999, сс. 41-66). В последние годы разработаны так называемые молекулы DART (переориентирующие антитела с двойной аффинностью), основанные на формате димерных антител, но отличающиеся С-концевым дисульфидным мостиком, который предназначен для дополнительной стабилизации (Moore и др., *Blood* 117, 2011, сс. 4542-4551). Так называемые триомабы (трехфункциональные антитела), которые представляют собой полные гибридные мышиные/крысиные IgG-молекулы и которые также в настоящее время проходят клинические испытания, представляют собой молекулы более крупного формата (см. обзор Seimetz и др., *Cancer Treat Rev* 36, 2010, сс. 458-467).

Продемонстрировано, что различные разрабатываемые форматы обладают большим потенциалом для иммунотерапии, связанным с Т-клеточной переориентацией и активацией. Однако задача создания пригодных для этого биспецифических антител никоим образом не является тривиальной, а нуждается в решении ряда проблем, связанных с требованиями эффективности, токсичности, применимости и технологичности антител.

Небольшие конструкции, такие, например, как молекулы BiTE, хотя они обладают способностью эффективно перекрестно связывать эффекторные клетки и клетки мишени, обладают очень коротким временем полужизни в сыворотке, что требует их введения пациентам путем непрерывной инфузии. С другой стороны, IgG-подобные форматы, хотя они обладают значительным преимуществом с позиций продолжительного времени полужизни, обладают таким недостатком как токсичность, ассоциированная с нативными эффекторными функциями, которые присущи молекулам IgG. Их иммуногенный потенциал представляет собой другую характеристику IgG-подобных биспецифических антител, прежде всего нечеловеческого формата, неблагоприятную с позиций их успешного терапевтического применения. И, наконец, основной проблемой при обычном подходе к созданию биспецифических антител является получение биспецифических конструкций антител в достаточном для клинических испытаний количестве и имеющих достаточную чистоту, эта проблема связана с ошибочным спариванием тяжелых и легких цепей антител с различными специфичностями при совместной экспрессии, что снижает выход правильно

собранный конструкции и приводит к получению ряда нефункциональных побочных продуктов, от которых может оказаться трудно отделять требуемое биспецифическое антитело.

Различные подходы применялись для преодоления проблемы, связанной с ассоциацией цепей в биспецифических антителах (см., например, Klein и др., *mAbs* 6, 2012, сс. 653-663). Например, стратегия "knobs-into-holes" (взаимодействие по типу выступы-во-впадины") способствует усилению спаривания двух различных тяжелых цепей антитела путем интродукции мутаций в СН3-домены для модификации в поверхности раздела, в которой имеет место контакт. Аминокислоты с объемными боковыми цепями одной цепи заменяют на аминокислоты с короткими боковыми цепями для создания "впадины". И, наоборот, аминокислоты с крупными боковыми цепями интродуцируют в другой СН3-домен для создания "выступа". Путем совместной экспрессии двух тяжелых цепей (и двух идентичных легких цепей, соответствующих обеим тяжелым цепям) получают высокие выходы гетеродимера ("выступ-впадина") относительно гомодимера ("впадина-впадина" или "выступ-выступ" (Ridgway J.B. и др., *Protein Eng.* 9, 1996, сс. 617-621 и WO 96/027011). Процентное содержание гетеродимера можно дополнительно повышать путем ремоделирования поверхностей раздела двух СН3-доменов, используя подход, основанный на применении фагового дисплея, и интродукции дисульфидного мостика для стабилизации гетеродимеров (Merchant A.M. и др., *Nature Biotech.* 16, 1998, сс. 677-681; Atwell S. и др., *J. Mol. Biol.* 270, 1997, сс. 26-35). Новые подходы к технологии "knobs-into-holes" описаны, например, в EP 1870459 A1.

Однако стратегия "knobs-into-holes" не решает проблему ошибочного спаривания тяжелой цепи - легкой цепи, что имеет место в биспецифических антителах, которые содержат различные легкие цепи для спаривания с различными антигенами-мишенями.

Стратегия, применяемая для предупреждения ошибочного спаривания тяжелой цепи - легкой цепи, представляет собой обмен доменами между тяжелой и легкой цепями одного из спаривающихся плечей биспецифического антитела (см. WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254 и Schaefer W. и др., *PNAS*, 108, 2011, сс. 11187-11191, в которых описаны биспецифические антитела IgG-типа с кроссовером доменов).

Обмен переменных доменов VH и VL тяжелой и легкой цепей в одном из связывающихся плечей биспецифического антитела (WO 2009/080252, см. также Schaefer W. и др., *PNAS*, 108, 2011, сс. 11187-11191) выражено снижает уровень побочных продуктов, образовавшихся в результате ошибочного спаривания легкой цепи, направленной против первого антигена, с "неправильной" тяжелой цепью, направленной против второго антигена (по сравнению с подходами без такого обмена доменов). Однако препараты указанных антител не полностью свободны от побочных продуктов. Основным побочным продуктом является продукт, полученный в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа (Schaefer W. и др., *PNAS*, 108, 2011, сс. 11187-11191; на фиг. S11 дополнения). Таким образом, желательным является дополнительное снижение уровня указанных побочных продуктов для повышения, например, выхода указанных биспецифических антител.

С учетом трудностей и недостатков, присущих доступным в настоящее время биспецифическим антителам, предназначенным для опосредуемой Т-клетками иммунотерапии, сохраняется потребность в создании новых улучшенных форматов указанных молекул. В настоящем изобретении предложены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, созданные для активации и переориентации Т-клеток, в которых объединены высокая эффективность и технологичность с низкой токсичностью и предпочтительными фармакокинетическими свойствами.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

Согласно изобретению соотношение требуемого биспецифического антитела и нежелательных побочных продуктов, прежде всего побочных продуктов, полученных в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа, которые встречаются в биспецифических антителах с обменом VH/VL-доменов в одном из их связывающихся плечей, можно повышать путем интродукции заряженных аминокислот с противоположными зарядами в определенные аминокислотные положения в СН1- и CL-доменах.

Таким образом, первым объектом настоящего изобретения является активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая

(а) первую молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном;

(б) вторую молекулу Fab, которая специфически связывается со вторым антигеном, и в которой переменные домены VL и VH легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab заменены друг на друга;

где первый антиген представляет собой активирующий Т-клетки антиген, а второй антиген представляет собой антиген клетки-мишени, или первый антиген представляет собой антиген клетки-мишени, а второй антиген представляет собой активирующий Т-клетки антиген; и в которой

I) в константном домене CL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в константном домене СН1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

II) в константном домене CL второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэ-

боту) и в константном домене СН1 второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Согласно изобретению вторая молекула Fab представляет собой кроссовер-молекулу Fab, в которой переменные области легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab обменены. В конкретных вариантах осуществления изобретения первая (и третья, если она присутствует) молекула Fab представляет собой каноническую молекулу Fab. В другом конкретном варианте осуществления изобретения не более одной молекулы Fab, обладающей способностью специфически связываться с активирующим Т-клетки антигеном, присутствует в активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекуле (т.е. для активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы характерно одновалентное связывание с активирующим Т-клетки антигеном).

В конкретном варианте осуществления изобретения первый антиген представляет собой антиген клетки-мишени, а второй антиген представляет собой активирующий Т-клетки антиген. В более конкретном варианте осуществления изобретения активирующий Т-клетки антиген представляет собой CD3, прежде всего CD3 эпитоп. В одном из вариантов осуществления изобретения антиген клетки-мишени представляет собой CD20.

В одном из вариантов активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, в константном домене СL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в константном домене СН1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В следующем варианте осуществления изобретения в константном домене СL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в константном домене СН1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В еще одном варианте осуществления изобретения в константном домене СL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и аминокислота в положении 123 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в константном домене СН1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения в константном домене СL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 заменена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу) и в константном домене СН1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (Е) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (Е) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В другом конкретном варианте осуществления изобретения в константном домене СL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 замена на аргинин (R) (нумерация согласно Кэботу) и в константном домене СН1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (Е) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (Е) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, содержит

(а) первую молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном;

(б) вторую молекулу Fab, которая специфически связывается со вторым антигеном, и в которой переменные домены VL и VH легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab заменены друг на друга;

где первый антиген представляет собой антиген клетки-мишени, а второй антиген представляет собой активирующий Т-клетки антиген; и в которой в константном домене СL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и аминокислота в положении 123 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в констант-

ном домене СН1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В альтернативном варианте активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, в константном домене СL второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (К) или аргинин (R)) и в константном домене СН1 второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В другом варианте осуществления изобретения в константном домене СL второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в константном домене СН1 второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В следующем варианте осуществления изобретения в константном домене СL второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (К) или аргинин (R)) и аминокислота в положении 123 заменена независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (К) или аргинин (R)) и в константном домене СН1 второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (Е) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения в константном домене СL второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (К) (нумерация согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 заменена на лизин (К) (нумерация согласно Кэботу) и в константном домене СН1 второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (Е) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В другом варианте осуществления изобретения в константном домене СL второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (К) (нумерация согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 заменена на аргинин (R) (нумерация согласно Кэботу) и в константном домене СН1 второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (Е) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, дополнительно содержит третью молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном.

В конкретных вариантах осуществления изобретения третья молекула Fab идентична первой молекуле Fab. Таким образом, в этих вариантах осуществления изобретения третья молекула Fab содержит такие же аминокислотные замены, что и первая молекула Fab. Подобно первой молекуле Fab третья молекула Fab, в частности, может представлять собой каноническую молекулу Fab.

Если третья молекула Fab присутствует, то в конкретном варианте осуществления изобретения первая и третья молекулы Fab специфически связываются с антигеном клетки-мишени, а вторая молекула Fab специфически связывается с активирующим Т-клетки антигеном, прежде всего CD3, более предпочтительно CD3 эпсилон.

В некоторых вариантах активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, первая молекула Fab, указанная в подпункте а), и вторая молекула Fab, указанная в подпункте б), слиты друг с другом, необязательно через пептидный линкер. В конкретном варианте осуществления изобретения вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab. В альтернативном варианте осуществления изобретения первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab. В вариантах осуществления изобретения, в которых либо (I) вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab, либо (II) первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab, дополнительно легкая цепь Fab первой молекулы Fab и легкая цепь Fab второй молекулы Fab могут быть слиты друг с другом, необязательно через пептидный линкер.

В конкретных вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, дополнительно содержит Fc-домен, состоя-

щий из первой и второй субъединиц, которые обладают способностью к стабильной ассоциации.

Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, может иметь различные конфигурации, т.е. первая, вторая (и необязательно третья) молекулы Fab могут быть слиты друг с другом и с Fc-доменом различными путями. Компоненты могут быть слиты друг с другом непосредственно или предпочтительно через один или несколько приемлемых пептидных линкеров. Если слияние имеет место с N-концом субъединицы Fc-домена, то оно, как правило, происходит через шарнирную область иммуноглобулина.

В одном из вариантов осуществления изобретения вторая молекула Fab слита на C-конце тяжелой цепи Fab с N-концом первой или второй субъединицы Fc-домена. В указанном варианте осуществления изобретения первая молекула Fab может быть слита на C-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab или с N-концом другой одной из субъединиц Fc-домена.

В одном из вариантов осуществления изобретения первая и вторая молекулы Fab каждая слита на C-конце тяжелой цепи Fab с N-концом одной из субъединиц Fc-домена. В указанном варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит в основном молекулу иммуноглобулина, в которой в одном из Fab-плечей вариабельные области тяжелой и легкой цепи VH и VL обменены/заменены друг на друга (см. фиг. 1А, Г).

В альтернативных вариантах осуществления изобретения третья молекула Fab слита на C-конце тяжелой цепи Fab с N-концом первой или второй субъединицы Fc-домена. В частности, в указанном варианте осуществления изобретения вторая и третья молекулы Fab каждая слита на C-конце тяжелой цепи Fab с N-концом одной из субъединиц Fc-домена, а первая молекула Fab слита на C-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab. В этом варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит в основном молекулу иммуноглобулина, в которой в одном из Fab-плечей вариабельные области тяжелой и легкой цепи VH и VL обменены/заменены друг на друга и в которой дополнительная (каноническая) молекула Fab слита на N-конце с указанным плечом Fab (см. фиг. 1Б, Д). В другом указанном варианте осуществления изобретения первая и третья молекулы Fab каждая слита на C-конце тяжелой цепи Fab с N-концом одной из субъединиц Fc-домена, а вторая молекула Fab слита на C-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab. В этом варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит в основном молекулу иммуноглобулина с дополнительной молекулой Fab, слитой на N-конце с одним из плечей Fab иммуноглобулина, при этом в указанной дополнительной молекуле Fab вариабельные области тяжелой и легкой цепи VH и VL обменены/заменены друг на друга (см. фиг. 1В, Е).

Во всех различных конфигурациях активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, аминокислотные замены, указанные в настоящем описании, могут иметь место либо в CH1- и CL-доменах первой и (если она присутствует) третьей молекулы Fab, либо в CH1- и CL-доменах второй молекулы Fab. Предпочтительно они имеют место в CH1- и CL-доменах первой и (если она присутствует) третьей молекулы Fab. В соответствии с концепцией изобретения, если аминокислотные замены, указанные в настоящем описании, осуществляют в первой (и, если она присутствует, в третьей) молекуле Fab, то никакие аминокислотные замены не осуществляют во второй молекуле Fab. И, наоборот, если аминокислотные замены, указанные в настоящем описании, осуществляют во второй молекуле Fab, то никакие аминокислотные замены не осуществляют в первой (и, если она присутствует, в третьей) молекуле Fab.

В конкретных вариантах активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, прежде всего, когда аминокислотные замены, указанные в настоящем описании, осуществляют в первой (и, если она присутствует, в третьей) молекуле Fab, то константный домен CL первой (и, если она присутствует, третьей) молекулы Fab относится к каппа-изотипу. В конкретных вариантах активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, прежде всего, когда аминокислотные замены, указанные в настоящем описании, осуществляют во второй молекуле Fab, то константный домен CL второй молекулы Fab относится к каппа-изотипу. В некоторых вариантах осуществления изобретения константный домен CL первой (и, если она присутствует, третьей) молекуле Fab и константный домен CL второй молекулы Fab относятся к каппа-изотипу.

В конкретном варианте осуществления изобретения молекула иммуноглобулина, которая содержится в активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекуле, предлагаемой в изобретении, представляет собой иммуноглобулин IgG-класса. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин IgG<sub>1</sub>-подкласса. В другом варианте осуществления изобретения иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин IgG<sub>4</sub>-подкласса.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит

- а) первую молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном;
- б) вторую молекулу Fab, которая специфически связывается со вторым антигеном и в которой ва-

риабельные домены VL и VH легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab обменены друг на друга;

в) третью молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном; и

г) Fc-домен, который состоит из первой и второй субъединиц, обладающих способностью к стабильной ассоциации;

где первый антиген представляет собой антиген клетки-мишени, а второй антиген представляет собой активирующий Т-клетки антиген, прежде всего CD3, более предпочтительно CD3 эпсилон;

в которой третья молекула Fab, указанная в подпункте в), идентична первой молекуле Fab, указанной в подпункте а);

в которой в константном домене CL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), и третьей молекулы Fab, указанной в подпункте в), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 заменена на лизин (K) или на аргинин (R) (нумерация согласно Кэботу), и в которой в константном домене CH1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), и третьей молекулы Fab, указанной в подпункте в), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); и в которой

(I) первая молекула Fab, указанная в подпункте а), слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), а вторая молекула Fab, указанная в подпункте б), и третья молекула Fab, указанная в подпункте в), каждая слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом одной из субъединиц Fc-домена, указанного в подпункте г), или

(II) вторая молекула Fab, указанная в подпункте б), слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), а первая молекула Fab, указанная в подпункте а), и третья молекула Fab, указанная в подпункте в), каждая слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом одной из субъединиц Fc-домена, указанного в подпункте г).

Еще более конкретным вариантом осуществления изобретения является активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит

а) первую молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном;

б) вторую молекулу Fab, которая специфически связывается со вторым антигеном и в которой риабельные домены VL и VH легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab обменены друг на друга;

в) третью молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном; и

г) Fc-домен, который состоит из первой и второй субъединиц, обладающих способностью к стабильной ассоциации;

где первый антиген представляет собой антиген клетки-мишени, а второй антиген представляет собой активирующий Т-клетки антиген, прежде всего CD3, более предпочтительно CD3 эпсилон;

в которой третья молекула Fab, указанная в подпункте в), идентична первой молекуле Fab, указанной в подпункте а);

в которой в константном домене CL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), и третьей молекулы Fab, указанной в подпункте в), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 заменена на аргинин (R) (нумерация согласно Кэботу), и в которой в константном домене CH1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), и третьей молекулы Fab, указанной в подпункте в), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); и в которой первая молекула Fab, указанная в подпункте а), слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), а вторая молекула Fab, указанная в подпункте б), и третья молекула Fab, указанная в подпункте в), каждая слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом одной из субъединиц Fc-домена, указанного в подпункте г).

Другим вариантом осуществления изобретения является активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит

а) первую молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном;

б) вторую молекулу Fab, которая специфически связывается со вторым антигеном и в которой риабельные домены VL и VH легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab обменены друг на друга;

в) Fc-домен, который состоит из первой и второй субъединиц, обладающих способностью к стабильной ассоциации;

в которой

(I) первый антиген представляет собой антиген клетки-мишени, а второй антиген представляет собой активирующий Т-клетки антиген, прежде всего CD3, более предпочтительно CD3 эпсилон; или

(II) второй антиген представляет собой антиген клетки-мишени, а первый антиген представляет собой активирующий Т-клетки антиген, прежде всего CD3, более предпочтительно CD3 эпсилон;

в которой в константном домене CL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 заменена на лизин (K) или на аргинин (R) (нумерация согласно Кэботу), и в которой в константном домене CH1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена на

глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); и в которой первая молекула Fab, указанная в подпункте а), и вторая молекула Fab, указанная в подпункте б), каждая слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом одной из субъединиц Fc-домена, указанного в подпункте в).

В конкретных вариантах активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>1</sub>. В другом конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>4</sub>. Еще в одном конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>4</sub>, содержащий аминокислотную замену S228P (нумерация по Кэботу). В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой человеческий Fc-домен.

В конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-домен содержит модификацию, которая способствует ассоциации первой и второй субъединиц Fc-домена. В указанном конкретном варианте осуществления изобретения аминокислотный остаток в СНЗ-доме первой субъединицы Fc-домена заменяют на аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, создавая тем самым выпуклость в СНЗ-доме первой субъединицы, которая может помещаться в полость в СНЗ-доме второй субъединицы, а аминокислотный остаток в СНЗ-доме второй субъединицы Fc-домена заменяют на аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, создавая тем самым полость в СНЗ-доме второй субъединицы, в которую может помещаться выпуклость в СНЗ-доме первой субъединицы.

В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен обладает пониженной аффинностью связывания с Fc-рецептором и/или пониженной эффекторной функцией по сравнению с нативным Fc-доменом IgG<sub>1</sub>. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен создают так, чтобы он имел пониженную аффинность связывания с Fc-рецептором и/или пониженную эффекторную функцию по сравнению с не созданным с помощью инженерии Fc-доменом. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит одну или несколько аминокислотную(ых) замену(н), которая(ые) снижает(ют) связывание с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию. В одном из вариантов осуществления изобретения одна или несколько аминокислотная(ых) замена(н) в Fc-доме, которая(ые) снижает(ют) связывание с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, находится(ятся) в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, включающей L234, L235 и P329 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В конкретных вариантах осуществления изобретения каждая субъединица Fc-домена содержит три аминокислотные замены, которые снижают связывание с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, где указанные аминокислотные замены представляют собой L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из указанных вариантов осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>1</sub>, прежде всего Fc-домен человеческого IgG<sub>1</sub>. В других вариантах осуществления изобретения каждая субъединица Fc-домена содержит две аминокислотные замены, которые снижают связывание с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, где указанные аминокислотные замены представляют собой L235E и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из указанных вариантов осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>4</sub>, прежде всего Fc-домен человеческого IgG<sub>4</sub>. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы представляет собой Fc-домен IgG<sub>4</sub> и содержит аминокислотные замены L235E и S228P (SPLE) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой Fc $\gamma$ -рецептор. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой человеческий Fc-рецептор. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой человеческий Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RI и/или Fc $\gamma$ RIIIa. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторная функция представляет собой антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC).

В конкретном варианте активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, молекула Fab, которая специфически связывается с активирующим Т-клетки антигеном, прежде всего CD3, более предпочтительно CD3 эпсилон, содержит гипервариабельный участок (CDR) 1 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 4, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 5, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 6, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 8, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 9, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 10. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения молекула Fab, которая специфически связывается с активирующим Т-клетки антигеном, прежде всего CD3, более предпочтительно CD3 эпсилон, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7. В одном из конкретных вариантов осуществления изобретения вторая моле-

кула Fab, входящая в активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, специфически связывается с CD3, более предпочтительно CD3 эпсилон и содержит гипервариабельный участок (CDR) 1 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 4, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 5, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 6, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 8, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 9, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 10. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения указанная вторая молекула Fab содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В другом конкретном варианте активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, молекула Fab, которая специфически связывается с антигеном клетки-мишени, прежде всего CD20, содержит гипервариабельный участок (CDR) 1 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 46, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 49, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 50, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения молекула Fab, которая специфически связывается с антигеном клетки-мишени, прежде всего CD20, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31. В одном из конкретных вариантов осуществления изобретения первая (и, если присутствует, третья) молекула Fab, входящая в активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, специфически связывается с CD20, и содержит гипервариабельный участок (CDR) 1 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 46, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 49, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 50, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения указанная первая (и, если присутствует, третья) молекула Fab содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

Конкретным объектом изобретения является активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая содержит

- а) первую молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном;
- б) вторую молекулу Fab, которая специфически связывается со вторым антигеном и в которой вариабельные домены VL и VH легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab обменены друг на друга;
- в) третью молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном; и
- г) Fc-домен, который состоит из первой и второй субъединиц, обладающих способностью к стабильной ассоциации;

где

(I) первый антиген представляет собой CD20, а второй антиген представляет собой CD3, прежде всего CD3 эпсилон;

(II) первая молекула Fab, указанная в подпункте а), и третья молекула Fab, указанная в подпункте в), каждая содержит гипервариабельный участок (CDR) 1 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 46, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 49, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 50, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51, а вторая молекула Fab, указанная в подпункте б), содержит CDR 1 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 4, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 5, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 6, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 8, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 9, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 10;

(III) в константном домене CL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), и третьей молекулы Fab, указанной в подпункте в), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 заменена на лизин (K) или на аргинин (R), предпочтительно на аргинин (R) (нумерация согласно Кэботу), и в которой в константном домене CH1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), и третьей молекулы Fab, указанной в подпункте в), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); и

(IV) первая молекула Fab, указанная в подпункте а), слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), а вторая молекула Fab, указанная в подпункте б), и третья молекула Fab, указанная в подпункте в), каждая слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом одной из субъединиц Fc-домена, указанного в подпункте г).

Другим объектом изобретения является активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязыва-

вающая молекула, которая содержит

- а) первую молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном;
- б) вторую молекулу Fab, которая специфически связывается со вторым антигеном и в которой варибельные домены VL и VH легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab обменены друг на друга;
- в) третью молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном; и
- г) Fc-домен, который состоит из первой и второй субъединиц, обладающих способностью к стабильной ассоциации;

где

(I) первый антиген представляет собой CD20, а второй антиген представляет собой CD3, прежде всего CD3 эпсилон;

(II) первая молекула Fab, указанная в подпункте а), и третья молекула Fab, указанная в подпункте в), каждая содержит гиперварибельный участок (CDR) 1 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 46, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 49, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 50, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51, а вторая молекула Fab, указанная в подпункте б), содержит CDR 1 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 4, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 67, CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 6, CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 68, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 9, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 10;

(III) в константном домене CL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), и третьей молекулы Fab, указанной в подпункте в), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 заменена на лизин (K) или на аргинин (R), предпочтительно на аргинин (R) (нумерация согласно Кэботу), и в которой в константном домене CH1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), и третьей молекулы Fab, указанной в подпункте в), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); и

(IV) первая молекула Fab, указанная в подпункте а), слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), а вторая молекула Fab, указанная в подпункте б), и третья молекула Fab, указанная в подпункте в), каждая слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом одной из субъединиц Fc-домена, указанного в подпункте г).

Другим объектом изобретения является один или несколько выделенный(ых) полинуклеотид(ов), кодирующий(их) активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении. Изобретение относится также к одному или нескольким экспрессионному(ым) вектору(ам), содержащему(им) выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, и клетке-хозяину, которая содержит выделенный(ые) полинуклеотид(ы) или экспрессионный(ые) вектор(ы), предлагаемый(ые) в изобретении. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, в частности, клетку млекопитающего.

Другим объектом изобретения является способ получения активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, заключающийся в том, что осуществляют стадии, на которых а) культивируют клетку-хозяина, предлагаемую в изобретении, в условиях, пригодных для экспрессии активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, и б) выделяют активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу. Изобретение относится также к активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекуле, полученной способом, предлагаемым в изобретении.

Изобретение относится также к фармацевтической композиции, содержащей активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

Под объем изобретения подпадают также способы применения активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы и фармацевтической композиции, предлагаемых в изобретении. Одним из объектов изобретения является активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула или фармацевтическая композиция, предлагаемая в изобретении, предназначенная для применения в качестве лекарственного средства. Одним из объектов изобретения является активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула или фармацевтическая композиция, предлагаемая в изобретении, предназначенная для применения при лечении заболевания у индивидуума, который нуждается в этом. В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак.

Предложено также применение активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, для приготовления лекарственного средства для лечения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом; а также способ лечения заболевания у индивидуума, заключающийся в том, что вводят указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве композицию, которая содержит активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, в фармацевтически приемлемой форме. В конкретном варианте осу-

шествления изобретения заболевание представляет собой рак. В любом из вышеперечисленных вариантов осуществления изобретения индивидуум предпочтительно представляет собой млекопитающее, прежде всего человека.

В изобретении предложен также способ индукции лизиса клетки-мишени, прежде всего опухолевой клетки, заключающийся в том, что приводят в контакт клетку-мишень с активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулой, предлагаемой в изобретении, в присутствии Т-клетки, прежде всего цитотоксической Т-клетки.

#### Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - примеры конфигураций активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул (ТСВ), предлагаемых в изобретении. (А, Г) Иллюстрация молекулы "1 + 1 CrossMab". (Б, Д) Иллюстрация молекулы "2+1 IgG Crossfab" с альтернативным расположением Crossfab- и Fab-компонентов ("инвертированная" молекула). (В, Е) Иллюстрация молекулы "2+1 IgG Crossfab". (Ж, Л) Иллюстрация молекулы "1 + 1 IgG Crossfab" с альтернативным расположением Crossfab- и Fab-компонентов ("инвертированная"). (З, М) Иллюстрация молекулы "1 + 1 IgG Crossfab". (И, Н) Иллюстрация молекулы "2+1 IgG Crossfab" с двумя CrossFab. (К, О) Иллюстрация молекулы "2+1 IgG Crossfab" с двумя CrossFab и с альтернативным расположением Crossfab- и Fab-компонентов ("инвертированная"). (П, У) Иллюстрация молекулы "Fab-Crossfab". (Р, Ф) Иллюстрация молекулы "Crossfab-Fab". (С, Х) Иллюстрация молекулы "(Fab)<sub>2</sub>-Crossfab". (Т, Ц) Иллюстрация молекулы "Crossfab-(Fab)<sub>2</sub>". (Ч, Щ) Иллюстрация молекулы "Fab-(Crossfab)<sub>2</sub>". (Ш, Э) Иллюстрация молекулы "(Crossfab)<sub>2</sub>-Fab". Черная точка: необязательная модификация в Fc-домене, способствующая гетеродимеризации; ++, --: аминокислоты с противоположными зарядами, интродуцированные в CH- и CL-домены;

на фиг. 2 - иллюстрация ТСВ, полученных в примере 1. (А) "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" без модификаций зарядов (CH1/CL-обмен в CD3-связывающем компоненте), (Б) "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, с модификациями зарядов в CD20-связывающих компонентах, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (В) "2+1 IgG CrossFab" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, модификация зарядов в CD3-связывающем компоненте, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (Г) "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" без модификаций зарядов (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте), (Д) "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" без модификаций зарядов (VH-CH1/VL-CL-обмен в CD3-связывающем компоненте), (Е) "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен в CD20-связывающих компонентах, модификация заряда в CD3-связывающем компоненте, EE = 147E, 213E; KK = 123K, 124K), (Ж) "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов и мутацией DDKK в Fc-области (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, модификация зарядов в CD20-связывающих компонентах, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (З) "1 + 1 CrossMab" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, модификация зарядов в CD20-связывающем компоненте, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (И) "1 + 1 CrossMab" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, модификация зарядов в CD20-связывающем компоненте, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K, другой CD20-связывающий компонент), (К) "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов 213E, 123R (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, модификация зарядов в CD20-связывающем компоненте, E = 213E; R = 123R), (Л) "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен и модификация зарядов в CD3-связывающем компоненте);

на фиг. 3 - (А-И, О, П) - результаты анализа методом капиллярного электрофореза в присутствии ДСН (КЭ-ДСН) ТСВ, полученных в примере 1 (конечные очищенные препараты). (А) Электрофореграмма молекулы "А", представленной на фиг. 2А, (Б) электрофореграмма молекулы "Б", представленной на фиг. 2Б, (В) электрофореграмма молекулы "В", представленной на фиг. 2В, (Г) электрофореграмма молекулы "Г", представленной на фиг. 2Г, (Д) электрофореграмма молекулы "Д", представленной на фиг. 2Д, (Е) электрофореграмма молекулы "А", представленной на фиг. 2Е, (Ж) электрофореграмма молекулы "Ж", представленной на фиг. 2Ж, (З) электрофореграмма молекулы "З", представленной на фиг. 2З, (И) электрофореграмма молекулы "И", представленной на фиг. 2И, (О) электрофореграмма молекулы "К", представленной на фиг. 2К, (П) электрофореграмма молекулы "Л", представленной на фиг. 2Л. Дорожка А = невозстанавливающие условия, дорожка Б = восстанавливающие условия. (К-М, Р, М) - результаты анализа методом ДСН-ПААГ ТСВ, полученных в примере 1, после первой стадии очистки (аффинная хроматография на белке А). (К) ДСН-ПААГ, 4-12% Бис-Трис, невозстанавливающие условия; дорожка 1 = маркер (Mark 12, неокрашенный стандарт, фирма Invitrogen); дорожки 2-11 = фракции, полученные после аффинной хроматографии на белке А, молекулы "Б", (Л) ДСН-ПААГ, 3-8% Трис-ацетат, невозстанавливающие условия; дорожка 1 = маркер (HiMark, фирма Invitrogen); дорожки 2-12 = фракции, полученные после аффинной хроматографии на белке А, молекулы "В", (М) ДСН-ПААГ, 4-12% Бис-Трис, восстанавливающие условия; дорожка 1 = маркер (Mark 12, неокрашенный стандарт, фирма Invitrogen); дорожки 2-14 = фракции, полученные после аффинной хроматографии на белке А, молекулы "Г", (Р) ДСН-ПААГ, 4-12% Бис/Трис, восстанавливающие условия; дорожка 1 = маркер (Mark 12, не-

окрашенный стандарт, фирма Invitrogen); дорожки 2-10 = фракции, полученные после аффинной хроматографии на белке А, молекулы "К", (С) ДСН-ПААГ, 4-12% Бис/Трис, невосстанавливающие условия; дорожка 1 = маркер (Mark 12, фирма Invitrogen); дорожки 2-12 = фракции, полученные после аффинной хроматографии на белке А, молекулы "Л". (Н)- результаты анализа методом гель-фильтрации (SEC; первая стадия очистки) ТСВ, полученных в примере 1 (молекула "А" (первая стадия SEC), "Б" и "Г", как указано выше);

на фиг. 4 - результаты анализа связывания с CD3 и CD20 биспецифических активирующих Т-клетки (ТСВ) антител к CD3/к CD20 ("CD20 ТСВ") с модификациями зарядов или без них ("заряженные остатки") (см. пример 1);

на фиг. 5 - результаты анализа лизиса опухолевых клеток, индуцированного активирующими Т-клетки биспецифическими антителами (ТСВ) к CD3/к CD20 ("CD20 ТСВ") с модификациями зарядов или без них ("заряженные остатки") после инкубации в течение 24 ч с человеческими РВМС (см. пример 1);

на фиг. 6 - результаты анализа активации CD8 -Т-клеток (А) или CD4 -Т-клеток (Б) после опосредуемого Т-клетками цитолиза экспрессирующих CD20 опухолевых клеток-мишеней (Nalm-6), индуцируемого активирующими Т-клетки биспецифическими антителами (ТСВ) к CD3/к CD20 ("CD20 ТСВ") с модификациями зарядов или без них ("заряженные остатки") (см. пример 1);

на фиг. 7 - результаты анализа активации CD8 -Т-клеток (А) или CD4 -Т-клеток (Б) после опосредуемого Т-клетками цитолиза экспрессирующих CD20 опухолевых клеток-мишеней (Z-138), индуцируемого активирующими Т-клетки биспецифическими антителами (ТСВ) к CD3/к CD20 ("CD20 ТСВ") с модификациями зарядов или без них ("заряженные остатки") (см. пример 1);

на фиг. 8 - результаты анализа В-клеточного истощения в цельной крови здорового человека после инкубации с активирующими Т-клетки биспецифическими антителами (ТСВ) к CD3/к CD20 ("CD20 ТСВ") с модификациями зарядов или без них ("заряженные остатки"); 22-часовой анализ (см. пример 1);

на фиг. 9 - результаты анализа активации CD8 -Т-клеток (А) или CD4 -Т-клеток (Б) после опосредуемого Т-клетками цитолиза экспрессирующих CD20 В-клеток в цельной крови здорового человека, индуцируемого активирующими Т-клетки биспецифическими антителами (ТСВ) к CD3/к CD20 ("CD20 ТСВ") с модификациями зарядов или без них ("заряженные остатки") (см. пример 1);

на фиг. 10 - результаты анализа связывания анти-CD20/анти-CD3 ТСВ (молекула "Б" на фиг. 2Б) с клетками-мишенями, экспрессирующими человеческий CD20 (А) и CD3 (Б);

на фиг. 11 - результаты анализа связывания анти-CD20/анти-CD3 ТСВ (молекула "Б" на фиг. 2Б) с клетками-мишенями, экспрессирующими CD20 и CD3 человека и обезьян циномоглус. (А) В-клетки, (Б) CD4-Т-клетки, (В) CD8-Т-клетки;

на фиг. 12 - результаты анализа лизиса опухолевых клеток, опосредуемого различными форматами антител в виде анти-CD20/анти-CD3 ТСВ;

на фиг. 13 - результаты анализа лизиса опухолевых клеток и последующей Т-клеточной активации, опосредуемых различными форматами антител в виде анти-CD20/анти-CD3 ТСВ. (А-В) Лизис опухолевых клеток-мишеней линии Z138 при использовании в качестве эффекторных клеток РВМС из трех различных доноров. (Г) Лизис панели указанных опухолевых клеток линий DLBCL (диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома);

на фиг. 14 - результаты анализа В-клеточного истощения в человеческой цельной крови, опосредуемого различными форматами антител в виде анти-CD20/анти-CD3 ТСВ;

на фиг. 15 - результаты количественного анализа активации Т-клеток различными форматами антител в виде анти-CD20/анти-CD3 ТСВ, на основе интенсивности передачи сигналов CD3 в прямом направлении с использованием репортерного анализа Jurkat-NFAT;

на фиг. 16 - фармакокинетические параметры, установленные после i.v. болюсного введения в дозе 0,5 мг/кг антитела в виде анти-CD20/анти-CD3 ТСВ (молекула "Б" на фиг. 2Б), на основе малой выборки данных на NOG-мышцах;

на фиг. 17 - схематическое изображение плана эксперимента по оценке способности вызывать В-клеточное истощение антитела в виде анти-CD20/анти-CD3 ТСВ (молекула "Б" на фиг. 2Б) у полностью гуманизированных NOG-мышей;

на фиг. 18 - результаты кинетического анализа частоты встречаемости В-клеток и Т-клеток в крови полностью гуманизированных NOG-мышей, обработанных (Б) антителом в виде анти-CD20/анти-CD3 ТСВ (молекула "Б" на фиг. 2Б) или (А) применяемым в качестве контроля наполнителем. D0, D7: дни инъекции терапевтического средства;

на фиг. 19 - результаты анализа экспрессии различных маркеров на поверхности периферических Т-клеток через три дня (D3) и десять дней (D10) после инъекции наполнителя (черные прямоугольники) или антитела в виде анти-CD20/анти-CD3 ТСВ (молекула "Б" на фиг. 2Б) (белые прямоугольники) полностью гуманизированным мышам;

на фиг. 20 - результаты анализа частоты встречаемости В-клеток (А), частоты встречаемости Т-клеток (Б) и экспрессии маркеров на поверхности Т-клеток (В) в селезенке у обработанных наполнителем (черные прямоугольники) или антителом в виде анти-CD20/анти-CD3 ТСВ (молекула "Б" на фиг. 2Б)

(белые прямоугольники) полностью гуманизированных мышей в момент окончания эксперимента (D10 после первой инъекции терапевтического средства);

на фиг. 21 - результаты анализа противоопухолевой активности антитела в виде анти-CD20/анти-CD3 TCB (молекула "Б" на фиг. 2Б) (0,5 мг/кг, один раз в неделю) на модели, созданной с использованием клеток линии WSU-DLCL2 на NOG-мышьях, с переносом huPBMC;

на фиг. 22 - иллюстрация молекул "2+1 IgG CrossFab, инвертированная", полученных в примере 2. (1) Молекула без модификаций зарядов, (2) молекула с модификациями зарядов в CH1- и CL-доменах молекул Fab, которые специфически связываются с ВСМА (В-клеточный антиген созревания) (ЕЕ = 147Е, 213Е; КК = 123К, 124К);

на фиг. 23 - результаты анализа методом КЭ-ДСН (дорожка А = невозстанавливающие условия, дорожка Б = восстанавливающие условия, вверху обобщены параметры для дорожки А) молекул "2+1 IgG CrossFab, инвертированная", применяемых в примере 2. Применяли различные методы очистки (аффинная хроматография на белке А (РА), гель-фильтрация (SEC), катионообменная хроматография (сIEX), и окончательная стадия гель-фильтрации (ге-SEC)) для молекулы без модификаций зарядов (83A10-TCB) и молекулы с модификациями зарядов (83A10-TCBcv);

на фиг. 24 - результаты анализа методом КЭ-ДСН (дорожка А = невозстанавливающие условия, дорожка Б = восстанавливающие условия, вверху обобщены параметры для дорожки А) молекул "2+1 IgG CrossFab, инвертированная", применяемых в примере 2, при их сравнении по принципу "голова к голове" (Н2Н) после стадий очистки аффинной хроматографией на белке А (РА) и гель-фильтрации (SEC);

на фиг. 25- результаты анализа методом проточной цитометрии связывания активирующих Т-клетки биспецифических антител к ВСМА/к CD3 с ВСМА-позитивными клеточными линиями множественной миеломы. (А) 83A10-TCB на H929-клетках и MKN45-клетках, (Б) 83A10-TCBcv на H929-клетках и MKN45-клетках, (В) сравнение 83A10-TCB и 83A10-TCBcv на H929-клетках;

на фиг. 26 - результаты анализа цитолиза ВСМА-позитивных клеток миеломы линии H929 с помощью антител в виде анти-ВСМА/анти-CD3 TCB ((А) 83A10-TCB, (Б) 83A10-TCBcv) по данным, полученным на основе высвобождения ЛДГ;

на фиг. 27 - иллюстрация TCB, полученных в примере 3. (А) "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, модификация зарядов в Her2-связывающем компоненте, ЕЕ = 147Е, 213Е; RK = 123R, 124K), (Б) "2+1 IgG CrossFab" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, модификация зарядов в Her3-связывающем компоненте, ЕЕ = 147Е, 213Е; RK = 123R, 124K);

на фиг. 28 - результаты анализа методом КЭ-ДСН TCB, полученных в примере 3 (препарат после окончательной очистки). (А) электрофореграмма Her2 TCB, представленной на 27А, (Б) электрофореграмма Her3 TCB, представленной на фиг. 27Б. Дорожка А = невозстанавливающие условия, дорожка Б = восстанавливающие условия;

на фиг. 29 - результаты анализа связывания Her2 TCB (А) и Her3 TCB (Б) с клетками, полученные с помощью FACS. Представлены медианные интенсивности флуоресценции, характеризующие связывание молекулы Her2 TCB с человеческим CD3 на клетках Jurkat (слева) или с человеческим Her2 (А) или Her3 (Б) на клетках KPL-4 (справа), измеренные с помощью проточной цитометрии. Представлены медианные величины флуоресценции по трем повторностям, включая СКО;

на фиг. 30 - результаты анализа активации Т-клеток с помощью Her3 TCB. После совместной инкубации человеческих PBMC в качестве эффекторных клеток, KPL-4 в качестве клеток-мишеней и Her3 TCB в возрастающих концентрациях измеряли процент CD69-позитивных CD8-Т-клеток с помощью FACS через 48 ч. Представлены данные по трем повторностям с СКО;

на фиг. 31 - результаты анализа активации клеток Jurkat посредством CD3 через 5 ч, полученные с помощью люминесценции. После инкубации опухолевых клеток линии KPL4 с репортерными клетками Jurkat-NFAT (Е:Т 5:1 (А) или 2,5:1 (Б)) и применяемыми в возрастающих концентрациях Her2 TCB (А) или Her3 TCB (Б) определяли активацию клеток Jurkats на основе относительных сигналов люминесценции (RLUS) через 5 ч. Величины  $EC_{50}$  рассчитывали с помощью программы Graph Pad Prism (и они составляли 34,4 пМ (А) и 22пМ (Б)). Представлены данные по трем повторностям, "усами" обозначены СКО;

на фиг. 32 - (А, Б) - результаты анализа лизиса клеток, полученные на основе высвобождения ЛДГ, после инкубации Her2-позитивных клеток-мишеней линий KPL4, N87, T47D или MDA-MB-231 с человеческими PBMC в качестве эффекторных клеток (Е:Т 10:1) и молекулой Her 2 TCB в возрастающих концентрациях в течение 25 ч (А) или 46 ч (Б). Представлены данные по трем повторностям, "усами" обозначены СКО. Величины  $EC_{50}$  рассчитывали с помощью программы Graph Pad Prism, и они составляли: 7,5 пМ (клетки KPL4), 25,6 пМ (клетки N87), 30,6 пМ (клетки T47D) и 59,9 пМ (клетки MDA-MB-231). (Б) Данные о лизисе опухолевых клеток, полученные на основе высвобождения ЛДГ, после инкубации Her3-позитивных клеток KPL4 в качестве клеток-мишеней с человеческими PBMC в качестве эффекторных клеток (Е:Т 10:1) и с применяемой в возрастающих концентрациях молекулой Her 3 TCB в течение 24 ч или 48 ч, как указано. Представлены средние значения, полученные по трем повторностям, "усами" обозначены СКО. Величины  $EC_{50}$  рассчитывали с помощью программы Graph Pad Prism, и они составля-

ли: 2,54 пМ (24 ч) и 0,53 пМ (48 ч);

на фиг. 33 - результаты анализа лизиса опухолевых клеток, индуцированного Her3 TCB, полученные на основе активности каспазы 3/7 (люминесценция). Представлен относительный сигнал люминесценции, который являлся результатом активности каспазы 3/7 в клетках-мишенях KPL-4-каспаза-3/7 GloSensor, после совместной инкубации в течение 6,5 ч с PBMC (E:T = 10:1) и с Her3 TCB в различных указанных концентрациях. Представлены данные по трем повторностям с СКО. Величину EC<sub>50</sub> рассчитывали с помощью программы Graph Pad Prism, и она составляла: 0,7 пМ;

на фиг. 34 - иллюстрация TCB, полученных в примере 4. (А) "(Fab)<sub>2</sub>-CrossFab" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, модификация зарядов в MCSP-связывающих компонентах, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (Б) "(Fab)<sub>2</sub>-CrossFab" без модификаций зарядов (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте);

на фиг. 35 - результаты анализа методом КЭ-ДСН TCB с модификациями зарядов, полученных в примере 4 (препарат после окончательной очистки): электрофореграмма молекулы (Fab)<sub>2</sub>-XFab-LC007cv, представленной на фиг. 34А. Дорожка А = невозстанавливающие условия, дорожка Б = восстанавливающие условия;

на фиг. 36 - данные о медианных интенсивностях флуоресценции, характеризующих связывание молекул TCB с человеческим MCSP на клетках MV-3 (слева) или с человеческим CD3 на клетках Jurkat (справа), полученные с помощью проточной цитометрии. Представлены медианные значения интенсивности флуоресценции по трем повторностям, включая СКО;

на фиг. 37 - результаты анализа лизиса опухолевых клеток, полученные на основе высвобождения ЛДГ, после инкубации позитивных по человеческому MCSP клеток MV-3 с PBMC в качестве эффекторных клеток (E:T 10:1) и применяемыми в возрастающих концентрациях молекулами TCB в течение 24 ч (слева) или 48 ч (справа). Представлены средние результаты, полученные по трем повторностям, "усами" обозначены СКО.

### Подробное описание изобретения

Определения.

Понятия, применяемые в настоящем описании, имеют значения, общепринятые в данной области, если ниже специально не указано иное.

В контексте настоящего описания понятие "антигенсвязывающая молекула" в наиболее широком смысле относится к молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. Примерами антигенсвязывающих молекул являются иммуноглобулины и их производные, например, фрагменты.

Понятие "биспецифическая" означает, что антигенсвязывающая молекула обладает способностью специфически связываться по меньшей мере с двумя различными антигенными детерминантами. Как правило, биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит два антигенсвязывающих сайта, каждый из которых является специфическим в отношении различных антигенных детерминант. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическая антигенсвязывающая молекула обладает способностью одновременно связываться с двумя антигенными детерминантами, прежде всего с двумя антигенными детерминантами, экспрессируемыми на двух различных клетках.

В контексте настоящего описания понятие "валентность" означает наличие определенного количества антигенсвязывающих сайтов в антигенсвязывающей молекуле. Так, понятие "одновалентное связывание с антигеном" означает наличие одного (и не более одного) специфического в отношении антигена антигенсвязывающего сайта в антигенсвязывающей молекуле. Понятие "антигенсвязывающий сайт" относится к сайту, т.е. одному или нескольким аминокислотным остаткам антигенсвязывающей молекулы, которые обеспечивают взаимодействие с антигеном. Например, антигенсвязывающий сайт антитела содержит аминокислотные остатки из гипервариабельных участков (определяющих комплементарность участков) (CDR). Нативная молекула иммуноглобулина имеет, как правило, два антигенсвязывающих сайта, молекула Fab, как правило, имеет один антигенсвязывающий сайт.

В контексте настоящего описания понятие "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидной молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью направлять субстанцию, к которой он присоединен (например, второй антигенсвязывающий фрагмент), к сайту-мишени, например, к специфическому типу опухолевой клетки или стромы опухоли, несущей антигенную детерминанту. В другом варианте осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью активировать передачу сигналов через его антиген-мишень, например, антиген комплекса Т-клеточного рецептора. Антигенсвязывающие фрагменты включают антитела и их фрагменты, что дополнительно описано ниже. Конкретные антигенсвязывающие фрагменты включают антигенсвязывающий домен антитела, который содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела и вариабельную область легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты могут содержать константные области антитела, дополнительно указанные в настоящем описании и известные в данной области. Приемлемые константные области тяжелых цепей включают любую из пяти изотипов: α, δ, ε, γ или μ. Приемлемые константные области легких цепей включают любую

из двух изотипов:  $\kappa$  и  $\lambda$ .

В контексте настоящего описания понятие "антигенная детерминанта" является синонимом понятий "антиген" и "эпитоп" и относится к сайту (например, участку, состоящему из смежных аминокислот, или конформационной конфигурации, состоящей из различных областей несмежных аминокислот) на полипептидной макромолекуле, с которой связывается антигенсвязывающий фрагмент с образованием комплекса антигенсвязывающий фрагмент-антиген. Пригодные антигенные детерминанты могут присутствовать, например, на поверхности опухолевых клеток, на поверхности инфицированных вирусом клеток, на поверхности других больных клеток, на поверхности иммунных клеток, клеток, находящихся в свободном состоянии в сыворотке крови и/или во внеклеточном матриксе (ECM). В контексте настоящего описания белки, относящиеся к антигенам (например, CD3), если не указано иное, могут представлять собой любые нативные формы белков из любого применяемого в качестве источника позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы). В конкретном варианте осуществления изобретения антиген представляет собой человеческий белок. В контексте настоящего описания при ссылке на конкретный белок подразумевается "полноразмерный", непротессированный белок, а также любая форма белка, полученная в результате процессинга в клетке. Под понятие попадают также встречающиеся в естественных условиях варианты белка, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты. Примером человеческого белка, пригодного в качестве антигена, является CD3, прежде всего эILON-субъединица CD3 (см. UniProt №. P07766 (версия 130), NCBI RefSeq №. NP\_000724.1, SEQ ID NO: 1 для человеческой последовательности или UniProt № Q95L15 (версия 49), NCBI GenBank № BAB71849.1, SEQ ID NO: 2 для последовательности обезьян циномоглус [Macaca fascicularis, яванский макак-крабод]. В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующая T-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, связывается с эпитопом CD3 или с антигеном клетки-мишени, который является консервативным для CD3, или антигеном клетки-мишени из других видов.

Понятие "специфически связывается" означает, что связывание является избирательным в отношении антигена и его можно отличать от нежелательных или неспецифических взаимодействий. Способность антигенсвязывающего фрагмента связываться со специфической антигенной детерминантой, можно определять с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или других методик, известных специалисту в данной области, например, с помощью методики на основе поверхностного плазмонного резонанса (осуществляя анализ с помощью устройства BIACore) (Liljeblad и др., Glyco J 17, 2000, сс. 323-329), и традиционных анализов связывания (Heeley, Endocr Res 28, 2002, сс. 217-229). В одном из вариантов осуществления изобретения уровень связывания антигенсвязывающего фрагмента с неродственным белком составляет менее чем примерно 10% от уровня связывания антигенсвязывающего фрагмента с антигеном, при измерении, например, с помощью SPR. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с антигеном, или антигенсвязывающая молекула, содержащая антигенсвязывающий фрагмент, характеризуется величиной константы диссоциации ( $K_D$ ), составляющей  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 0,1$  нМ или  $\leq 0,001$  нМ (например,  $10^{-8}$  М или менее, например, от  $10^{-8}$  М до  $10^{-13}$  М, например, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М).

Понятие "аффинность" относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между индивидуальным сайтом связывания молекулы (например, рецептора) и ее партнера по связыванию (например, лиганда). Если не указано иное, то в контексте настоящего описания понятие "аффинность связывания" относится к присущей компонентам связывающейся пары (например, антигенсвязывающему фрагменту и антигену или рецептору и лиганду) аффинности связывания, отражающей взаимодействие по типу 1:1. Аффинность молекулы X к ее партнеру Y можно, как правило, характеризовать с помощью константы диссоциации ( $K_D$ ), которая представляет собой отношение констант скорости реакции диссоциации и ассоциации ( $k_{off}$  и  $k_{on}$  соответственно). Так, эквивалентные аффинности могут соответствовать различным константам скорости, если соотношение констант скорости остается таким же. Аффинность можно оценивать общепринятыми методами, известными в данной области, включая методы, представленные в настоящем описании.

Конкретным методом измерения аффинности является метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Понятие "пониженное связывание (пониженная способность к связыванию)", например, пониженная способность к связыванию с Fc-рецептором, относится к снижению аффинности при соответствующем взаимодействии, измеренной, например, с помощью SPR. Для ясности следует отметить, что понятие включает также снижение аффинности до нуля (или ниже предела обнаружения аналитического метода), т.е. полную элиминацию взаимодействия. И, наоборот, "повышенное связывание (повышенная способность к связыванию)" относится к повышению аффинности связывания при соответствующем взаимодействии.

Понятие "активирующий T-клетки антиген" в контексте настоящего описания относится к антигенной детерминанте, экспрессируемой на поверхности T-лимфоцита, прежде всего цитотоксического T-лимфоцита, который обладает способностью индуцировать активацию T-клеток после взаимодействия с

антигенсвязывающей молекулой. В частности, взаимодействие антигенсвязывающей молекулы с активирующим Т-клетки антигеном может индуцировать активацию Т-клеток путем запуска каскада передачи сигналов комплекса Т-клеточного рецептора. В конкретном варианте осуществления изобретения активирующий Т-клетки антиген представляет собой CD3, прежде всего эpsilon-субъединицу CD3 (см. UniProt № P07766 (версия 130), NCBI RefSeq № NP\_000724.1, SEQ ID NO: 1 для человеческой последовательности или UniProt № Q95LI5 (версия 49), NCBI GenBank № BAB71849.1, SEQ ID NO: 2 для последовательности обезьян циномольтус [*Macaca fascicularis*]).

Понятие "Т-клеточная активация (активация Т-клеток)" в контексте настоящего описания относится к одному или нескольким клеточным ответам Т-лимфоцита, в частности, цитотоксического Т-лимфоцита, выбранным из: пролиферации, дифференцировки, секреции цитокинов, высвобождения цитотоксических эффекторных молекул, цитотоксической активности и экспрессии маркеров активации. Активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, обладают способностью индуцировать Т-клеточную активацию. Приемлемые анализы оценки Т-клеточной активации, известные в данной области, представлены в настоящем описании.

Понятие "антиген клетки-мишени" в контексте настоящего описания относится к антигенной детерминанте, которая присутствует на поверхности клетки-мишени, например, клетки в опухоли, такой как раковая клетка или клетка стромы опухоли. В конкретном варианте осуществления изобретения антиген клетки-мишени представляет собой CD20, прежде всего человеческий CD20 (см. UniProt № P11836).

В контексте настоящего описания понятия "первый", "второй" и "третий" касательно молекул Fab и т.д. применяют с целью удобства различения, когда присутствует более одного типа каждого из фрагментов. Применение этих понятий не подразумевает их конкретный порядок или ориентацию в активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекуле, если специально не указано иное.

Понятие "молекула Fab" относится к белку, состоящему из VH и CH1-домена тяжелой цепи ("тяжелая цепь Fab") и VL и CL-домена легкой цепи ("легкая цепь Fab") иммуноглобулина.

Под понятием "слиты" подразумевается, что компоненты (например, молекула Fab и субъединица Fc-домена) соединены пептидными связями, либо непосредственно, либо с помощью одного или нескольких пептидных линкеров.

В контексте настоящего описания понятие "одноцепочечная" относится к молекуле, содержащей аминокислотные мономеры, связанные линейно посредством пептидных связей. В некоторых вариантах осуществления изобретения один из антигенсвязывающих фрагментов представляет собой одноцепочечную молекулу Fab, т.е. молекулу Fab, в которой легкая цепь Fab и тяжелая цепь Fab соединены с помощью пептидного линкера с образованием одной пептидной цепи. В конкретном указанном варианте осуществления изобретения С-конец легкой цепи Fab соединен с N-концом тяжелой цепи Fab в одноцепочечной молекуле Fab.

Под кроссовер-молекулой Fab (которую обозначают также как "Crossfab") подразумевается молекула Fab, в которой переменные домены тяжелой и легкой цепи Fab обменены (т.е. заменены друг на друга), т.е. кроссовер-молекула Fab содержит пептидную цепь, состоящую из переменного домена легкой цепи VL и константного домена 1 тяжелой цепи CH1 (VL-CH1, в направлении от N- к С-концу), и пептидную цепь, состоящую из переменного домена тяжелой цепи VH и константного домена легкой цепи CL (VH-CL, в направлении от N- к С-концу). Для простоты понимания, следует отметить, что в кроссовер-молекуле Fab, в которой обменены переменные домены легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab, пептидную цепь, содержащую константный домен 1 тяжелой цепи CH1, обозначают в контексте настоящего описания как "тяжелая цепь" кроссовер-молекулы Fab.

В противоположность этому, под "канонической" молекулой Fab подразумевается молекула Fab, имеющая ее естественный формат, т.е. содержащая тяжелую цепь, состоящую из переменного и константного доменов тяжелой цепи (VH-CH1, в направлении от N- к С-концу), и легкую цепь, состоящую из переменного и константного доменов легкой цепи (VL-CL, в направлении от N- к С-концу).

Понятие "молекула иммуноглобулина" относится к белку, имеющему структуру встречающегося в естественных условиях антитела. Например, иммуноглобулины класса IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, связанных дисульфидными мостиками. В направлении от N-конца к С-концу каждая тяжелая цепь содержит переменный домен (VH), который называют также переменным тяжелым доменом или переменным доменом тяжелой цепи, за которым расположены три константных домена (CH1, CH2 и CH3), которые называют также константной областью тяжелой цепи. Аналогично этому, в направлении от N-конца к С-концу каждая легкая цепь содержит переменный домен (VL), который называют также переменным легким доменом или переменным доменом легкой цепи, за которым расположен константный домен легкой цепи (CL), который называют также константной областью легкой цепи. Тяжелая цепь иммуноглобулина может относиться к одному из пяти типов, обозначенных как  $\alpha$  (IgA),  $\delta$  (IgD),  $\epsilon$  (IgE),  $\gamma$  (IgG) или  $\mu$  (IgM), некоторые из которых дополнительно подразделяют на подтипы, например,  $\gamma_1$  (IgG<sub>1</sub>),  $\gamma_2$  (IgG<sub>2</sub>),  $\gamma_3$  (IgG<sub>3</sub>),  $\gamma_4$  (IgG<sub>4</sub>),  $\alpha_1$  (IgA<sub>1</sub>) и  $\alpha_2$  (IgA<sub>2</sub>). Легкая цепь иммуногло-

булина может относиться к одному из двух типов, обозначенных как каппа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ), на основе аминокислотной последовательности ее константного домена. Иммуноглобулин, как правило, состоит из двух молекул Fab и Fc-домена, которые соединены через шарнирную область иммуноглобулина.

В контексте настоящего описания понятие "антитело" используется в его наиболее широком смысле, и оно относится к различным структурам антител, включая (но, не ограничиваясь только ими) моноклональные антитела, поликлональные антитела и фрагменты антител, при условии, что они обладают требуемой антигенсвязывающей активностью.

Понятие "фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, обладающую способностью связываться с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примерами фрагментов антител являются (но, не ограничиваясь только ими) Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, димерные антитела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител (например, scFv) и однодоменные антитела. Обзор некоторых фрагментов антител см., например, у Hudson и др., *Nat Med* 9, 2003, сс. 129-134. Обзор scFv-фрагментов см., например, у Plückthun в: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, т. 113, под ред. Rosenberg и Moore, изд-во Springer-Verlag, New York, 1994, сс. 269-315; см. также WO 93/16185; и US №№ 5571894 и 5587458. Обсуждение Fab- и F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов, содержащих остатки эпитопа, связывающегося с рецептором спасения, и обладающих удлинённым временем полужизни *in vivo*, см. в US № 5869046. Димерные антитела представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими (см., например, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson и др., *Nat Med* 9, 2003, сс. 129-134; и Hollinger и др., *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1993, сс. 6444-6448. Тримерные (триабоды) и тетрамерные (тетрабоды) антитела описаны также у Hudson и др., *Nat Med* 9, 2003, сс. 129-134. Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь или часть варибельного домена тяжелой цепи или весь или часть варибельного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (фирма Domantis, Inc., Уолтэм, шт. Массачусетс; см., например, US № 6248516 B1). Фрагменты антител можно создавать с помощью различных методик, включая (но, не ограничиваясь только ими) протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получать с использованием рекомбинантных клеток-хозяев (например, *E. coli* или фага), как указано в настоящем описании.

Понятие "антигенсвязывающий домен" относится к части антитела, которая содержит область, специфически связывающуюся и являющуюся комплементарной части антигена или полному антигену. Антигенсвязывающий домен может представлять собой, например, один или несколько варибельных доменов антитела (которые называют также варибельными областями антитела). Прежде всего антигенсвязывающий домен содержит варибельную область легкой цепи (VL) антитела и варибельную область тяжелой цепи (VH) антитела.

Понятие "варибельная область" или "варибельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Варибельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гиперварибельных участка (HVR) (см., например, Kindt и др., *Kuby Immunology*, 6-ое изд., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). Одного VH- или VL-домена может быть достаточно для обеспечения специфичности связывания антигена.

Понятие "гиперварибельный участок" или "HVR" в контексте настоящего описания относится к каждому из участков варибельного домена антитела, последовательности которых являются гиперварибельными, и/или которые образуют структуры в виде петель ("гиперварибельные петли"). Как правило, нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). HVR, как правило, содержат аминокислотные остатки из гиперварибельных петель и/или из "определяющих комплементарность участков" (CDR), последние отличаются наиболее выраженной варибельностью последовательности и/или участвуют в распознавании антигенов. Кроме CDR1, присутствующего в VH, CDR, как правило, содержат аминокислотные остатки, которые образуют гиперварибельные петли. Понятие "гиперварибельные участки" (HVR) относится также к "определяющим комплементарность участкам" (CDR), и в контексте настоящего описания эти понятия используются взаимозаменяемо касательно положений варибельной области, которые формируют антигенсвязывающие области. Эта конкретная область описана у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 и у Chothia и др., *J. Mol. Biol.* 196, 1987, сс. 901-917, причем эти определения относятся к перекрывающимся аминокислотным остаткам или поднаборам аминокислотных остатков при их сравнении друг с другом. Однако в контексте настоящего описания подразумевается возможность применения любого определения CDR антитела или его вариантов. Соответствующие аминокислотные остатки, из которых состоят CDR, как они определены в каждой из процитированных выше ссылок, представлены в сравнении ниже в табл. 1. Точные номера остатков, которые образуют конкретный CDR, могут варьироваться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области на основе данных об аминокислотной последовательности варибельной области антитела легко могут определять, какие остатки входят в

конкретный CDR. В контексте настоящего описания последовательности CDR, как правило, пронумерованы согласно Кэботу.

Таблица 1. Определения CDR

	Кэбот	Хотиа	AbM <sup>2</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	26-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	52-58	50-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	95-102	95-102
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	24-32
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	50-56
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-97

<sup>1</sup>Нумерация всех входящих в CDR остатков в табл. 1 дана в соответствии с номенклатурой, предложенной Кэботом с соавторами (см. ниже).

<sup>2</sup>Обозначение "AbM" с прописной буквой "b", использованное в табл. 1, относится к CDR, как они определены программой для моделирования антител "AbM" компании Oxford Molecular Group.

Кэбот с соавторами предложили также систему нумерации (номенклатуру) последовательностей переменных областей, которую можно применять для любого антитела. Обычный специалист в данной области может однозначно применять эту систему "нумерации по Кэботу" к любой последовательности переменной области, не имея никаких экспериментальных данных, кроме сведений о самой последовательности. В контексте настоящего описания понятие "нумерация по Кэботу" относится к системе нумерации, описанной у Kabat и др., *Sequence of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Если не указано иное, то ссылки на нумерацию положений конкретных аминокислотных остатков в переменной области антитела даны в соответствии с системой нумерации по Кэботу. В контексте настоящего описания аминокислотные положения во всех константных областях и доменах тяжелой цепи и легкой цепи нумеруют согласно системе нумерации по Кэботу, описанной у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 и в контексте настоящего описания обозначают как "нумерация согласно Кэботу" или "нумерация по Кэботу". В частности, систему нумерации по Кэботу (см. сс. 647-660 в Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991), применяют для константного домена легкой цепи CL каппа- и лямбда-изотипа, а систему нумерации на основе EU-индекса Кэбота (см. сс. 661-723) применяют для константных доменов тяжелой цепи (CH1, шарнир, CH2 и CH3, которую в контексте настоящего описания для большей ясности обозначают в этом случае как "нумерация согласно EU-индексу Кэбота").

Нумерация полипептидных последовательностей в "Перечне последовательностей" не представляет собой нумерацию в соответствии с системой Кэбота. Однако в компетенции обычного специалиста в данной области является превращение нумерации последовательностей в "Перечне последовательностей" в нумерацию по Кэботу.

"Каркасные участки" или "FR"-участки представляют собой остатки переменных доменов, отличные от остатков гиперпеременной области (HVR). FR переменного домена, как правило, представлены четырьмя FR-доменами: FR1, FR2, FR3 и FR4. Таким образом, последовательности HVR и FR, как правило, расположены в VH (или VL) в следующем порядке: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Понятие "класс" антитела или иммуноглобулина относится к типу константного домена или константной области, входящего/входящей в тяжелую цепь. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них можно дополнительно подразделять на подклассы (изотипы), например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>. Константные домены тяжелых цепей, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, обозначают как α, δ, ε, γ и μ соответственно.

В контексте настоящего описания понятие "Fc-домен" или "Fc-область" относится к C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Понятие относится к нативной последовательности Fc-областей и вариантам Fc-областей. Хотя пограничные последовательности Fc-области в тяжелой цепи IgG могут слегка варьироваться, как правило, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако антитела, продуцируемые клетками-хозяевами, могут подвергаться посттрансляционному расщеплению одной или нескольких, прежде всего одной или двух аминокислот, начиная с C-конца тяжелой цепи. Таким образом, антитело, продуцируемое клеткой-хозяином путем экспрессии конкретной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полноразмерную тяжелую цепь, может включать полноразмерную тяжелую цепь или может включать расщепленный вариант полноразмерной тяжелой цепи (который в контексте настоящего описания обозначают также как "расщепленный вариант тяжелой цепи"). Это может представлять собой случай, когда конечные две C-концевые аминокислоты тяжелой цепи представляют собой глицин (G446) и лизин (K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В результате C-концевой лизин (Lys447) или C-концевой глицин (Gly446) и лизин (K447) Fc-области может присутствовать или отсутствовать. Аминокислотные последовательности тяжелых цепей, включающих

Fc-домены (или субъединицу Fc-домена, указанную в настоящем описании), приведены в настоящем описании без С-концевого глицин-лизинового дипептида, если не указано иное. В одном из вариантов осуществления изобретения тяжелая цепь, включающая субъединицу Fc-домена, указанную в настоящем описании, которая входит в активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, содержит дополнительный С-концевой глицин-лизиновый дипептид (G446 и K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из вариантов осуществления изобретения тяжелая цепь, включающая субъединицу Fc-домена, указанную в настоящем описании, которая входит в активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, содержит дополнительный С-концевой остаток глицина (G446, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). Композиции, предлагаемые в изобретении, такие как фармацевтические композиции, указанные в настоящем описании, содержат популяцию активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении. Популяция активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, может содержать молекулы с полноразмерной тяжелой цепью и молекулы с расщепленным вариантом тяжелой цепи. Популяция активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, может состоять из смеси молекул с полноразмерной тяжелой цепью и молекул с расщепленным вариантом тяжелой цепи, в которой по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул имеет расщепленный вариант тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления изобретения композиция, содержащая популяцию активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, содержит активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу с тяжелой цепью, которая включает субъединицу Fc-домена, указанную в настоящем описании, с дополнительным С-концевым глицин-лизиновым дипептидом (G446 и K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из вариантов осуществления изобретения композиция, содержащая популяцию активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, содержит активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу с тяжелой цепью, которая включает субъединицу Fc-домена, указанную в настоящем описании, с дополнительным С-концевым остатком глицина (G446, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В одном из вариантов осуществления изобретения указанная композиция содержит популяцию активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, которая содержит молекулы с тяжелой цепью, которые включают субъединицу Fc-домена, указанную в настоящем описании; молекулы с тяжелой цепью, которые включают субъединицу Fc-домена, указанную в настоящем описании, с дополнительным С-концевым остатком глицина (G446, нумерация согласно EU-индексу Кэбота); и молекулы с тяжелой цепью, которые включают субъединицу Fc-домена, указанную в настоящем описании с дополнительным С-концевым глицин-лизиновым дипептидом (G446 и K447, нумерация согласно EU-индексу Кэбота). Если специально не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, которую обозначают также как EU-индекс, описанной у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 (см. также выше). Понятие "субъединица" Fc-домена в контексте настоящего описания относится к одному из двух полипептидов, образующих димерный Fc-домен, т.е. к полипептиду, который содержит С-концевые константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, обладающие способностью к стабильной самоассоциации. Например, субъединица Fc-домена IgG содержит константный домен CH2 IgG и CH3 IgG.

"Модификация, усиливающая ассоциацию первой и второй субъединиц Fc-домена" представляет собой манипуляцию с пептидным каркасом или посттрансляционные модификации субъединицы Fc-домена, которые уменьшают или препятствуют ассоциации полипептида, содержащего субъединицу Fc-домена, с идентичным полипептидом с образованием гомодимера. В контексте настоящего описания модификация, усиливающая ассоциацию, включает, прежде всего, различные модификации, осуществляемые с каждой из двух субъединиц Fc-домена, предназначенных для ассоциации (т.е. первой и второй субъединиц Fc-домена), при этом, модификации дополняют друг друга таким образом, чтобы усиливать ассоциацию двух субъединиц Fc-домена. Например, модификация, усиливающая ассоциацию, может изменять структуру или заряд одной или обеих субъединиц Fc-домена таким образом, чтобы улучшать их ассоциацию стерически или электростатически соответственно. Так, (гетеро)димеризация имеет место между полипептидом, который содержит первую субъединицу Fc-домена, и полипептидом, который содержит вторую субъединицу Fc-домена, которые могут быть неидентичными, поскольку дополнительные компоненты, слитые с каждой из субъединиц (например, антигенсвязывающие фрагменты), не являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, усиливающая ассоциацию, представляет собой аминокислотную мутацию в Fc-домене, в частности, аминокислотную замену. В конкретном варианте осуществления изобретения модификация, усиливающая ассоциацию, представляет собой индивидуальную аминокислотную мутацию, в частности, аминокислотную замену, в каждой из двух субъединиц Fc-домена.

Понятие "эффektorные функции", используемое в настоящем описании, относится к видам биоло-

гической активности, присущим Fc-области антитела, которые варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примерами эффекторных функций антитела являются: способность связываться с C1q и комплементзависимая цитотоксичность (CDC), способность связываться с Fc-рецептором, антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC), антитело-обусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP), секреция цитокинов, опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора); и активация B-клеток.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятия "конструирование, сконструированный, инженерия" включают любую манипуляцию с пептидным каркасом или пост-трансляционные модификации встречающегося в естественных условиях или рекомбинантного полипептида или его фрагмента. Инженерия включает модификации аминокислотной последовательности, схемы гликозилирования или группы боковых цепей индивидуальных аминокислот, а также комбинации указанных подходов.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "аминокислотная мутация" относится к аминокислотным заменам, делециям, инсерциям и модификациям. Можно применять любую комбинацию замены, делеции, инсерции и модификации для создания конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например, пониженной способностью связываться с Fc-рецептором или повышенной ассоциацией с другим пептидом. Аминокислотная последовательность с делециями и инсерциями включает амино- и/или карбоксиконцевые делеции и инсерции аминокислот. Конкретными аминокислотными мутациями являются аминокислотные замены. Для изменения, например, характеристик связывания Fc-области, наиболее предпочтительными являются неконсервативные аминокислотные замены, т.е. замена одной аминокислоты на другую аминокислоту, имеющую другие структурные и/или химические свойства. Аминокислотные замены включают замену на не встречающиеся в естественных условиях аминокислоты или на производные встречающихся в естественных условиях двадцати стандартных аминокислот (например, на 4-гидроксипролин, 3-метилгистидин, орнитин, гомосерин, 5-гидроксилизин). Аминокислотные мутации можно создавать с помощью генетических или химических методов, хорошо известных в данной области. Генетические методы могут включать сайтнаправленный мутагенез, ПЦР, синтез генов и т.п. Подразумевается, что можно применять также методы изменения боковой группы аминокислоты, отличные от методов генетической инженерии, такие как химическая модификация. Для обозначения одной и той же аминокислотной мутации можно использовать различные обозначения. Например, замену пролина в положении 329 Fc-домена на глицин можно обозначать как 329G, G329, G<sub>329</sub>, P329G или Pro329Gly.

В контексте настоящего описания понятие "полипептид" относится к молекуле, состоящей изномеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (которые обозначают также как пептидные связи). Понятие "полипептид" относится к любой цепи, состоящей из двух или большего количества аминокислот, и не подразумевает, что продукт имеет конкретную длину. Так, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любое иное принятое понятие, относящееся к цепи, состоящей из двух или большего количества аминокислот, все подпадают под определение "полипептид", и понятие "полипептид" можно применять вместо или взаимозаменяемо с любым из указанных понятий. Подразумевается также, что понятие "полипептид" относится к продуктам, которые несут пост-экспрессионные модификации полипептида, включая (но, не ограничиваясь только ими) гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию с использованием известных защитных/блокирующих групп, протеолитическое расщепление или модификацию с помощью не встречающихся в естественных условиях аминокислот. Полипептид можно получать из встречающегося в естественных условиях биологического источника или можно получать с помощью технологии рекомбинантной ДНК, и его не обязательно транслировать с созданной нуклеотидной последовательности. Его можно создавать любым путем, включая химический синтез. Полипептид, предлагаемый в изобретении, может состоять примерно из 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 25 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 200 или более, 500 или более, 1000 или более или 2000 или более аминокислот. Полипептиды могут иметь различную трехмерную структуру, хотя они необязательно должны иметь указанную структуру. Полипептиды с определенной трехмерной структурой обозначают как полипептиды, имеющие укладку, а полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой, но которые могут легче адаптироваться к большому количеству различных конформаций, обозначают как полипептиды, не имеющие укладку.

Под "выделенным" полипептидом или его вариантом, или производным подразумевают полипептид, который не находится в его естественном окружении. При этом не требуется наличия какого-либо конкретного уровня очистки. Например, выделенный полипептид можно удалять из его нативного или естественного окружения. Полученные путем рекомбинации полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, рассматриваются как выделенные для целей настоящего изобретения, если они представляют собой нативные или рекомбинантные полипептиды, которые отделены, фракционированы или частично или полностью очищены с помощью любого приемлемого метода.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" относительно полипептидной

референс-последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-последовательности, после выравнивания последовательностей и интродукции при необходимости брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и при этом какие-либо консервативные замены не учитываются при оценке идентичности последовательностей. Сравнительный анализ для определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, которые находятся в компетенции специалиста в данной области, например, с использованием публично доступных компьютерных программ, таких как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определять соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей настоящего изобретения величину % идентичности аминокислотных последовательностей получают с использованием предназначенной для сравнения последовательностей компьютерной программы ALIGN-2. Предназначенная для сравнения последовательностей компьютерная программа ALIGN-2 разработана фирмой Genentech, Inc., и исходный код помещен на хранение вместе с документацией для пользователя в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под регистрационным номером U.S. Copyright Registration № TXU510087. Программа ALIGN-2 представляет собой публично доступную программу фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, шт. Калифорния, или ее можно компилировать из исходного кода. Программу ALIGN-2 можно компилировать для применения в операционной системе UNIX, включая цифровую версию UNIX V4.0D. В программе ALIGN-2 все параметры для сравнения последовательностей являются заданными и не должны изменяться. В ситуациях, когда ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотных последовательностей данной аминокислотной последовательности А относительно или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б (которую другими словами можно обозначать как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или отличается определенным % идентичности аминокислотной последовательности относительно или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б), рассчитывают следующим образом:

$$100 \times \text{частное } X/Y,$$

где X обозначает количество аминокислотных остатков, оцененных программой сравнительного анализа последовательностей ALIGN-2 как идентичные совпадения при сравнительном анализе последовательностей А и Б с помощью указанной программы, и где Y обозначает общее количество аминокислотных остатков в Б. Должно быть очевидно, что, когда длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности Б, то % идентичности аминокислотной последовательности А относительно аминокислотной последовательности Б не должен быть равен % идентичности аминокислотной последовательности Б относительно аминокислотной последовательности А. Если специально не указано иное, то в контексте настоящего описания все величины % идентичности аминокислотных последовательностей получают согласно процедуре, описанной в последнем из предшествующих параграфов, с помощью компьютерной программы ALIGN-2.

Понятие "полинуклеотид" относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты или конструкции, например, матричной РНК (мРНК), РНК вирусного происхождения или плазмидной ДНК (пДНК). Полинуклеотид может содержать обычную фосфодиэфирную связь или нетрадиционную связь (например, амидную связь, такую, которая присутствует в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Понятие "молекула нуклеиновой кислоты" относится к любому одному или нескольким сегментам нуклеиновой кислоты, например, фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде.

Под "выделенной" молекулой нуклеиновой кислоты или полинуклеотидом подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, т.е. ДНК или РНК, которая отделена от ее нативного окружения. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий входящий в вектор полипептид, рассматривается как выделенный для целей настоящего изобретения. Другими примерами выделенного полинуклеотида являются рекомбинантные полинуклеотиды, присутствующие в гетерологичных клетках-хозяевах, или очищенные (частично или полностью) полинуклеотиды, находящиеся в растворе. Выделенный полинуклеотид включает молекулу полинуклеотида, входящую в клетки, которые в норме содержат молекулу полинуклеотида, но молекула полинуклеотида присутствует вне хромосомы или имеет локализацию в хромосоме, отличную от ее локализации в хромосоме в естественных условиях. Выделенные молекулы РНК включают полученные *in vivo* или *in vitro* РНК-транскрипты, предлагаемые в настоящем изобретении, а также формы с позитивной и негативной цепью и двухцепочечные формы. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты, предлагаемые в настоящем изобретении, включают также указанные молекулы, полученные с помощью синтеза. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота может представлять собой регуляторный элемент или может включать регуляторный элемент, такой как промотор, сайт связывания рибосом или терминатор транскрипции.

Под нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом, имеющей/имеющим нуклеотидную последовательность, которая, например, на 95% "идентична" нуклеотидной референс-последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, подразумевается, что нуклеотидная последовательность полинуклео-

тида идентична референс-последовательности за исключением того, что полинуклеотидная последовательность может включать вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов нуклеотидной референс-последовательности. Другими словами, для получения полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 95% нуклеотидной референс-последовательности, вплоть до 5% нуклеотидов в референс-последовательности можно изымать путем делеции или заменять на другой нуклеотид, или вплоть до 5% нуклеотидов от общего количества нуклеотидов в референс-последовательности можно встраивать в референс-последовательность. Эти изменения референс-последовательности могут иметь место в положениях на 5'- или 3'-конце нуклеотидной референс-последовательности или в ином положении между этими концевыми положениями, и их встраивают либо индивидуально между остатками в референс-последовательности, либо их встраивают в референс-последовательность в виде одной или нескольких смежных групп. На практике решение вопроса о том, идентична ли конкретная полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, можно решать, как правило, с использованием известных компьютерных программ, например, указанных выше для полипептидов (например, ALIGN-2).

Понятие "кассета экспрессии" относится к полинуклеотиду, полученному с помощью рекомбинации или синтеза, который содержит серии специфических нуклеотидных элементов, которые обеспечивают транскрипцию конкретной нуклеиновой кислоты в клетке-мишени. Рекombинантную кассету экспрессии можно встраивать в плазмиду, хромосому, митохондриальную ДНК, пластидную ДНК, вирус или фрагмент нуклеиновой кислоты. Как правило, рекомбинантная кассета экспрессии, представляющая собой часть экспрессионного вектора, включает среди прочих последовательностей подлежащую транскрипции нуклеотидную последовательность и промотор. В некоторых вариантах осуществления изобретения кассета экспрессии, предлагаемая в изобретении, содержит полинуклеотидные последовательности, которые кодируют биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, или их фрагменты.

Понятие "вектор" или "экспрессионный вектор" является синонимом понятия "экспрессионная конструкция" и относится к молекуле ДНК, которую применяют для интродукции и обеспечения экспрессии конкретного гена, с которой он функционально связан в клетке-мишени. Понятие включает вектор, представляющий собой самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, встроенный в геном клетки-хозяина, в которую он интродуцирован. Экспрессионный вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит кассету экспрессии. Экспрессионные векторы позволяют осуществлять транскрипцию стабильной мРНК в больших количествах. Когда экспрессионный вектор находится внутри клетки-мишени, то молекула рибонуклеиновой кислоты или белок, который кодируется геном, продуцируется в результате клеточного механизма транскрипции и/или трансляции. В одном из вариантов осуществления изобретения экспрессионный вектор, предлагаемый в изобретении, содержит кассету экспрессии, которая включает полинуклеотидные последовательности, кодирующие биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, или их фрагменты.

В контексте настоящего описания понятия "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используются взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство указанных клеток. К клеткам-хозяевам относятся "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первичные трансформированные клетки, а также потомство, происходящее из них, независимо от количества пересевов. Потомство может не быть строго идентичным родительской клетке по составу нуклеиновых кислот, а может нести мутации. Под данное понятие подпадает мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, что и отобранная путем скрининга или селекции исходная трансформированная клетка. Клетка-хозяин представляет собой любой тип клеточной системы, которую можно применять для создания биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в настоящем изобретении. Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, такие как (но, не ограничиваясь только ими) CHO-клетки, ВНК-клетки, NSO-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы линии YO, клетки мышины миеломы линии P3X63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы, клетки дрожжей, клетки насекомых и клетки растений, но также клетки, находящиеся в трансгенном животном, трансгенном растении или в культивируемой растительной или животной ткани.

"Активирующий Fc-рецептор" представляет собой Fc-рецептор, который после взаимодействия с Fc-доменом антитела осуществляет процесс передачи сигналов, которые стимулируют несущую рецептор клетку осуществлять эффекторные функции. Человеческие активирующие Fc-рецепторы включают FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) и FcαRI (CD89).

Антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC) представляет собой иммунный механизм, приводящий к лизису сенсibilизированных антителом клеток-мишеней иммунными эффекторными клетками. Клетки-мишени представляют собой клетки, с которыми антитела или их производные, содержащие Fc-область, специфически связываются, как правило, через область белка, которая является N-концевой относительно Fc-области. В контексте настоящего описания понятие "пониженная ADCC" относится либо к снижению количества лизированных в данный момент времени клеток-

мишеней при данной концентрации антитела в среде, окружающей клетки-мишени, путем указанного выше механизма ADCC, и/или к повышению концентрации антитела в среде, окружающей клетки-мишени, необходимой для достижения лизиса данного количества клеток-мишеней в данное время с помощью механизма ADCC. Понижение ADCC-активности определяют относительно ADCC, опосредуемой таким же антителом, которое получено с помощью такого же типа клеток-хозяев с использованием одинаковых стандартных методов получения, очистки, приготовления композиций и хранения (которые известны специалистам в данной области), но которое не подвергали инженерии. Например, понижение ADCC, опосредуемой антителом, которое содержит в его Fc-домене аминокислотную замену, которая снижает ADCC, определяют относительно ADCC, опосредуемой таким же антителом без указанной аминокислотной замены в Fc-домене. Приемлемые анализы оценки ADCC хорошо известны в данной области (см., например, публикацию PCT WO 2006/082515 или публикацию PCT WO 2012/130831).

Понятие "эффективное количество" агента относится к количеству, необходимому для обеспечения физиологического изменения в клетке или ткани, в которую его вводят.

Понятие "терапевтически эффективное количество" агента, например, фармацевтической композиции, относится к количеству, эффективно при применении в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата. Терапевтически эффективное количество агента, например, элиминирует, снижает, замедляет, минимизирует или предупреждает нежелательные явления заболевания.

"Индивидуум" или "субъект" представляет собой млекопитающее. Млекопитающие представляют собой (но, не ограничиваясь только ими) одомашненных животных (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматов (например, люди и приматы кроме человека, такие как мартышки), кроликов и грызунов (например, мыши и крысы). Предпочтительно индивидуум или субъект представляет собой человека.

Понятие "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, что он обеспечивает биологическую активность входящего в его состав действующего вещества, которое должно обладать эффективностью, и который не содержит дополнительных компонентов, обладающих неприемлемой токсичностью для индивидуума, которому следует вводить композицию.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от действующего вещества, который является нетоксичным для индивидуума. Фармацевтически приемлемые носители включают (но, не ограничиваясь только ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

В контексте настоящего описания понятие "лечение" (и его грамматические вариации, такие как "лечить" или "процесс лечения") относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики, либо в процессе развития клинической патологии. Требуемыми действиями лечения являются (но, не ограничиваясь только ими) предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий болезни, предупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссия или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, применяют для задержки развития болезни или замедления прогрессирования болезни.

Понятие "листовка-вкладыш в упаковку" в контексте настоящего описания относится к инструкциям, которые обычно помещают в поступающие в продажу упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозе, пути введения, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или мерах предосторожности при применении указанных терапевтических продуктов.

Подробное описание вариантов осуществления изобретения В изобретении предложена активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула с предпочтительными свойствами для терапевтического применения, прежде всего с улучшенной технологичностью (например, касательно чистоты, выхода). Аминокислотные замены в молекулах Fab, входящих в активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, являются наиболее эффективными в отношении снижения ошибочного спаривания легких цепей с несоответствующими тяжелыми цепями (побочные продукты, образовавшиеся в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа), что может иметь место при получении на основе Fab би-/мультиспецифических антигенсвязывающих молекул с VH/VL-обменом в одном (или в большем количестве в случае молекул, которые содержат больше двух антигенсвязывающих молекул Fab) из их связывающих плечей (см. также публикацию PCT/EP2015/057165, прежде всего приведенные в ней примеры, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

Первым объектом изобретения является активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая

- (а) первую молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном;
- (б) вторую молекулу Fab, которая специфически связывается с вторым антигеном, и в которой переменные домены VL и VH легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab заменены друг на друга;

где первый антиген представляет собой активирующий Т-клетки антиген, а второй антиген представляет собой антиген клетки-мишени, или первый антиген представляет собой антиген клетки-мишени, а второй антиген представляет собой активирующий Т-клетки антиген; и

в которой

I) в константном домене CL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена на положительно заряженную аминокислоту (нумерация согласно Кэботу) и в константном домене СН1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена на отрицательно заряженную аминокислоту (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); или

II) в константном домене CL второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 124 заменена на положительно заряженную аминокислоту (нумерация согласно Кэботу) и в константном домене СН1 второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена на отрицательно заряженную аминокислоту (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Согласно изобретению активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула не содержит обе модификации, указанные в I) и II). Константные домены CL и СН1 второй молекулы Fab не заменены друг на друга (т.е. остаются необменными).

В одном из вариантов активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, в константном домене CL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и в константном домене СН1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 или аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В другом варианте осуществления изобретения в константном домене CL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) и в константном домене СН1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В конкретном варианте осуществления изобретения в константном домене CL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)) и аминокислота в положении 123 заменена независимо на лизин (K), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (K) или аргинин (R)), и в константном домене СН1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В более конкретном варианте осуществления изобретения в константном домене CL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 заменена на лизин (K) или аргинин (R) (нумерация согласно Кэботу), и в константном домене СН1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В еще более конкретном варианте осуществления изобретения в константном домене CL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 124 заменена лизин (K) (нумерация согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 заменена на аргинин (R) (нумерация согласно Кэботу), и в константном домене СН1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В конкретных вариантах осуществления изобретения константный домен CL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), относится к каппа-изотипу.

Альтернативно этому, аминокислотные замены, указанные в приведенных выше вариантах осуществления изобретения, могут быть сделаны в константном домене CL и в константном домене СН1 второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), вместо константного домена CL и константного домена СН1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а).

В конкретных вариантах осуществления изобретения константный домен CL второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), относится к каппа-изотипу.

Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, может содержать дополнительно третью молекулу Fab, которая специфически связывается с пер-

вым антигеном. В конкретных вариантах осуществления изобретения указанная третья молекула Fab идентична первой молекуле Fab, указанной в подпункте а). Согласно этим вариантам осуществления изобретения аминокислотные замены, указанные в приведенных выше вариантах осуществления изобретения, могут быть сделаны в константном домене CL и константном домене CH1 как первой молекулы Fab, так и третьей молекулы Fab. Альтернативно этому, аминокислотные замены, указанные в приведенных выше вариантах осуществления изобретения, могут быть сделаны в константном домене CL и константном домене CH1 второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), но не в константном домене CL и константном домене CH1 первой молекулы Fab и третьей молекулы Fab.

В конкретных вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, дополнительно содержит Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, которые обладают способностью к стабильной ассоциации.

Форматы активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы.

Компоненты активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы можно сливать друг с другом в различных конфигурациях. Примеры конфигураций представлены на фиг. 1.

В конкретных вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, обладающих способностью к стабильной ассоциации.

В некоторых вариантах осуществления вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом первой или второй субъединицы Fc-домена.

В одном из указанных вариантов осуществления изобретения первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab. В конкретном указанном варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула практически состоит из первой и второй молекулы Fab, Fc-домена, состоящего из первой и второй субъединиц, и необязательно из одного или нескольких пептидных линкеров, в которой первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab, а вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом первой или второй субъединицы Fc-домена. Указанная конфигурация схематически изображена на фиг. 1Ж и 1Л. Необязательно легкая цепь Fab первой молекулы Fab и легкая цепь Fab второй молекулы Fab могут быть дополнительно слиты друг с другом.

В другом указанном варианте осуществления изобретения первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом первой или второй субъединицы Fc-домена. В конкретном указанном варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула практически состоит из первой и второй молекулы Fab, Fc-домена, состоящего из первой и второй субъединиц, и необязательно из одного или нескольких пептидных линкеров, в которой первая и вторая молекулы Fab каждая слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом одной из субъединиц Fc-домена. Указанная конфигурация схематически изображена на фиг. 1А и 1Г. Первая и вторая молекулы Fab могут быть слиты с Fc-доменом непосредственно или через пептидный линкер. В конкретном варианте осуществления изобретения первая и вторая молекулы Fab каждая слита с Fc-доменом через шарнирную область иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область человеческого IgG<sub>1</sub>, прежде всего, когда Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>1</sub>.

В других вариантах осуществления изобретения первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом первой или второй субъединицы Fc-домена.

В одном из указанных вариантов осуществления изобретения вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab. В конкретном указанном варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула практически состоит из первой и второй молекулы Fab, Fc-домена, состоящего из первой и второй субъединиц, и необязательно одного или нескольких пептидных линкеров, в которой вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab, а первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом первой или второй субъединицы Fc-домена. Указанная конфигурация схематически изображена на фиг. 1З и 1М. Необязательно легкая цепь Fab первой молекулы Fab и легкая цепь Fab второй молекулы Fab могут быть дополнительно слиты друг с другом.

Молекулы Fab могут быть слиты с Fc-доменом или друг с другом непосредственно или через пептидный линкер, содержащий одну или несколько аминокислот, как правило, примерно 2-20 аминокислот. Пептидные линкеры известны в данной области и представлены в настоящем описании. Приемлемые неиммуногенные пептидные линкеры включают, например, пептидные линкеры (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, (SG<sub>4</sub>)<sub>n</sub>, (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub> или G<sub>4</sub>(SG<sub>4</sub>)<sub>n</sub>. "n" обозначает обычно число от 1 до 10, как правило, от 2 до 4. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный пептидный линкер представляет собой пептид с аминокислотной последовательностью, состоящей по меньшей мере из 5 аминокислот, в одном из вариантов осуществления состоящей из 5-100, еще в одном варианте осуществления изобретения из 10-50 аминокислот. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный пептидный линкер представляет собой (G<sub>x</sub>S)<sub>n</sub> или

$(G_xS)_nG_m$ , где G обозначает глицин, S обозначает серин и ( $x = 3, n = 3, 4, 5$  или  $6$  и  $m = 0, 1, 2$  или  $3$ ) или ( $x = 4, n = 2, 3, 4$  или  $5$  и  $m = 0, 1, 2$  или  $3$ ), в одном из вариантов осуществления изобретения  $x=4$  и  $n=2$  или  $3$ , в другом варианте осуществления изобретения  $x=4$  и  $n=2$ . В одном из вариантов осуществления изобретения указанный пептидный линкер представляет собой  $(G_4S)_2$ . Наиболее приемлемым пептидным линкером для слияния легких цепей Fab первой и второй молекулы Fab друг с другом является  $(G_4S)_2$ . Приведенный в качестве примера линкер, который можно применять для соединения тяжелых цепей Fab первого и второго Fab-фрагментов содержит последовательность (D)-(G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 11 и 12). Кроме того, линкеры могут содержать шарнирную область иммуноглобулина (ее часть). В частности, когда молекулу Fab сливают с N-концом субъединицы Fc-домена, то ее можно сливать через шарнирную область иммуноглобулина или ее часть с помощью дополнительного пептидного линкера или без него.

Активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу с одним антигенсвязывающим фрагментом (такую как молекула Fab), обладающую способностью специфически связываться с антигеном клетки-мишени (например, представленную на фиг. 1А, Г, Ж, З, Л, М), можно применять, в частности в случаях, в которых можно ожидать интернализацию антигена клетки-мишени после связывания обладающего высокой аффинностью антигенсвязывающего фрагмента. В таких случаях присутствие более одного антигенсвязывающего фрагмента, специфического в отношении антигена клетки-мишени, может повышать интернализацию антигена клетки-мишени, снижая тем самым его доступность.

Однако во многих других случаях целесообразным является получать активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая содержит два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов (таких как молекулы Fab), специфических в отношении антигена клетки-мишени (см., примеры, представленные на фиг. 1Б, 1В, 1Д, 1Е, 1И, 1К, 1Н или 1О), например, для оптимизации направленного переноса к сайту-мишени или для обеспечения перекрестного сшивания антигенов клетки-мишени.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, дополнительно содержит третью молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном. Первый антиген предпочтительно представляет собой антиген клетки-мишени. В одном из вариантов осуществления изобретения третья молекула Fab представляет собой каноническую молекулу Fab. В одном из вариантов осуществления изобретения третья молекула Fab идентична первой молекуле Fab (т.е. первая и третья молекулы Fab содержат одинаковые аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей и одинаковое расположение доменов (т.е. каноническое или кроссовер)). В конкретном варианте осуществления изобретения вторая молекула Fab специфически связывается с активирующим Т-клетки антигеном, прежде всего CD3, а первая и третья молекулы Fab специфически связываются с антигеном клетки-мишени.

В альтернативных вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, дополнительно содержит третью молекулу Fab, которая специфически связывается с вторым антигеном. В этих вариантах осуществления изобретения второй антиген предпочтительно представляет собой антиген клетки-мишени. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения третья молекула Fab представляет собой кроссовер-молекулу Fab (молекулу Fab, в которой переменные домены VH и VL тяжелой и легкой цепей Fab обменены/заменены друг на друга). В одном из вариантов осуществления изобретения третья молекула Fab идентична второй молекуле Fab (т.е. вторая и третья молекулы Fab содержат одинаковые аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей и одинаковое расположение доменов (т.е. каноническое или кроссовер)). В одном из таких вариантов осуществления изобретения первая молекула Fab специфически связывается с активирующим Т-клетки антигеном, прежде всего CD3, а вторая и третья молекулы Fab специфически связываются с антигеном клетки-мишени.

В одном из вариантов осуществления изобретения третья молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом первой или второй субъединицы Fc-домена.

В конкретном варианте осуществления изобретения вторая и третья молекулы Fab каждая слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом одной из субъединиц F-домена, а первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab. В конкретном указанном варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула практически состоит из первой, второй и третьей молекулы Fab, Fc-домена, состоящего из первой и второй субъединиц, и необязательно из одного или нескольких пептидных линкеров, в которой первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab, а вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом первой субъединицы Fc-домена и в которой третья молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом второй субъединицы Fc-домена. Указанная конфигурация схематически изображена на фиг. 1Б и 1Д (конкретные варианты осуществления изобретения, в которых третья молекула Fab представляет собой каноническую молекулу Fab и предпочтительно идентична первой молекуле Fab) и на фиг. 1И и 1Н (альтернативные варианты осуществления изобретения, в которых третья молекулу Fab представляет собой кроссовер-молекулу Fab и предпочтительно идентична второй молекуле Fab). Вторая и третья молекулы Fab могут

быть слиты с Fc-доменом непосредственно или через пептидный линкер. В конкретном варианте осуществления изобретения вторая и третья молекулы Fab каждая слита с Fc-доменом через шарнирную область иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область человеческого IgG<sub>1</sub>, прежде всего, когда Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>1</sub>. Необязательно легкая цепь первой молекулы Fab и легкая цепь второй молекулы Fab дополнительно могут быть слиты друг с другом.

В альтернативном варианте осуществления изобретения первая и третья молекулы Fab каждая слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом одной из субъединиц Fc-домена, вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab. В конкретном указанном варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула практически состоит из первой, второй и третьей молекулы Fab, Fc-домена, состоящего из первой и второй субъединиц, и необязательно одного или нескольких пептидных линкеров, в которой вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab, а первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом первой субъединицы Fc-домена, и в которой третья молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом второй субъединицы Fc-домена. Указанная конфигурация схематически изображена на фиг. 1В и 1Е (конкретные варианты осуществления изобретения, в которых третья молекула Fab представляет собой каноническую молекулу Fab и предпочтительно идентична первой молекуле Fab) и на фиг. 1К и 1О (альтернативные варианты осуществления изобретения, в которых третья молекулу Fab представляет собой кроссовер-молекулу Fab и предпочтительно идентична второй молекуле Fab). Первая и третья молекулы Fab могут быть слиты с Fc-доменом непосредственно или через пептидный линкер. В конкретном варианте осуществления изобретения первая и третья молекулы Fab каждая слита с Fc-доменом через шарнирную область иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область человеческого IgG<sub>1</sub>, прежде всего, когда Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>1</sub>. Необязательно легкая цепь первой молекулы Fab и легкая цепь второй молекулы Fab дополнительно могут быть слиты друг с другом.

В конфигурациях, в которых активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, в которой молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом каждой из субъединиц Fc-домена через шарнирные области иммуноглобулина, две молекулы Fab, шарнирные области и Fc-домен практически образуют молекулу иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения молекула иммуноглобулина представляет собой иммуноглобулин класса IgG. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин подкласса IgG<sub>1</sub>. В другом варианте осуществления изобретения иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин подкласса IgG<sub>4</sub>. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноглобулин представляет собой человеческий иммуноглобулин. В других вариантах осуществления изобретения иммуноглобулин представляет собой химерный иммуноглобулин или гуманизированный иммуноглобулин.

В некоторых вариантах активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, легкая цепь Fab первой молекулы Fab и легкая цепь Fab второй молекулы Fab слиты друг с другом необязательно через пептидный линкер. В зависимости от конфигурации первой и второй молекулы Fab легкая цепь Fab первой молекулы Fab может быть слита на ее С-конце с N-концом легкой цепи Fab второй молекулы Fab, или легкая цепь Fab второй молекулы Fab может быть слита на ее С-конце с N-концом легкой цепи Fab первой молекулы Fab. Слияние легких цепей Fab первой и второй молекулы Fab дополнительно снижает ошибочное спаривание несоответствующих тяжелых и легких цепей Fab, а также снижает количество плазмид, необходимых для экспрессии некоторых их активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении.

В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит полипептид, в котором вариабельная область легкой цепи второй молекулы Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с константной областью тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab (т.е. вторая молекула Fab содержит тяжелую цепь кроссовер-молекулы Fab, в которой вариабельная область тяжелой цепи заменена вариабельной областью легкой цепи), которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена (VL<sub>(2)</sub>-CH1<sub>(2)</sub>-CH2-CH3(-CH4)), и полипептид, в котором тяжелая цепь Fab первой молекулы Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена (VH<sub>(1)</sub>-CH1<sub>(1)</sub>-CH2-CH3(-CH4)). В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит также полипептид, в котором вариабельная область тяжелой цепи Fab второй молекулы объединена карбоксиконцевой пептидной связью с константной областью легкой цепи Fab второй молекулы Fab (VH<sub>(2)</sub>-CL<sub>(2)</sub>), и полипептид легкой цепи Fab первой молекулы Fab (VL<sub>(1)</sub>-CL<sub>(1)</sub>). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика.

В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит полипептид, в котором вариабельная область легкой цепи Fab второй молекулы Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с константной областью тяжелой

цепи Fab второй молекулы Fab (т.е. вторая молекула Fab содержит тяжелую цепь кроссовер-молекулы Fab, в которой переменная область тяжелой цепи заменена на переменную область легкой цепи), которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с тяжелой цепью Fab первой молекулы Fab, которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена ( $VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$ ).

В других вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит полипептид, в котором тяжелая цепь Fab первой молекулы Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с переменной областью легкой цепи Fab второй молекулы Fab, которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с константной областью тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab (т.е. вторая молекула Fab содержит тяжелую цепь кроссовер-молекулы Fab, в которой переменная область тяжелой цепи заменена на переменную область легкой цепи), которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена ( $VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VL_{(2)}-CH1_{(2)}-CH2-CH3(-CH4)$ ).

В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит также полипептид легкой цепи кроссовер-молекулы Fab второй молекулы Fab, в которой переменная область тяжелой цепи второй молекулы Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с константной областью легкой цепи Fab второй молекулы Fab ( $VH_{(2)}-CL_{(2)}$ ), полипептид легкой цепи первой молекулы Fab ( $VL_{(1)}-CL_{(1)}$ ). В других указанных вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит также полипептид, в котором переменная область легкой цепи Fab второй молекулы Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с константной областью тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab, которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом легкой цепи Fab первой молекулы Fab ( $VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VL_{(1)}-CL_{(1)}$ ), или полипептид, в котором полипептид легкой цепи Fab первой молекулы Fab объединен карбоксиконцевой пептидной связью с переменной областью тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab, которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с константной областью легкой цепи Fab второй молекулы Fab ( $VL_{(1)}-CL_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}$ ), если это возможно.

Согласно этим вариантам осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула может содержать также (I) полипептид субъединицы Fc-домена ( $CH2-CH3(-CH4)$ ), или (II) полипептид тяжелой цепи Fab третьей молекулы Fab, который объединен карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена ( $VH_{(3)}-CH1_{(3)}-CH2-CH3(-CH4)$ ), и полипептид легкой цепи Fab третьей молекулы Fab ( $VL_{(3)}-CL_{(3)}$ ). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула не содержит Fc-домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула практически состоит из первой и второй молекулы Fab и необязательно одного или нескольких пептидных линкеров, в которой первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab. Указанная конфигурация схематически изображена на фиг. 1П и 1У.

В других вариантах осуществления изобретения вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула не содержит Fc-домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула практически состоит из первой и второй молекулы Fab и необязательно одного или нескольких пептидных линкеров, в которой вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab. Указанная конфигурация схематически изображена на фиг. 1Р и 1Ф.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab, и активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула дополнительно содержит третью молекулу Fab, слитую на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab. В указанных конкретных вариантах осуществления изобретения указанная третья молекула Fab представляет собой каноническую молекулу Fab. В других указанных вариантах осуществления изобретения указанная третья молекула Fab представляет собой кроссовер-молекулу Fab, указанную в настоящем описании, т.е. молекулу, в которой переменные домены VH и VL тяжелой и легкой цепей Fab обменены/заменены друг на друга. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула практически состоит из первой, второй и третьей молекулы Fab и необязательно одного или нескольких пептидных линкеров, в которой первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab, а третья молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab. Указанная конфигурация

схематически изображена на фиг. 1С и 1Х (конкретные варианты осуществления изобретения, в которых третья молекула Fab представляет собой каноническую молекулу Fab и предпочтительно идентична первой молекуле Fab).

В некоторых вариантах осуществления изобретения первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab, и активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула дополнительно содержит третью молекулу Fab, в которой указанная третья молекула Fab слита на N-конце тяжелой цепи Fab с С-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab. В конкретных указанных вариантах осуществления изобретения указанная третья молекула Fab представляет собой кроссовер-молекулу Fab, указанную в настоящем описании, т.е. молекулу, в которой переменные домены VH и VL тяжелой и легкой цепей Fab обменены/заменены друг на друга. В других указанных вариантах осуществления изобретения указанная третья молекула Fab представляет собой каноническую молекулу Fab. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула практически состоит из первой, второй и третьей молекулы Fab и необязательно одного или нескольких пептидных линкеров, в которой первая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab, а третья молекула Fab слита на N-конце тяжелой цепи Fab с С-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab. Указанная конфигурация схематически изображена на фиг. 1Ч и 1Ц (конкретные варианты осуществления изобретения, в которых третья молекула Fab представляет собой кроссовер-молекулу Fab и предпочтительно идентична второй молекуле Fab).

В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab, и активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула дополнительно содержит третью молекулу Fab, в которой указанная третья молекула Fab слита на N-конце тяжелой цепи Fab с С-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab. В конкретных указанных вариантах осуществления изобретения указанная третья молекула Fab представляет собой каноническую молекулу Fab. В других указанных вариантах осуществления изобретения указанная третья молекула Fab представляет собой кроссовер-молекулу Fab, указанную в настоящем описании, т.е. молекулу, в которой переменные домены VH и VL тяжелой и легкой цепей Fab обменены/заменены друг на друга. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула практически состоит из первой, второй и третьей молекулы Fab и необязательно одного или нескольких пептидных линкеров, в которой вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab, а третья молекула Fab слита на N-конце тяжелой цепи Fab с С-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab. Указанная конфигурация схематически изображена на фиг. 1Т и 1Ц (конкретные варианты осуществления изобретения, в которых третья молекула Fab представляет собой каноническую молекулу Fab и предпочтительно идентична первой молекуле Fab).

В некоторых вариантах осуществления изобретения вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab, и активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула дополнительно содержит третью молекулу Fab, в которой указанная третья молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab. В конкретных указанных вариантах осуществления изобретения указанная третья молекула Fab представляет собой кроссовер-молекулу Fab, указанную в настоящем описании, т.е. молекулу, в которой переменные домены VH и VL тяжелой и легкой цепей Fab обменены/заменены друг на друга. В других указанных вариантах осуществления изобретения указанная третья молекула Fab представляет собой каноническую молекулу Fab. В некоторых указанных вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула практически состоит из первой, второй и третьей молекулы Fab и необязательно одного или нескольких пептидных линкеров, в которой вторая молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab, а третья молекула Fab слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab. Указанная конфигурация схематически изображена на фиг. 1Ш и 1Э (конкретные варианты осуществления изобретения, в которых третья молекула Fab представляет собой кроссовер-молекулу Fab и предпочтительно идентична первой молекуле Fab).

В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит полипептид, в котором тяжелая цепь первой молекулы Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с переменной областью второй молекулы Fab, которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с константной областью тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab (т.е. вторая молекула Fab содержит тяжелую цепь кроссовер-молекулы Fab, в которой переменная область тяжелой цепи заменена переменной областью легкой цепи) (VH<sub>(1)</sub>-CH<sub>1(1)</sub>-VL<sub>(2)</sub>-CH<sub>1(2)</sub>). В одном из вариантов осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит полипептид, в котором переменная область тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с константной областью легкой цепи Fab второй молекулы Fab (VH<sub>(2)</sub>-CL<sub>(2)</sub>), и полипептид легкой цепи Fab первой молекулы Fab (VL<sub>(1)</sub>-CL<sub>(1)</sub>).



константной областью тяжелой цепи Fab третьей молекулы Fab (т.е. третья молекула Fab содержит тяжелую цепь кроссовер-молекулы Fab, в которой переменная область тяжелой цепи заменена переменной областью легкой цепи), которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с переменной областью легкой цепи Fab второй молекулы Fab, которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с константной областью тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab (т.е. вторая молекула Fab содержит тяжелую цепь кроссовер-молекулы Fab, в которой переменная область тяжелой цепи заменена переменной областью легкой цепи), которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с тяжелой цепью Fab первой молекулы Fab (VL<sub>(3)</sub>-CH1<sub>(3)</sub>-VL<sub>(2)</sub>-CH1<sub>(2)</sub>-VH<sub>(1)</sub>-CH1<sub>(1)</sub>). В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит также полипептид, в котором переменная область тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с константной областью легкой цепи Fab второй молекулы Fab (VH<sub>(2)</sub>-CL<sub>(2)</sub>), и полипептид легкой цепи Fab первой молекулы Fab (VL<sub>(1)</sub>-CL<sub>(1)</sub>). В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит также полипептид, в котором переменная область тяжелой цепи Fab третьей молекулы Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с константной областью легкой цепи Fab третьей молекулы Fab (VH<sub>(3)</sub>-CL<sub>(3)</sub>).

Согласно любому из приведенных выше вариантов осуществления изобретения компоненты активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы (например, молекулы Fab, Fc-домен) могут быть слиты непосредственно или через различные линкеры, в частности, пептидные линкеры, содержащие одну или несколько аминокислот, как правило, примерно 2-20 аминокислот, которые представлены в настоящем описании или известны в данной области. Приемлемые неиммуногенные пептидные линкеры включают, например, пептидные линкеры (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, (SG<sub>4</sub>)<sub>n</sub>, (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub> или G<sub>4</sub>(SG<sub>4</sub>)<sub>n</sub>, в которых n обычно обозначает число от 1 до 10, как правило, от 2 до 4.

Fc-домен.

Fc-домен активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы состоит из пары полипептидных цепей, содержащих домены тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина. Например, Fc-домен молекулы иммуноглобулина G (IgG) представляет собой димер, каждая из субъединиц которого содержит константные домены CH2 и CH3 тяжелой цепи IgG. Две субъединицы Fc-домена обладают способностью к стабильной ассоциации друг с другом. В одном из вариантов осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, содержит не более одного Fc-домена.

В одном из вариантов осуществления Fc-домен активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы представляет собой Fc-домен IgG. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>1</sub>. В другом варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>4</sub>. В более конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>4</sub>, который содержит аминокислотную замену в положении S228 (нумерация по Кэботу), прежде всего аминокислотную замену S228P. Эта аминокислотная замена снижает обмен *in vivo* в Fab-плече антител в виде IgG<sub>4</sub> (см. Stubenrauch и др., Drug Metabolism and Disposition 38, 2010, сс. 84-91). В другом конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен является человеческим. Приведенная в качестве примера последовательность Fc-области человеческого IgG<sub>1</sub> представлена в SEQ ID NO: 13.

Модификации Fc-домена, усиливающие гетеродимеризацию.

Активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, содержат различные молекулы Fab, слитые с одной или с другой из двух субъединиц Fc-домена, при этом две субъединицы Fc-домена, как правило, содержатся в двух неидентичных полипептидных цепях. Рекombинантная совместная экспрессия этих полипептидов и последующая димеризация приводит к нескольким возможным комбинациям двух полипептидов. Для повышения выхода и чистоты активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул при их получении методами рекомбинации целесообразно интродуцировать в Fc-домен активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы модификацию, которая усиливает ассоциацию требуемых полипептидов.

Таким образом, в конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-домен активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, содержит модификацию, которая усиливает ассоциацию первой и второй субъединиц Fc-домена. Сайт наиболее сильного белок-белкового взаимодействия двух субъединиц Fc-домена человеческого IgG находится в CH3-доме Fc-домена. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация находится в CH3-доме Fc-домена.

Известно несколько подходов к модификациям в CH3-доме Fc-домена для усиления гетеродимеризации, которые подробно описаны, например, в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291. Как правило, при осуществлении всех указанных подходов CH3-домен первой субъединицы Fc-домена и CH3-домен второй субъединицы Fc-домена оба конструируют комплементарным образом так, чтобы каждый CH3-домен (или содержащая его тяжелая

цепь) не обладал более способностью к гомодимеризации сам с собой, но обладал усиленной способностью к гетеродимеризации с комплементарным сконструированным другим СНЗ-доменом (т.е. имеет место гетеродимеризация первого и второго СНЗ-домена и не образуются гомодимеры между двумя первыми или двумя вторыми СНЗ-доменами). Указанные различные подходы к повышению гетеродимеризации рассматриваются в качестве различных альтернатив в сочетании с модификациями тяжелых-легких цепей (обмен/замена VH и VL в одном связывающем плече и интродукция замен заряженных аминокислот с противоположными зарядами в поверхности раздела СН1/CL) в активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекуле, предлагаемой в изобретении, что снижает ошибочное спаривание и образование побочных продуктов в результате взаимодействия бенс-джонсовского типа.

В конкретном варианте осуществления изобретения указанная модификация, стимулирующая ассоциацию первой и второй субъединиц Fc-домена, представляет собой, так называемую модификацию типа "knob-in-hole" (типа "выступ-впадина"), которая включает модификацию, приводящую к образованию "выступа" в одной из двух субъединиц Fc-домена и к образованию "впадины" в другой одной из двух субъединиц Fc-домена.

Технология "knob-into-hole" описана, например, в US № 5731168; US № 7695936; у Ridgway и др., Prot Eng 9, 1996, сс. 617-621 и Carter, J Immunol Meth 248, 2001, сс. 7-15. В целом, метод включает интродукцию выпуклости ("выступ") на поверхности раздела первого полипептида и соответствующей полости ("впадина") в поверхности раздела второго полипептида, в результате выпуклость может помещаться в полость, усиливая тем самым образование гетеродимера и препятствуя образованию гомодимера. Выпуклости конструируют путем замены аминокислот с небольшими боковыми цепями на поверхности раздела первого полипептида на аминокислоты с более крупными боковыми цепями (например, на тирозин или триптофан). Компенсирующие полости идентичного или сходного с выпуклостями размера конструируют в поверхности раздела второго полипептида путем замены аминокислот с крупными боковыми цепями на аминокислоты с менее крупными боковыми цепями (например, аланин или треонин).

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретения в СНЗ-домене первой субъединицы Fc-домена активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, который имеет больший объем боковой цепи, что приводит к образованию выпуклости в СНЗ-домене первой субъединицы, которая может помещаться в полость в СНЗ-домене второй субъединицы, и в СНЗ-домене второй субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, который имеет меньший объем боковой цепи, что приводит к образованию полости в СНЗ-домене второй субъединицы, в которую может помещаться выпуклость в СНЗ-домене первой субъединицы.

Предпочтительно указанный аминокислотный остаток, который имеет большую по объему боковую цепь, выбирают из группы, включающей аргинин (R), фенилаланин (F), тирозин (Y) и триптофан (W).

Предпочтительно аминокислотный остаток, который имеет меньшую по объему боковую цепь, выбирают из группы, включающей аланин (A), серин (S), треонин (T) и валин (V).

Выпуклость и полость можно создавать путем изменения нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды, например, с помощью сайтнаправленного мутагенеза или путем пептидного синтеза.

В конкретном варианте осуществления изобретения в СНЗ-домене первой субъединицы Fc-домена (субъединица с "выступами") остаток треонина в положении 366 заменен остатком триптофана (T366W), а в СНЗ-домене второй субъединицы Fc-домена (субъединица с "впадиной") остаток тирозина в положении 407 заменен на остаток валина (Y407V). В одном из вариантов осуществления изобретения во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток треонина в положении 366 заменен на остаток серина (T366S) и остаток лейцина в положении 368 заменен на остаток аланина (L368A) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В следующем варианте осуществления изобретения в первой субъединице Fc-домена дополнительно остаток серина в положении 354 заменен на остаток цистеина (S354C) или остаток глутаминовой кислоты в положении 356 заменен на остаток цистеина (E356C), а во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток тирозина в положении 349 заменен на остаток цистеина (Y349C) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). Интродукция указанных двух остатков цистеина приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя субъединицами Fc-домена, дополнительно стабилизируя димер (Carter, J Immunol Methods 248, 2001, сс. 7-15).

В конкретном варианте осуществления изобретения первая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены S354C и T366W, а вторая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены Y349C, T366S, L368A и Y407V (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В конкретном варианте осуществления изобретения молекула Fab, которая специфически связывается с активирующим Т-клетки антигеном, слита (необязательно через молекулу Fab, которая специфически связывается с антигеном клетки-мишени) с первой субъединицей Fc-домена (которая содержит модификацию, приводящую к образованию "выступа"). Не вдаваясь в какую-либо теорию, слияние молекула Fab, которая специфически связывается с активирующим Т-клетки антигеном, с содержащей "выступ" субъединицей Fc-домена должно (дополнительно) минимизировать образование антигенсвязы-

вающих молекул, содержащих две молекулы Fab, которые обладают способностью связываться с активирующим Т-клетки антигеном (стерическое "столкновение" двух содержащих "выступ" полипептидов).

Другие методы СНЗ-модификации для усиления гетеродимеризации рассматриваются в настоящем изобретении в качестве альтернатив, и они описаны, например, в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291.

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в EP 1870459A1. Этот подход базируется на интродукции замещенных/мутаций заряженных аминокислот на аминокислоты с противоположным зарядом в конкретные аминокислотные положения в поверхности раздела СНЗ/СНЗ-доменов между двумя тяжелыми цепями. В одном варианте предпочтительными для активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, являются аминокислотные мутации R409D; K370E в одном из двух СНЗ-доменов (Fc-домена) и аминокислотные мутации D399K; E357K в другом одном из СНЗ-доменов Fc-домена (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В другом варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, содержит аминокислотную мутацию T366W в СНЗ-домене первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации T366S, L368A, Y407V в СНЗ-домене второй субъединицы Fc-домена и дополнительно аминокислотные мутации R409D; K370E в СНЗ-домене первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации D399K; E357K в СНЗ-домене второй субъединицы Fc-домена (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В другом варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, содержит аминокислотные мутации S354C, T366W в СНЗ-домене первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации Y349C, T366S, L368A, Y407V в СНЗ-домене второй субъединицы Fc-домена, или указанная активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит аминокислотные мутации Y349C, T366W в СНЗ-домене первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации S354C, T366S, L368A, Y407V в СНЗ-домене второй субъединицы Fc-домена и дополнительно аминокислотные мутации R409D; K370E в СНЗ-домене первой субъединицы Fc-домена и аминокислотные мутации D399K; E357K в СНЗ-домене второй субъединицы Fc-домена (во всех случаях нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы используют подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2013/157953. В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию T366K, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию L351D (нумерация согласно EU-индексу Кэбота). В другом варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит также аминокислотную мутацию L351K. В следующем варианте осуществления изобретения второй СНЗ-домен содержит также аминокислотную мутацию, выбранную из Y349E, Y349D и L368E (предпочтительно L368E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы используют подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2012/058768. В одном из вариантов осуществления первый СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации L351Y, Y407A, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации T366A, K409F. В другом варианте осуществления изобретения второй СНЗ-домен содержит также аминокислотную мутацию в положении T411, D399, S400, F405, N390 или K392, например, выбранную из а) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E или T411W, б) D399R, D399W, D399Y или D399K, в) S400E, S400D, S400R или S400K, г) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V или F405W, д) N390R, N390K или N390D, е) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F или K392E (нумерации согласно EU-индексу Кэбота). В следующем варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации L351Y, Y407A, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации T366V, K409F. В другом варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию Y407A, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации T366A, K409F. В следующем варианте осуществления изобретения второй СНЗ-домен дополнительно содержит аминокислотные мутации K392E, T411E, D399R и S400R (нумерации согласно EU-индексу Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы используют подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2011/143545, например, с модификацией аминокислоты в положении, выбранном из группы, включающей 368 и 409 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения в качестве альтернативы используют подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2011/090762, в котором также применяют описанному выше технологию "knobs-into-holes". В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию T366W, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию Y407A. В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию T366Y, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотную мутацию Y407T (нумерации согласно EU-индексу Кэбота).

В одном из вариантов осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая анти-

генсвязывающая молекула или ее F-домен относится к IgG<sub>2</sub>-подклассу и в качестве альтернативы используют подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2010/129304.

В альтернативном варианте осуществления изобретения модификация, усиливающая ассоциацию первой и второй субъединиц Fc-домена, представляет собой модификацию, опосредующую определяемые электростатическим действием воздействия, например, описанные в публикации PCT WO 2009/089004. В целом, указанный метод включает замену одного или нескольких аминокислотных остатков на поверхности раздела двух субъединиц Fc-домена на заряженные аминокислотные остатки, в результате чего образование гомодимера становится электростатически невыгодным, а гетеродимеризация становится электростатически выгодной. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотную замену K392 или N392 на отрицательно заряженную аминокислоту (например, глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), предпочтительно K392D или N392D), а второй СНЗ-домен содержит аминокислотную замену D399, E356, D356 или E357 на положительно заряженную аминокислоту (например, лизин (K) или аргинин (R), предпочтительно D399K, E356K, D356K или E357K, и более предпочтительно D399K или E356K). В другом варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит также аминокислотную замену K409 или R409 на отрицательно заряженную аминокислоту (например, глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D), предпочтительно K409D или R409D). В следующем варианте осуществления изобретения первый СНЗ-домен в дополнительном или альтернативном варианте содержит аминокислотную замену K439 и/или K370 на отрицательно заряженную аминокислоту (например, глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D)) (все нумерации согласно EU-индексу Кэбота).

Еще в одном варианте осуществления изобретения в качестве альтернативы используют подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2007/147901. В одном из вариантов осуществления изобретения первый СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации K253E, D282K и K322D, а второй СНЗ-домен содержит аминокислотные мутации D239K, E240K и K292D (нумерации согласно EU-индексу Кэбота).

Еще в одном варианте осуществления изобретения в качестве альтернативы можно использовать подход к гетеродимеризации, описанный в WO 2007/110205.

В одном из вариантов осуществления изобретения первая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены K392D и K409D, а вторая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены D356K и D399K (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

Модификации Fc-домена, приводящие к снижению связывания с Fc-рецептором и/или эффекторной функции.

Fc-домен придает активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекуле предпочтительные фармакокинетические свойства, включая продолжительное время полужизни в сыворотке, что обеспечивает хорошее накопление в ткани-мишени и предпочтительное соотношение распределения в ткани-крови. Однако в то же время он может приводить к нежелательной направленности активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы к клеткам, которые экспрессируют Fc-рецепторы, а не к предпочтительным несущим антиген клеткам. Кроме того, совместная активация путей передачи сигналов Fc-рецептора может приводить к высвобождению цитокинов, что в сочетании с активирующими Т-клетки свойствами и продолжительным временем полужизни антигенсвязывающей молекулы, приводит к избыточной активации цитокиновых рецепторов и серьезным побочным действиям при системном введении. Активация (несущих Fc-рецептор) иммунных клеток, отличных от Т-клеток, может даже снижать эффективность активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы из-за возможной деструкции Т-клеток, например, НК-клетками.

Таким образом, согласно конкретным вариантам осуществления изобретения Fc-домен активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, обладает пониженной аффинностью связывания с Fc-рецептором и/или пониженной эффекторной функцией по сравнению с нативным Fc-доменом IgG<sub>1</sub>. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения Fc-домен (или активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая указанный Fc-домен) характеризуется аффинностью связывания, составляющей менее чем 50%, предпочтительно менее чем 20%, более предпочтительно менее чем 10% и наиболее предпочтительно менее чем 5% от аффинности связывания с Fc-рецептором нативного Fc-домена IgG<sub>1</sub> (или активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей указанный нативный Fc-домен IgG<sub>1</sub>), и/или эффекторной функцией, составляющей менее чем 50%, предпочтительно менее чем 20%, более предпочтительно менее чем 10% и наиболее предпочтительно менее чем 5% от эффекторной функции нативного Fc-домена IgG<sub>1</sub> (или активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей указанный нативный Fc-домен IgG<sub>1</sub>). В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен (или активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая указанный Fc-домен) практически не связывается с Fc-рецептором и/или не индуцирует эффекторную функцию. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой человеческий Fc-рецептор. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор

представляет собой активирующий человеческий Fcγ-рецептор, более конкретно человеческий FcγRIIIa, FcγRI или FcγRIIa, наиболее предпочтительно человеческий FcγRIIIa. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторная функция представляет собой одну или несколько функций, выбранных из группы, включающей CDC, ADCC, ADCP и секрецию цитокинов. В конкретном варианте осуществления изобретения эффекторная функция представляет собой ADCC. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен характеризуется практической такой же аффинностью связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), что и нативный Fc-домен IgG<sub>1</sub>. Практически такое же связывание с FcRn достигается, когда Fc-домен (или активирующая T-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая указанный Fc-домен), характеризуется аффинностью связывания, составляющей более чем примерно 70%, предпочтительно более чем примерно 80%, более предпочтительно более чем примерно 90%, от аффинности связывания нативного Fc-домена IgG<sub>1</sub> (или активирующей T-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащий нативный Fc домен IgG<sub>1</sub>) с FcRn.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения Fc-домен конструируют так, чтобы он обладал пониженной аффинностью связывания с Fc-рецептором и/или пониженной эффекторной функцией по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-домен активирующей T-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит одну или несколько аминокислотных мутаций, которые снижают аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию. Как правило, в каждой из двух субъединиц Fc-домена присутствует(ют) одна или несколько одинаковых аминокислотных мутаций. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные аминокислотные мутации снижают аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз или по меньшей мере в 10 раз. Согласно вариантам осуществления изобретения, в которых имеет место более одной аминокислотной мутации, которые снижают аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором, комбинация указанных аминокислотных мутаций может снижать аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз или по меньшей мере в 50 раз. В одном из вариантов осуществления изобретения активирующая T-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая сконструированный Fc-домен, характеризуется аффинностью связывания, составляющей менее чем 20%, в частности, менее чем 10%, более предпочтительно менее чем 5% от аффинности связывания с Fc-рецептором, характерной для активирующей T-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей не подвергнутый инженерии Fc-домен. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой человеческий Fc-рецептор. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий человеческий Fc-рецептор, более конкретно человеческий FcγRIIIa, FcγRI или FcγRIIa, наиболее предпочтительно человеческий FcγRIIIa. Предпочтительно уменьшается связывание с каждым из этих рецепторов. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения снижается также аффинность связывания с компонентом системы комплемента, в частности, аффинность связывания с C1q. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения не снижается аффинность связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Практически такое же связывание с FcRn, т.е. сохранение аффинности связывания Fc-домена с указанным рецептором, достигается, когда Fc-домен (или активирующая T-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая указанный Fc-домен) характеризуется аффинностью связывания с FcRn, составляющей более чем примерно 70% от аффинности связывания с FcRn не подвергнутой инженерии формы Fc-домена (или активирующей T-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей не подвергнутую инженерии форму Fc-домена). Fc-домен или активирующая T-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, содержащие указанный Fc-домен, могут характеризоваться аффинностью, составляющей более чем примерно 80% и даже более чем примерно 90% от указанной выше аффинности. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен активирующей T-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы создают так, чтобы он обладал пониженной эффекторной функцией по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. Пониженная эффекторная функция может представлять собой (но, не ограничиваясь только ими) пониженную(ые) одну или несколько из следующих функций: пониженная комплементзависимая цитотоксичность (CDC), пониженная антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC), пониженный антитело-обусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP), пониженная секреция цитокинов, пониженное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, пониженное связывание с NK-клетками, пониженное связывание с макрофагами, пониженное связывание с моноцитами, пониженное связывание с полиморфоядерными клетками, пониженная непосредственная передача сигнала, индуцирующего апоптоз, пониженное перекрестное сшивание связанных с мишенью антител, пониженное созревание дендритных клеток или пониженное T-клеточное примирование. В одном из вариантов осуществления изобретения пониженная эффекторная функция представляет собой одну или несколько функций, выбранных из группы, вклю-

чающей пониженную CDC, пониженную ADCC, пониженный ADCP и пониженную секрецию цитокинов. В конкретном варианте осуществления изобретения пониженная эффекторная функция представляет собой пониженную ADCC. В одном из вариантов осуществления изобретения пониженная ADCC составляет меньше 20% от ADCC, индуцируемой не подвергнутым инженерии Fc-доменом (или активирующей T-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулой, содержащей не подвергнутый инженерии Fc-домен).

В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация, которая снижает аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, представляет собой аминокислотную замену. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из E233, L234, L235, N297, P331 и P329 (нумерации согласно EU-индексу Кэбота). В более конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из L234, L235 и P329 (нумерации согласно EU-индексу Кэбота). В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные замены L234A и L235A (нумерации согласно EU-индексу Кэбота). В одном из указанных вариантов осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>1</sub>, в частности, Fc-домен человеческого IgG<sub>1</sub>. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении P329. В более конкретном варианте осуществления изобретения аминокислотная замена представляет собой P329A или P329G, прежде всего P329G (нумерации согласно EU-индексу Кэбота). В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении P329 и, кроме того, аминокислотную замену в положении, выбранном из E233, L234, L235, N297 и P331 (нумерации согласно EU-индексу Кэбота). В более конкретном варианте осуществления изобретения дополнительная аминокислотная замена представляет собой E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D или P331S. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные замены в положениях P329, L234 и L235 (нумерации согласно EU-индексу Кэбота). В более конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные мутации L234A, L235A и P329G ("P329G LALA"). В одном из указанных вариантов осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>1</sub>, прежде всего Fc-домен человеческого IgG<sub>1</sub>. Комбинация аминокислотных замен "P329G LALA" практически полностью элиминирует связывание с Fcγ-рецептором (а также с компонентом) Fc-домена человеческого IgG<sub>1</sub>, что описано в публикации PCT WO 2012/130831, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. В WO 2012/130831 описаны также методы получения указанных мутантных Fc-доменов, методы изучения их свойств, таких как связывание с Fc-рецептором или эффекторные функции.

Антитела подкласса IgG<sub>4</sub> обладают пониженной аффинностью к связыванию с Fc-рецепторами и пониженными эффекторными функциями по сравнению с антителами подкласса IgG<sub>1</sub>. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен активирующих T-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, представляет собой Fc-домен IgG<sub>4</sub>, в частности Fc-домен человеческого IgG<sub>4</sub>. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен IgG<sub>4</sub> содержит аминокислотные замены в положении S228, конкретно аминокислотную замену S228P (нумерации согласно EU-индексу Кэбота). Для дополнительного снижения аффинности связывания с Fc-рецептором и/или его эффекторной функции в одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен IgG<sub>4</sub> содержит аминокислотную замену в положении L235, в частности, аминокислотную замену L235E (нумерации согласно EU-индексу Кэбота). В другом варианте осуществления изобретения Fc-домен IgG<sub>4</sub> содержит аминокислотную замену в положении P329, в частности, аминокислотную замену P329G (нумерации согласно EU-индексу Кэбота). В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен IgG<sub>4</sub> содержит аминокислотные замены в положениях S228, L235 и P329, в частности, аминокислотные замены S228P, L235E и P329G (нумерации согласно EU-индексу Кэбота). Указанные мутанты Fc-домена IgG<sub>4</sub> и их особенности связывания с Fcγ-рецептором описаны в публикации PCT WO 2012/130831/PCT/EP2012/055393, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен, характеризующийся пониженной аффинностью связывания с Fc-рецептором и/или пониженной эффекторной функцией по сравнению с нативным Fc-доменом IgG<sub>1</sub>, представляет собой Fc-домен человеческого IgG<sub>1</sub>, содержащий аминокислотные замены L234A, L235A и необязательно P329G, или Fc-домен человеческого IgG<sub>4</sub>, содержащий аминокислотные замены S228P, L235E и необязательно P329G (нумерации согласно EU-индексу Кэбота).

В некоторых вариантах осуществления изобретения элиминировали N-гликозилирование Fc-домена. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную мутацию в положении N297, в частности, аминокислотную замену аспарагина на аланин (N297A) или аспарагиновую кислоту (N297D) (нумерации согласно EU-индексу Кэбота).

Помимо Fc-доменов, описанных выше и в публикации PCT WO 2012/130831, Fc-домены с пониженной способностью связываться с Fc-рецептором и/или эффекторной функцией включают также Fc-домены с заменой одного или нескольких остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (US № 637056) (нумерации согласно EU-индексу Кэбота). К указанным мутантам Fc относятся мутанты Fc с заменами в

двух или большем количестве из аминокислотных положений 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант Fc-домена "DANA" с заменой остатков 265 и 297 на аланин (US № 7332581).

Мутантные Fc-домены можно получать путем аминокислотной делеции, замены, инсерции или модификации с использованием генетических или химических методов, хорошо известных в данной области. Генетические методы могут включать сайтнаправленный мутагенез кодирующей ДНК последовательности, ПЦР, синтез генов и т.п. Правильность нуклеотидных замен можно подтверждать, например, секвенированием.

Связывание с Fc-рецепторами можно легко определять, например, с помощью ELISA или поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием стандартного оборудования, такого как устройство BIAcore (фирма GE Healthcare), и с применением таких Fc-рецепторов, которые можно получать методом рекомбинантной экспрессии. Приемлемый указанный анализ связывания представлен в настоящем описании. Альтернативно этому, аффинность связывания Fc-доменов или активирующих клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих Fc-домен, с Fc-рецепторами можно оценивать с использованием клеточных линий, для которых известно, что они экспрессируют конкретные Fc-рецепторы, такие как человеческие NK-клетки, экспрессирующие FcγIIIa-рецептор.

Эффекторную функцию Fc-домена или активирующей T-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей Fc-домен, можно оценивать методами, известными в данной области. Приемлемый анализ для оценки ADCC представлен в настоящем описании. Другие примеры анализов *in vitro*, предназначенных для оценки ADCC-активности представляющей интерес молекулы, описаны в US № 5500362; у Hellstrom и др., Proc Natl Acad Sci USA 83, 1986, сс. 7059-7063 и Hellstrom и др., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1985, сс. 1499-1502; US № 5821337; у Bruggemann и др., J Exp Med 166, 1987, сс. 1351-1361. Альтернативно этому, можно применять методы, основанные на нерадиоактивном анализе (см., например, АСТП™ - нерадиоактивный анализ цитотоксичности с помощью проточной цитометрии (фирма CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, шт. Калифорния); и CytoTox 96® - нерадиоактивный анализ цитотоксичности (фирма Promega, Мэдисон, шт. Висконсин)). Приемлемыми эффекторными клетками для таких анализов являются мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные клетки-киллеры (NK). В альтернативном или дополнительном варианте ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, например, с использованием созданных на животных моделях, описанных у Clynes и др., Proc Natl Acad Sci USA 95, 1998, сс. 652-656.

В некоторых вариантах осуществления изобретения снижают связывание Fc-домена с компонентом системы комплемента, в частности с C1q. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых Fc-домен конструируют так, чтобы он обладал пониженной эффекторной функцией, указанная пониженная эффекторная функция включает пониженную CDC. Можно осуществлять анализы связывания C1q для решения вопроса о том, может ли активирующая T-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула связываться с C1q и, как следствие, обладает ли она CDC-активностью (см., например, анализы связывания с C1q и C3c с помощью ELISA, описанные в WO 2006/029879 и WO 2005/100402). Для оценки активации комплемента можно осуществлять анализ CDC (см., например, Gaziano-Santoro и др., J Immunol Methods 202, 1996, с. 163; Cragg и др., Blood 101, 2003, сс. 1045-1052 и Cragg и Glennie, Blood 103, 2004, сс. 2738-2743).

Антигенсвязывающие фрагменты.

Антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, является биспецифической, т.е. она содержит по меньшей мере два антигенсвязывающих фрагмента, обладающих способностью специфически связываться с двумя различными антигенными детерминантами. Согласно изобретению антигенсвязывающие фрагменты представляют собой молекулы Fab (т.е. антигенсвязывающие домены, состоящие из тяжелой и легкой цепи, каждая из которых содержит переменный и константный домен). В одном из вариантов осуществления изобретения указанные молекулы Fab являются человеческими. В другом варианте осуществления изобретения указанные молекулы Fab являются гуманизированными. В следующем варианте осуществления изобретения указанные молекулы Fab содержат константные домены человеческой тяжелой и легкой цепи.

По меньшей мере один из антигенсвязывающих фрагментов представляет собой кроссовер-молекулу Fab. Указанные модификации препятствуют ошибочному спариванию тяжелых и легких цепей из различных молекул Fab, повышая тем самым выход и чистоту активирующей T-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, при рекомбинантном получении. В конкретной кроссовер-молекуле Fab, которую можно применять для создания активирующей T-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, обменены переменные домены легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab (VL и VH соответственно). Однако даже при указанном обмене доменов полученная активирующая T-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула может содержать определенные побочные продукты, образовавшиеся в результате так называемого взаимодействия бенс-джонсовского типа между тяжелыми и легкими цепями (см. Schaefer и др., PNAS, 108, 2011, сс. 11187-11191).

Для дополнительного снижения ошибочного спаривания тяжелых и легких цепей из различных мо-

лекул Fab и повышения в результате этого чистоты и выхода требуемой активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, интродуцируют заряженные аминокислоты с противоположными зарядами в конкретные аминокислотные положения в СН1- и СL-доменах либо молекулы(л) Fab специфически связывающейся(ихся) в антигене клетки-мишени, либо молекулы Fab, специфически связывающейся с активирующим Т-клетки антигеном. Модификации зарядов осуществляют либо в канонической(их) молекуле(ах) Fab, входящей(их) в активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу (например, представленную на фиг. 1 А-В, Ж-К), или в кроссовер-молекуле(ах) Fab, входящей(их) в активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу (например, представленную на фиг. 1 Г-Е, Л-О) (но не в обоих типах молекул). В конкретных вариантах осуществления изобретения модификации зарядов осуществляют в канонической(их) молекуле(ах) Fab, входящей(их) в активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу (которая(ые) в конкретных вариантах осуществления изобретения специфически связывается(ются) с антигеном клетки-мишени).

В конкретном варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула обладает способностью одновременно связываться с антигеном клетки-мишени, в частности, антигеном опухолевой клетки, и с активирующим Т-клетки антигеном, в частности, CD3. В одном из вариантов осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула обладает способностью обеспечивать перекрестное сшивание Т-клетки и клетки-мишени в результате одновременного связывания с антигеном клетки-мишени и с активирующим Т-клетки антигеном. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения указанное одновременное связывание приводит к лизису клетки-мишени, в частности, опухолевой клетки. В одном из вариантов осуществления изобретения указанное одновременное связывание приводит к активации Т-клетки. В других вариантах осуществления изобретения указанное одновременное связывание приводит к клеточному ответу Т-лимфоцита, прежде всего цитотоксического Т-лимфоцита, выбранному из группы, включающей: пролиферацию, дифференцировку, секрецию цитокинов, высвобождение цитотоксических эффекторных молекул, цитотоксическую активность и экспрессию маркеров активации. В одном из вариантов осуществления изобретения связывание активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы с активирующим Т-клетки антигеном, в частности, CD3, без одновременного связывания с антигеном клетки-мишени не приводит к Т-клеточной активации.

В одном из вариантов осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула обладает способностью переориентировать цитотоксическую активность Т-клетки к клетке-мишени. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная переориентация не зависит от опосредуемой ГКГС презентации пептидного антигена клеткой-мишенью и/или от специфичности Т-клетки.

В частности, согласно любому из вариантов осуществления изобретения Т-клетка, предлагаемая в изобретении, представляет собой цитотоксическую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения Т-клетка представляет собой CD4 - или CD8 -Т-клетку, прежде всего CD8 -Т-клетку.

Активирующая Т-клетки антигенсвязывающая молекула Fab.

Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, содержит по меньшей мере одну молекулу Fab, которая специфически связывается с активирующим Т-клетки антигеном (которую в контексте настоящего описания обозначают также как "активирующая Т-клетки антигенсвязывающая молекула Fab"). В конкретном варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит не более одной молекулы Fab (или другую молекулу Fab), которая обладает способностью специфически связываться с активирующим Т-клетки антигеном. В одном из вариантов осуществления изобретения для активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы характерно одновалентное связывание с активирующим Т-клетки антигеном.

В конкретных вариантах осуществления изобретения молекула Fab, которая специфически связывается с активирующим Т-клетки антигеном, представляет собой кроссовер-молекулу Fab, указанную в настоящем описании, т.е. молекулу Fab, в которой переменные домены VH и VL тяжелой и легкой цепей Fab обменены/заменены друг на друга. В указанных вариантах осуществления изобретения молекула(ы) Fab, которая(ые) специфически связывается(ются) с антигеном клетки-мишени, представляет(ют) собой каноническую молекулу Fab. В вариантах осуществления изобретения, в которых более одной молекулы Fab, которая специфически связывается с антигеном клетки-мишени, содержится в активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекуле, молекула Fab, специфически связывающаяся с активирующим Т-клетки антигеном, предпочтительно представляет собой кроссовер-молекулу Fab, а молекулы Fab, которые специфически связываются с антигеном клетки-мишени, представляют собой канонические молекулы Fab.

В альтернативных вариантах осуществления изобретения молекула Fab, которая специфически связывается с активирующим Т-клетки антигеном, представляет собой каноническую молекулу Fab. В указанных вариантах осуществления изобретения молекула(ы) Fab, которая(ые) специфически связывается(ются) с антигеном клетки-мишени, представляет(ют) собой кроссовер-молекулу Fab, указанную в на-

стоящем описании, т.е. молекулу Fab, в которой переменные домены VH и VL тяжелой и легкой цепей Fab обменены/заменены друг на друга.

В конкретном варианте осуществления изобретения активирующий Т-клетки антиген представляет собой CD3, прежде всего человеческий CD3 (SEQ ID NO: 1) или CD3 обезьян циномогус (SEQ ID NO: 2), наиболее предпочтительно человеческий CD3. В конкретном варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки антигенсвязывающая молекула обладает перекрестной реактивностью к (т.е. специфически связывается с) CD3 человека и обезьян циномогус. В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующий Т-клетки антиген представляет собой эпислон-субъединицу CD3 (CD3 эпислон).

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающая активирующий Т-клетки антиген молекула Fab специфически связывается с CD3, прежде всего CD3 эпислон, и содержит по меньшей мере один гиперпеременная участок (CDR) тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, и по меньшей мере один CDR легкой цепи, выбранный из группы SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывающая CD3 молекула Fab содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, который имеет SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, который имеет SEQ ID NO: 5, CDR3 тяжелой цепи, который имеет SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, который имеет SEQ ID NO: 8, CDR2 легкой цепи, который имеет SEQ ID NO: 9, и CDR3 легкой цепи, который имеет SEQ ID NO: 10.

В другом варианте осуществления изобретения связывающая CD3 молекула Fab содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, который имеет SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи, который имеет SEQ ID NO: 67, CDR3 тяжелой цепи, который имеет SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, который имеет SEQ ID NO: 68, CDR2 легкой цепи, который имеет SEQ ID NO: 9, и CDR3 легкой цепи, который имеет SEQ ID NO: 10.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывающая CD3 молекула Fab содержит последовательность переменной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 3, и последовательность переменной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 7.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывающая CD3 молекула Fab содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывающая CD3 молекула Fab содержит последовательность переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 и последовательность переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 7.

Молекула Fab, связывающая антиген клетки-мишени.

Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в изобретении, содержит по меньшей мере одну молекулу Fab, которая специфически связывается с антигеном клетки-мишени (обозначенная также в контексте настоящего описания как "молекула Fab, связывающая антиген клетки-мишени"). В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит две молекулы Fab, которые специфически связываются с антигеном клетки-мишени. В конкретном указанном варианте осуществления изобретения каждая из этих молекул Fab специфически связывается с одной и той же антигенной детерминантой. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения все указанные молекулы Fab являются идентичными, т.е. они содержат одинаковые аминокислотные последовательности, включая одинаковые аминокислотные замены в CH1- и CL-домене, указанные в настоящем описании (если они присутствуют). В одном из вариантов осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит молекулу иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном клетки-мишени. В одном из вариантов осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит не более двух молекул Fab, которые специфически связываются с антигеном клетки-мишени.

В конкретных вариантах осуществления изобретения молекула(ы) Fab, которая(ые) специфически связывается(ются) с антигеном клетки-мишени, представляет(ют) собой каноническую молекулу Fab. В указанных вариантах осуществления изобретения молекула(ы) Fab, которая(ые) специфически связывается(ются) с активирующим Т-клетки антигеном, представляет(ют) собой кроссовер-молекулу Fab, указанную в настоящем описании, т.е. молекулу Fab, в которой переменные домены VH и VL тяжелой и легкой цепи Fab обменены/заменены друг на друга.

В альтернативных вариантах осуществления изобретения молекула(ы) Fab, которая(ые) специфически связывается(ются) с антигеном клетки-мишени, представляет(ют) собой кроссовер-молекулу Fab, указанную в настоящем описании, т.е. молекулу Fab, в которой переменные домены VH и VL тяжелой и легкой цепи Fab обменены/заменены друг на друга. В указанных вариантах осуществления изобретения молекул(ы) Fab, которая(ые) специфически связывается(ются) в активирующим Т-клетки антигеном, представляет(ют) собой каноническую молекулу Fab.

Молекула Fab, связывающая антиген клетки-мишени, связывается с конкретной антигенной детерминантой и обладает способностью направлять активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу к сайту-мишени, например, к конкретному типу опухолевой клетки, которая несет указанную антигенную детерминанту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающая антиген клетки-мишени молекула Fab специфически связывается с антигеном клеточной поверхности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающая антиген клетки-мишени молекула Fab направлена к антигену, ассоциированному с патологическим состоянием, такому как антиген, презентируемый опухолевой клеткой или инфицированной вирусом клеткой. Приемлемыми антигенами являются антигены клеточной поверхности, например (но, не ограничиваясь только ими), рецепторы клеточной поверхности. В конкретных вариантах осуществления изобретения антиген клетки-мишени представляет собой человеческий антиген. Примерами антигенов клеток-мишеней являются CD20, Her2, Her3, MCSP (ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан, который известен также как протеогликан хондроитинсульфата 4) или BCMA (человеческий В-клеточный антиген (мишень) созревания), который известен также как представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 17 17 (UniProt Q02223)).

В конкретных вариантах осуществления изобретения антиген клетки-мишени представляет собой CD20, прежде всего человеческий CD20. В одном из вариантов осуществления изобретения антиген клетки-мишени представляет собой CD20, и молекула Fab, которая специфически связывается с указанным антигеном клетки-мишени, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую гипервариабельный участок (CDR)1, имеющий SEQ ID NO: 46, CDR 2 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 47, и CDR 3 тяжелой цепи, имеющий SEQ ID NO: 48, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR 1 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 49, CDR 2 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 50, и CDR 3 легкой цепи, имеющий SEQ ID NO: 51. В другом варианте осуществления изобретения антиген клетки-мишени представляет собой CD20, и молекула Fab, которая специфически связывается с указанным антигеном клетки-мишени, содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 30, и вариабельную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 31. В следующем варианте осуществления изобретения антиген клетки-мишени представляет собой CD20, и молекула Fab, которая специфически связывается с указанным антигеном клетки-мишени, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 30 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 31. В конкретном варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит полипептид, который по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 18, полипептид, который по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 19, полипептид, который по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 20, и полипептид, который по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 21. В другом варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20 и полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21. В другом варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит полипептид, который по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 32, полипептид, который по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 19, полипептид, который по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 20, и полипептид, который по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 21. В другом варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 32, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20 и полипептидную последовательность SEQ ID NO: 21. В следующем варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит полипептид, который по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 36, полипептид, который по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 37, полипептид, который по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 38, и полипептид, который по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 39. В другом варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 36, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 37, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 38 и полипептидную последовательность SEQ ID NO: 39. В следующем варианте осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит полипептид, который по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 40, полипептид, который по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен последовательности SEQ



собой антигенсвязывающий фрагмент.

Полинуклеотиды, кодирующие активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, можно экспрессировать в виде индивидуального полинуклеотида, который кодирует полную активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, или в виде нескольких (например, двух или большего количества) совместно экспрессируемых полинуклеотидов. Полипептиды, кодируемые совместно экспрессируемыми полинуклеотидами, можно соединять, например, через дисульфидные связи или другими путями с образованием функциональной активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы. Например, часть молекулы Fab, представляющая собой легкую цепь, может кодироваться полинуклеотидом, отличным от полинуклеотида, кодирующего часть активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, представляющей собой тяжелую цепь молекулы Fab, субъединицу Fc-домена и необязательно другую молекулу Fab (ее часть). При совместной экспрессии полипептиды тяжелой цепи должны связываться с полипептидами легкой цепи с образованием молекулы Fab. В другом примере часть активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащая одну из двух субъединиц Fc-домена и необязательно одну или несколько молекул Fab (их части), может кодироваться полинуклеотидом, отличным от полинуклеотида, который кодирует часть активирующей Т-клетки антигенсвязывающей молекулы, содержащую вторую из двух субъединиц Fc-домена и необязательно молекулу Fab (ее часть). При совместной экспрессии субъединицы Fc-домена должны связываться с образованием Fc-домена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенный полинуклеотид кодирует полную указанную в настоящем описании активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении. В других вариантах осуществления изобретения выделенный полинуклеотид кодирует полипептиды, входящие в указанную в настоящем описании активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полинуклеотид или нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В других вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой РНК, например, в форме матричной РНК (мРНК). РНК, предлагаемая в настоящем изобретении, может быть одноцепочечной или двухцепочечной.

#### Методы рекомбинации.

Активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, можно получать, например, путем твердофазного пептидного синтеза (например, твердофазный синтез Меррифилда) или методом рекомбинации. Для рекомбинантного получения один или несколько полинуклеотидов, кодирующих активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу (фрагмент), например, описанную выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дополнительного клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Указанный полинуклеотид можно легко выделять и секвенировать с помощью общепринятых процедур. Одним из вариантов осуществления изобретения является вектор, предпочтительно экспрессионный вектор, содержащий один или несколько полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении. Методы, хорошо известные специалистам в данной области, можно применять для конструирования экспрессионных векторов, содержащих кодирующую последовательность активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы (фрагмента) наряду с соответствующими контролирующими транскрипцию/трансляцию сигналами. Эти методы включают технологии рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и рекомбинации/генетической рекомбинации *in vivo* (см., например, методы, описанные у Maniatis и др., Maniatis и др., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; и Ausubel и др., *Current Protocols in Molecular Biology*, изд-во Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989). Экспрессионный вектор может представлять собой часть плазмиды, вируса или может представлять собой фрагмент нуклеиновой кислоты. Экспрессионный вектор включает кассету экспрессии, в которой полинуклеотид, кодирующий активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу (фрагмент) (т.е. кодирующую область), клонируют с обеспечением функциональной связи с промотором и/или другими элементами, контролирующими транскрипцию или трансляцию. В контексте настоящего описания "кодирующая область" представляет собой часть нуклеиновой кислоты, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) не транслируется в аминокислоту, он, в случае его присутствия, может рассматриваться как часть кодирующей области, однако любые фланкирующие последовательности, например, промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны, 5'- и 3'-нетранслируемые области и т.п., не являются частью кодирующей области. Две или большее количество кодирующих областей может присутствовать в индивидуальной полинуклеотидной конструкции, например, индивидуальном векторе, или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например, отдельных (различных) векторах. Кроме того, любой вектор может содержать одну кодирующую область или может содержать две или большее количество кодирующих областей, например, вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, может кодировать один или несколько полипептидов, которые пост- или котрансляционно разделяются на конечные белки посредством протеолитического расщепления. Кроме того, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кисло-

та, предлагаемый/предлагаемая в изобретении, может кодировать гетерологичные кодирующие области, либо слитые, либо не слитые с полинуклеотидом, который кодирует активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу (фрагмент), предлагаемую в изобретении, или ее вариант или производное. Гетерологичные кодирующие области включают (но, не ограничиваясь только ими) специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен. Функциональная связь имеет место, когда кодирующая область генного продукта, например полипептида, ассоциирована с одной или несколькими регуляторными последовательностями таким образом, чтобы экспрессия генного продукта находилась под воздействием или контролем регуляторной(ых) последовательности(ей). Два ДНК-фрагмента (таких как кодирующая область полипептида и ассоциированный с ней промотор) являются "функционально связанными", если индукция промоторной функции приводит к транскрипции мРНК, кодирующей требуемый генный продукт, и если природа связи между двумя ДНК-фрагментами не оказывает воздействия на способность регулирующих экспрессию последовательностей направлять экспрессию генного продукта, или не оказывает воздействия на способность ДНК-матрицы к транскрипции. Таким образом, промоторная область должна быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если промотор обладает способностью осуществлять транскрипцию нуклеиновой кислоты. Промотор может представлять собой специфический для клетки промотор, который обеспечивает значительную транскрипцию ДНК только в предварительно отобранных клетках. Другие контролирующие транскрипцию элементы, помимо промотора, например, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, можно функционально связывать с полинуклеотидом для обеспечения специфической для клетки транскрипции. Приемлемые промоторы и другие контролирующие транскрипцию области представлены в настоящем описании. Специалистам в данной области известно широкое разнообразие контролирующих транскрипцию областей. Они включают (но, не ограничиваясь только ими) контролирующие транскрипцию области, которые функционируют в клетках позвоночных животных, такие как (но, не ограничиваясь только ими) сегменты промоторов и энхансеров из цитомегаловирусов (например, немедленно-ранний промотор в сочетании с интроном-А), обезьяньего вируса 40 (например, ранний промотор) и ретровирусов (таких как вирус саркомы Рауса). Другие контролирующие транскрипцию области включают области, происходящие из генов позвоночных животных, таких как ген актина, белка теплового шока, бычьего гормона роста и кроличьего  $\beta$ -глобина, а также другие последовательности, которые могут контролировать экспрессию генов в эукариотических клетках. Дополнительные приемлемые контролирующие транскрипцию области включают тканеспецифические промоторы и энхансеры, а также индуцибельные промоторы (например, промоторы, индуцируемые тетрациклинами). Аналогично этому, обычным специалистам в данной области известно широкое разнообразие контролирующих трансляцию элементов. Они включают (но, не ограничиваясь только ими) сайты связывания рибосом, кодоны инициации трансляции и терминирующие кодоны и элементы, происходящие из вирусных систем (в частности внутренний сайт связывания (посадки) рибосом или IRES, который обозначают также как CITE-последовательность). Кассета экспрессии может включать также другие характерные структуры, такие как сайт инициации репликации и/или интегрированные в хромосому элементы, такие как длинные концевые повторы (LTR) ретровирусов, или инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV).

Кодирующие области полинуклеотида и нуклеиновой кислоты, предлагаемые в настоящем изобретении, могут быть ассоциированы с дополнительными кодирующими областями, которые кодируют секреторные или сигнальные пептиды, которые направляют секрецию полипептида, кодируемого полинуклеотидом, предлагаемым в настоящем изобретении. Например, если требуется секреция активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, то ДНК, кодирующую сигнальную последовательность, можно помещать против хода транскрипции относительно нуклеиновой кислоты, кодирующей активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, или ее фрагмент. Согласно гипотезе, касающейся сигналов, белки, секретируемые клетками млекопитающих, имеют сигнальный пептид или секреторную лидерную последовательность, который/которая отщепляется от зрелого белка после инициации экспорта растущей белковой цепи через шероховатый эндоплазматический ретикулум. Обычным специалистам в данной области должно быть очевидно, что полипептиды, секретируемые клетками позвоночных животных, как правило, имеют сигнальный пептид, слитый с N-концом полипептида, который отщепляется от транслируемого полипептида с образованием секретируемой или "зрелой" формы полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения используют нативный сигнальный пептид, например, сигнальный пептид тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина или функциональное производное указанной последовательности, которое сохраняет способность обеспечивать секрецию полипептида, функционально связанного с ним. Альтернативно этому, можно применять гетерологичный сигнальный пептид млекопитающих или его функциональное производное. Например, лидерную последовательность дикого типа можно заменить на лидерную последовательность человеческого тканевого активатора плазминогена (ТРА) или мышинной  $\beta$ -глокуронидазы.

ДНК, кодирующую короткую белковую последовательность, которую можно применять для облег-

чения дальнейшей очистки (например, гистидиновую метку), или предназначенную для мечения активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, можно включать внутрь или на концы полинуклеотида, кодирующего активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу (фрагмент).

Дополнительным вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, содержащая один или несколько полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является клетка-хозяин, содержащая один или несколько векторов, предлагаемых в изобретении. Полинуклеотиды и векторы могут обладать любыми особенностями, индивидуально или в сочетании, указанными в настоящем описании касательно полинуклеотидов и векторов соответственно. В одном из таких вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин содержит (например, трансформирована или трансфектирована) вектором, содержащим полинуклеотид, который кодирует активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении (или ее часть). В контексте настоящего описания понятие "клетка-хозяин" относится к любому типу клеточной системы, которую можно конструировать для получения активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, или их фрагментов. Клетки-хозяева, пригодные для репликации и для поддержания экспрессии активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, хорошо известны в данной области. Такие клетки можно трансфектировать или трансдуцировать соответствующим образом конкретным экспрессионным вектором и можно выращивать большее количество содержащих вектор клеток с целью внесения в ферментеры для крупномасштабных процессов получения активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы в достаточных для клинических применений количествах. Приемлемыми клетками-хозяевами являются прокариотические микроорганизмы, такие как *E. coli*, или различные эукариотические клетки, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки насекомых или т.п. Например, полипептиды можно получать в бактериях, в частности, когда отсутствует потребность в гликозилировании. После экспрессии полипептид можно выделять из пасты бактериальных клеток в растворимую фракцию и можно дополнительно очищать. Помимо прокариот, в качестве хозяев для клонирования или экспрессии векторов, которые кодируют полипептид, можно использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были "гуманизированы", что позволяет получать полипептид с частично или полностью человеческой схемой гликозилирования (см. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22, 2004, сс. 1409-1414 и Li и др., *Nat. Biotech.* 24, 2006, сс. 210-215). Клетки-хозяева, которые можно использовать для экспрессии (гликозилированных) полипептидов, получают также из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных животных). Примерами клеток беспозвоночных являются клетки насекомых, а также можно применять клетки растений. Были выявлены многочисленные бакуловирусные штаммы и соответствующие пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, прежде всего для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. В качестве хозяев можно применять также культуры растительных клеток (см., например, US №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описание технологии PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях). В качестве хозяев можно применять также клетки позвоночных животных. Например, можно использовать клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Другими примерами приемлемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная с помощью SV40 (COS-7); линия клеток почки эмбриона человека (293, Graham и др., *J. Gen. Virol.*, 36, 1977, с. 59); клетки почки детеныша хомяка (ВНК); клетки Сертоли мыши (ТМ4-клетки, описанные, например, у Mather, *Biol. Reprod.*, 23, 1980, сс. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, у Mather и др., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383, 1982, сс. 44-68); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другими ценными линиями клеток-хозяев млекопитающих являются клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая dhfr<sup>-</sup>-CHO-клетки (Urlaub и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1980, с. 4216); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор конкретных линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно применять для производства белка, см., например, у Yazaki и Wu, в: *Methods in Molecular Biology* под ред. В.К.С. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268. Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки бактерий и клетки растений (но не ограничиваясь только ими), а также клетки, находящиеся в организме трансгенного животного, трансгенного растения или культивируемой растительной или животной ткани. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, предпочтительно клетку млекопитающего, такую как клетка яичника китайского хомячка (CHO), клетка почки человеческого эмбриона (HEK) или лимфоидная клетка (например, клетка Y0, NS0, Sp20).

В данной области известны стандартные технологии для экспрессии чужеродных генов в этих системах. Клетки, экспрессирующие полипептид, содержащий либо тяжелую, либо легкую цепь антигенсвязывающего домена, такого как антитело, можно конструировать таким образом, чтобы в них происходи-

ла экспрессия других цепей антитела, например, таким образом, чтобы экспрессируемый продукт представлял собой антитело, которое имеет как тяжелую, так и легкую цепь.

Одним из вариантов осуществления изобретения является способ получения активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, заключающийся в том, что культивируют клетку-хозяина, содержащую полинуклеотид, который кодирует активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, представленную в настоящем описании, в условиях, пригодных для экспрессии активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, и выделяют активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

Компоненты активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы генетически сливают друг с другом. Активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу можно создавать так, чтобы ее компоненты сливать друг с другом непосредственно или косвенно через линкерную последовательность. Состав и длину линкера можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области, и можно оценивать эффективность. Примеры линкерных последовательностей, расположенных между различными компонентами активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, представлены в приведенных в настоящем описании последовательностях. Можно включать также дополнительные последовательности для встраивания сайта расщепления, если требуется разделение индивидуальных компонентов слияния, например, последовательность, распознаваемую эндопептидазой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько антигенсвязывающих фрагментов активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул содержит(ат) по меньшей мере переменную область антитела, обладающую способностью связываться с антигенной детерминантой. Переменные области могут образовывать часть встречающихся в естественных условиях или не встречающихся в естественных условиях антител или их фрагментов или могут происходить из них. Методы получения поликлональных антител и моноклональных антител хорошо известны в данной области (см., например, Harlow и Lane, "Antibodies: a Laboratory Manual", изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Не встречающиеся в естественных условиях антитела можно создавать с помощью твердофазного пептидного синтеза, можно получать с помощью методов рекомбинации (например, описанных в US № 4186567) или можно получать, например, путем скрининга комбинаторных библиотек, содержащих переменные области тяжелых цепей и переменные области легких цепей (см., например, US № 5969108 на имя McCafferty).

Антитела, фрагменты антител, антигенсвязывающие домены или переменные области из любых видов животных можно применять в активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекулах, предлагаемых в изобретении. Примерами антител, фрагментов антител, антигенсвязывающих доменов или переменных областей, которые можно применять согласно настоящему изобретению, являются (но, не ограничиваясь только ими) конструкции, полученные из организма мышей, приматов или человека. Если активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула предназначена для применения на человеке, то можно использовать химерную форму антитела, в которой константные области антитела получают из человеческого антитела. Гуманизированную или полностью человеческую форму антитела можно получать также с помощью методов, хорошо известных в данной области (см., например, US № 5565332 на имя Winter). Для осуществления гуманизации можно применять различные методы, такие как (но, не ограничиваясь только ими) (а) трансплантация нечеловеческих (например, из антитела-донора) CDR в человеческий (например, антитело-реципиент) каркасный участок и константные области, сохраняющие или не сохраняющие имеющее решающее значение остатки каркасного участка (например, остатки, важные для сохранения хорошей антигенсвязывающей аффинности или функций антитела), (б) трансплантация только нечеловеческих определяющих специфичность участков (SDR или a-CDR; остатки имеют решающее значение для взаимодействия антитело-антиген) в человеческие каркасные и константные области, или (в) трансплантация полных нечеловеческих переменных доменов, но их "маскировка" напоминаящим человеческий сегментом путем замены поверхностных остатков. Обзор гуманизированных антител и методов их получения см., например, у Almagro и Fransson, *Front Biosci* 13, 12008, сс. 1619-1633, и они описаны также, например, у Riechmann и др., *Nature* 332, 1988, сс. 323-329; Queen и др., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1989, сс. 10029-10033; US, №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Jones и др., *Nature* 321, 1986, сс. 522-525; Morrison и др., *Proc Natl Acad Sci* 81, 1984, сс. 6851-6855; Morrison и Oi, *Adv Immunol* 44, 1988, сс. 65-92; Verhoeven и др., *Science* 239, 1988, сс. 1534-1536; Padlan, *Molec Immunol* 31(3), 1994, сс.169-217; Kashmiri и др., *Methods* 36, 2005, сс. 25-34 (описание трансплантации SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 1991, сс. 489-498 (описание "вторичного покрытия"); Dall'Acqua и др., *Methods* 36, 2005, сс. 43-60 (описание "перестановки FR") и Osbourn и др., *Methods* 36, 2005, сс. 61-68, и Klimka и др., *Br J Cancer* 83, 2000, сс. 252-260 (описание подхода на основе "целенаправленной селекции" для перестановки FR).

Человеческие антитела и человеческие переменные области можно получать с помощью различных методов, известных в данной области. Человеческие антитела описаны в целом, у van Dijk и van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 2001, сс. 368-374 и Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 2008, сс. 450-459. Че-

ловеческие переменные области могут образовывать часть человеческих моноклональных антител или могут быть получены из них с помощью метода гибридом (см., например, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, сс. 51-63). Человеческие антитела и человеческие переменные области можно получать также путем введения иммуногена трансгенному животному, которое модифицировано таким образом, что может продуцировать интактные человеческие антитела или интактные антитела с человеческими переменными областями в ответ на контрольное заражение антигеном (см., например, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 2005, сс. 1117-1125). Человеческие антитела и человеческие переменные области можно создавать также путем выделения последовательностей переменных областей Fv-клона, отобранных из человеческих фаговых дисплейных библиотек (см., например, Hoogenboom и др. в: *Methods in Molecular Biology*, под ред. O'Brien и др., изд-во Human Press, Totowa, NJ, 178, 2001, сс. 1-37); и McCafferty и др., *Nature* 348, 552-554; Clackson и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628). Фаг, как правило, экспонирует фрагменты антител либо в виде одноцепочечных Fv- (scFv)-фрагментов, либо в виде Fab-фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты, пригодные для применения согласно настоящему изобретению, создают так, чтобы они обладали повышенной аффинностью связывания, например, с помощью методов, описанных в публикации заявки на патент США № 2004/0132066, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки. Способность активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, связываться со специфической антигенной детерминантой можно оценивать количественно либо с помощью твердофазного ферментного анализа (ELISA), либо другими методиками, известными специалисту в данной области, например, с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (осуществляя анализ с использованием системы BIACORE T100) (Liljeblad и др., *Glyco J* 17, 2000, сс. 323-329), и традиционных анализов связывания (Heeley, *Endocr Res* 28, 2002, сс. 217-229). Анализы в условиях конкуренции можно применять для идентификации антитела, фрагмента антитела, антигенсвязывающего домена или переменного домена, конкурирующего с референс-антителом за связывание с конкретным антигеном, например, антитела, которое конкурирует с антителом V9 за связывание с CD3. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанное конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается референс-антитело. Подробные приведенные в качестве примеров методы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены у Morris, "Epitope Mapping Protocols", в: *Methods in Molecular Biology*, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 66, 1996. При осуществлении приведенного в качестве примера анализа в условиях конкуренции иммобилизованный антиген (например, CD3) инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с антигеном (например, антитело V9, описанное в US 6054297), и вторым немеченым антителом, которое подлежит тестированию в отношении его способности конкурировать с первым антителом за связывание с антигеном. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный антиген инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не содержащем второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, обеспечивающих связывание первого антитела с антигеном, избыток несвязанного антитела удаляют и оценивают количество метки, ассоциированной с иммобилизованным антигеном. Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным антигеном, существенно снижено в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это свидетельствует о том, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с антигеном (см. Harlow и Lane. *Antibodies: A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, гл. 14, 1988).

Активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, полученные с помощью представленных в настоящем описании методов, можно очищать с использованием известных в данной области методик, таких как жидкостная хроматография высокого разрешения, ионообменная хроматография, гель-электрофорез, аффинная хроматография, гель-фильтрация и т.п. Фактические условия, применяемые для очистки конкретного белка, зависят, в частности, от таких факторов, как чистый заряд, гидрофобность, гидрофильность и т.д., и они должны быть очевидны специалисту в данной области. Для очистки антитела с помощью аффинной хроматографии можно использовать лиганд, рецептор или антиген, с которым связывается активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула. Например, для очистки с помощью аффинной хроматографии активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, можно использовать матрикс с белком А или белком G. Например, последовательное применение аффинной хроматографии на белке А или G и гель-фильтрации можно применять для выделения активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы практически согласно методу, описанному в разделе "Примеры". Чистоту активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы можно определять с помощью любого из широкого разнообразия хорошо известных аналитических методов, включая гель-электрофорез, жидкостную хроматографию высокого давления и т.п. Например, установлено, что содержащие тяжелые цепи слитые белки, которые экспрессировали согласно описанным в разделе "Примеры" методам, являются интактными и правильно собранными, что продемонстрировано с помощью ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях (см., например, фиг. 3). Разделяли три полосы, соответствующие

примерно Mг 25000, Mг 50000 и Mг 75000, которые соответствовали предсказанным молекулярным массам легкой цепи, тяжелой цепи и слитому белку тяжелая цепь/легкая цепь активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы.

#### Анализы.

Активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно идентифицировать, подвергать скринингу или характеризовать их физические/химические свойства и/или виды биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области.

#### Анализы аффинности.

Аффинность активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы к Fc-рецептору или антигену-мишени можно определять с помощью методов, изложенных в разделе "Примеры", с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используя стандартную инструментальную базу, например, устройство BIAcore (фирма GE Healthcare), и рецепторы или белки-мишени, которые можно получать с помощью рекомбинантной экспрессии. Альтернативно этому, связывание активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул с различными рецепторами или антигенами-мишенями можно оценивать с использованием клеточных линий, экспрессирующих конкретный рецептор или антиген-мишень, например, с помощью проточной цитометрии (FACS). Конкретный иллюстративный и приведенный в качестве примера вариант измерения аффинности связывания описан ниже в разделе "Примеры".

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения величину  $K_D$  измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса с помощью устройства BIACORE® T100 (фирма GE Healthcare) при 25°C.

Для анализа взаимодействия между Fc-областью и Fc-рецепторами меченный с помощью His рекомбинантный Fc-рецептор "захватывали" с помощью антитела к пента-His (фирма Qiagen), иммобилизованного на CM5-чипах, и биспецифические конструкции применяли в качестве анализируемых субстанций (аналитов). В целом метод состоял в следующем: биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, фирма GE Healthcare) активировали с помощью гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антитело к пента-His разводили 10 мМ ацетатом натрия, pH 5,0 до концентрации 40 мкг/мл перед инъекцией со скоростью потока 5 мкл/мин для достижения примерно 6500 единиц ответа (RU) связанного белка. После инъекции лиганда инъецировали 1М этаноламин для блокады непрореагировавших групп. Затем осуществляли "захват" Fc-рецептора в течение 60 с в концентрации 4 или 10 нМ. Для кинетических измерений инъецировали четырехкратные серийные разведения биспецифической конструкции (диапазон от 500 до 4000 нМ) в буфере HBS-EP+ (фирма GE Healthcare, 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТК, 0,05% сурфактанта P20, pH 7,4) при 25°C со скоростью потока 30 мкл/мин в течение 120 с.

Для определения аффинности к антигену-мишени биспецифические конструкции "захватывали" с помощью специфического в отношении человеческого Fab антитела (фирма GE Healthcare), которое иммобилизовали на поверхности активированного сенсорного CM5-чипа согласно методу, описанному для антитела к пента-His. Конечное количество сшитого белка составляло примерно 12000 RU. Осуществляли "захват" биспецифических конструкций в течение 90 с в концентрации 300 нМ. Антигены-мишени пропускали через проточные ячейки в течение 180 с в диапазоне концентраций от 250 до 1000 нМ со скоростью потока 30 мкл/мин. Мониторинг диссоциации осуществляли в течение 180 с.

Различия всех показателей преломления корректировали путем вычитания ответа, полученного в проточной референс-ячейке. Ответ на стационарной стадии использовали для определения константы диссоциации ( $K_D$ ) с помощью аппроксимации нелинейной кривой изотермы связывания Ленгмюра. Скорость реакции ассоциации ( $k_{on}$ ) и реакции диссоциации ( $k_{off}$ ) рассчитывали с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1 (программа BIACORE® T100 Evaluation Software, версия 1.1.1) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия реакции диссоциации ( $K_D$ ) рассчитывали как соотношение  $k_{off}/k_{on}$  (см., например, Chen и др., J Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881).

#### Анализы активности.

Биологическую активность активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, можно определять с помощью различных анализов, описанных в разделе "Примеры". Виды биологической активности могут включать, например, индукцию пролиферации Т-клеток, индукцию передачи сигнала в Т-клетках, индукцию экспрессии маркеров активации в Т-клетках, индукцию секреции цитокинов Т-клетками, индукцию лизиса клеток-мишеней, таких как опухолевые клетки, и индукцию регресса опухоли и/или повышение выживаемости.

#### Композиции, препаративные формы и пути введения.

Следующим объектом изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие любую из активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в настоя-

шем описании, например, предназначенные для применения в любом из указанных ниже терапевтических способов. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любую из активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любую из активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, указанное ниже.

Кроме того, представлен способ получения активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, в форме, пригодной для введения *in vivo*, заключающийся в том, что (а) получают активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, и (б) объединяют в препаративной форме активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем, где приготовленный препарат активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы пригоден для применения *in vivo*.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат в терапевтически эффективном количестве одну или несколько активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, которая(ые) растворена(ы) или диспергирована(ы) в фармацевтически приемлемом носителе. Понятия "фармацевтически или фармакологически приемлемый" относится к молекулярным субстанциям и композициям, которые, в целом, нетоксичны для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях, т.е. не вызывают вредные, аллергические или другие нежелательные реакции при введении при необходимости животному, такому, например, как человек. Приготовление фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере одну активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу и необязательно дополнительное действующее вещество, должно быть очевидно специалистам в данной области в свете настоящего описания, например, из справочника Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-ое изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, включенного в настоящее описание в качестве ссылки. Кроме того, очевидно, что препараты, предназначенные для введения животному (например, человеку), должны удовлетворять требованиям стандартов стерильности, пирогенности и общей безопасности и чистоты, разработанных отделением биологических стандартов FDA (Управление контроля пищевых продуктов и лекарственных средств) или соответствующим уполномоченным органом других стран. Предпочтительными композициями являются лиофилизированные препаративные формы или водные растворы. В контексте настоящего описания "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, буферы, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты), агенты для придания изотоничности, замедляющие абсорбцию агенты, соли, белки, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, полимеры, гели, связующие вещества, эксципиенты, разрыхлители, замасливатели, подслащивающие вещества, корригенты, красители и подобные материалы и их комбинации, которые должны быть известны обычному специалисту в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-ое изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, сс. 1289-1329, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). В терапевтических или фармацевтических композициях можно применять любой общепринятый носитель, если только он совместим с действующим веществом.

Композиция может содержать различные типы носителей в зависимости от того, вводят ли ее в твердой, жидкой или аэрозольной форме, и от того, должна ли она быть стерильной, как в случае использования таких путей введений, как инъекция. Активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении (и любое дополнительное терапевтическое средство), можно вводить внутривенно, внутрикожно, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутрь повреждения, внутрь черепа, внутрь сустава, внутрь предстательной железы, внутрь селезенки, внутрирентально, внутриплеврально, внутритрахеально, внутриназально, внутрь стекловидного тела, внутривагинально, внутриректально, внутрь опухоли, внутримышечно, внутрибрюшинно, подкожно, подконъюнктивально, интравезикулярно, в слизистую оболочку, интраперикардially, внутрь пуповины, интраокулярно, орально, топикально, место, путем ингаляции (например, аэрозольной ингаляции), инъекции, инфузии, непрерывной инфузии, локализованной перфузии, омывающей непосредственно клетки-мишени, через катетер, посредством лаважа, в виде кремов, в липидных композициях (например, липосомах), или с помощью любого другого метода или любой комбинации вышеуказанных путей, известных обычному специалисту в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-ое изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Для введения молекул полипептидов, таких как активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, наиболее часто применяют парентеральное введение, в частности, внутривенную инъекцию.

Парентеральные композиции включают композиции, созданные для введения путем инъекции, например, подкожной, внутрикожной, внутрь повреждения, внутривенной, внутриартериальной, внутримышечной, подоболочечной или внутрибрюшинной инъекции. Для инъекции активирующие Т-клетки

биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, можно включать в препаративные формы в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический соляной буфер. Раствор может содержать предназначенные для получения препаративной формы агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно этому, активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы могут находиться в порошкообразной форме, предназначенной для восстановления перед применением приемлемым наполнителем, например, стерильной не содержащей пирогенов водой. Стерильные инъекционные растворы приготавливаются путем включения активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, в требуемом количестве в соответствующий растворитель при необходимости в сочетании с различными другими ингредиентами, перечисленными ниже. Стерильность можно легко обеспечивать, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных действующих веществ в стерильный наполнитель, который содержит основную дисперсионную среду и/или другие ингредиенты. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, суспензий или эмульсий предпочтительными методами получения являются вакуумная сушка или сушка вымораживанием, которые позволяют получать порошок действующего вещества в сочетании с любым дополнительным требуемым ингредиентом из предварительно стерилизованной фильтрацией жидкой среды. При необходимости жидкая среда перед осуществлением инъекции должна быть соответствующим образом забуферена и жидкому разбавителю сначала придана изотоничность с помощью достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Композиция должна быть стабильной с условиях приготовления и хранения и защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Принято поддерживать загрязнение эндотоксинами на минимальном безопасном уровне, например, менее 0,5 нг/мг белка. Пригодные фармацевтически приемлемые носители включают (но не ограничиваясь только ими): буферы, такие как фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмонийхлорид; гексаметонийхлорид; бензалконийхлорид; бензетонийхлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол, резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и мета-крезол); низкомолекулярные (содержащие менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Водные суспензии для инъекций могут содержать соединения, которые повышают вязкость суспензии, такие как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, сорбит, декстран или т.п. Необязательно суспензия может содержать также приемлемые стабилизаторы или агенты, которые повышают растворимость соединений, что позволяет получать высококонцентрированные растворы. Кроме того, суспензии действующих веществ можно получать в виде соответствующих масляных предназначенных для инъекции суспензий. Приемлемые липофильные растворители или наполнители включают жирные нелетучие масла, такие как кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, такие как этилолеаты или триглицериды, или липосомы.

Действующие вещества можно заключать в микрокапсулы, например, полученные с помощью методов коацервации или межфазной полимеризации, например в гидроксипропилметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидные системы введения лекарственного средства (например, в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (18-ое изд., изд-во Mack Printing Company, 1990). Можно приготавливать препараты с замедленным высвобождением. Приемлемыми примерами препаратов с замедленным высвобождением являются полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, включающие полипептид, такие матрицы представляют собой изделия определенной формы, например, пленки или микрокапсулы. В конкретном варианте осуществления изобретения для достижения пролонгированной абсорбции инъекционной композиции можно применять в композиции агенты, замедляющие абсорбцию, такие, например, как моностеарат алюминия, желатин или их комбинации.

Помимо описанных выше композиций, активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы можно приготавливать также в виде препарата в форме депо. Указанные препаративные формы длительного действия можно применять путем имплантации (например, подкожной или внутримышечной) или внутримышечной инъекции. Так, например, активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы можно включать в препаративные формы в сочетании с приемлемыми полимерными или гидрофобными материалами (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменными смолами, или в виде умеренно растворимых производных, например, умеренно растворимой соли.

Фармацевтические композиции, содержащие активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, можно приготавливать с помощью общепринятых процессов смешения, растворения, эмульгирования, капсулирования, захвата или лиофилизации. Фармацевтические композиции можно включать в препаративные формы с помощью общепринятого метода с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей, эксципиентов или вспомогательных веществ, которые облегчают обработку белков, с получением препаратов, которые можно применять в фармацевтических целях. Соответствующая форма зависит от выбранного пути введения.

Активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы можно включать в композиции в виде свободной кислоты или свободного основания, в нейтральной форме или в форме соли. Фармацевтически приемлемые соли представляют собой соли, которые практически сохраняют биологическую активность свободной кислоты или свободного основания. Они включают кислотно-аддитивные соли, например, соли, образованные со свободными аминогруппами белковой композиции, или образованные с неорганическими кислотами, такими, например, как соляная или фосфорная кислота, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная или миндальная кислота. Соли, образованные со свободной карбоксильной группой, можно получать также из неорганических оснований, таких, например, как гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа; или таких органических оснований как изопропиламин, триметиламин, гистидин или прокаин. Фармацевтические соли имеют тенденцию к более высокой растворимости в водных и других протонных растворителях по сравнению с соответствующими формами в виде свободных оснований.

Способы и композиции для терапевтического применения.

Любую из активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, можно применять в терапевтических способах. Активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, можно использовать в качестве иммунотерапевтических агентов, например, при лечении различных видов рака.

Для применения в терапевтических методах активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, можно включать в состав препаративных форм, дозировать и вводить в соответствии с надлежащей клинической практикой. Рассматриваемые в этом контексте факторы включают конкретное нарушение, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причину заболевания, область введения агента, метод введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам.

Одним из объектов изобретения являются активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения в качестве лекарственного средства. Следующими объектами изобретения являются активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения при лечении заболевания. Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения в способе лечения. Одним из вариантов осуществления изобретения является активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, предназначенная для применения при лечении заболевания у индивидуума, который нуждается в этом. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предназначенная для применения в способе лечения индивидуума, который имеет заболевание, заключающемся в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение. В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ заключается также в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, противораковое средство, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. Дополнительными вариантами осуществления изобретения является активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, представленная в настоящем описании, предназначенная для применения с целью индукции лизиса клетки-мишени, в частности опухолевой клетки. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предназначенная для применения в способе индукции лизиса клетки-мишени, в частности опухолевой клетки, у индивидуума, заключающемся в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу для индукции лизиса клетки-мишени. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека.

Следующим объектом изобретения является применение активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, для производства или приготовления лекарственного средства. В одном из вариантов осуществления изобретения лекарственное средство пред-

назначено для лечения заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом. В другом варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения заболевания, заключающемся в том, что вводят индивидууму, который имеет заболевание, в терапевтически эффективном количестве лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение. В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ заключается также в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, противораковое средство, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. В другом варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для индукции лизиса клетки-мишени, в частности опухолевой клетки. В следующем варианте осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе индукции лизиса клетки-мишени, в частности опухолевой клетки, у индивидуума, заключающемся в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве лекарственное средство для индукции лизиса клетки-мишени. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения может представлять собой млекопитающее, предпочтительно человека.

Следующим объектом изобретения является способ лечения заболевания. В одном из вариантов осуществления изобретения способ заключается в том, что вводят индивидууму, имеющему указанное заболевание, в терапевтически эффективном количестве активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения указанному индивидууму вводят композицию, которая содержит активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, в фармацевтически приемлемой форме. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение. В предпочтительном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ заключается также в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например, противораковое средство, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения может представлять собой млекопитающее, предпочтительно человека.

Следующим объектом изобретения является способ индукции лизиса клетки-мишени, в частности, опухолевой клетки. В одном из вариантов осуществления изобретения способ заключается в том, что приводят в контакт клетку-мишень с активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулой, предлагаемой в изобретении, в присутствии Т-клетки, в частности, цитотоксической Т-клетки. Другим объектом изобретения является способ индукции лизиса клетки-мишени, в частности, опухолевой клетки. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ заключается в том, что вводят индивидууму в эффективном количестве активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу для индукции лизиса клетки-мишени. В одном из вариантов осуществления изобретения "индивидуум" представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение, прежде всего рак. Примерами рака являются (но, не ограничиваясь только ими) рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак матки, рак шейки матки, рак эндометрия, рак пищевода, рак ободочной кишки, колоректальный рак, ректальный рак, рак желудка, рак предстательной железы, рак крови, рак кожи, плоскоклеточная карцинома, рак кости и рак почки. Другие нарушения клеточной пролиферации, которые можно лечить с использованием активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в настоящем изобретении, включают (но, не ограничиваясь только ими) неоплазмы, локализованные в: животе, кости, молочной железе, пищеварительной системе, печени, поджелудочной железе, брюшине, эндокринных железах (надпочечник, парашитовидная, гипофиз, яички, яичник, тимус, щитовидная), глазу, голове и шеи, нервной системе (центральной и периферической), лимфатической системе, тазовой области, коже, мягкой ткани, селезенке, грудном отделе и мочеполовой системе. Также под объем изобретения подпадают предраковые состояния или повреждения и метастазы рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак выбирают из группы, включающей почечноклеточный рак, рак кожи, рак легкого, колоректальный рак, рак молочной железы, рак головного мозга, рак головы и шеи. Специалисту в данной области должно быть очевидно, что во многих случаях активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула не может обеспечивать исцеление, а может только оказывать частичное благоприятное воздействие. В некоторых вариантах осуществления изобретения физиологические изменения, характеризующиеся некоторым благоприятным действием, рассматриваются также как терапевтически ценные. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения количество активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которое обеспечивает физиологическое изменение, рассматривается как "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество". Субъект, пациент или инди-

видуум, нуждающийся в лечении, представляет собой, как правило, млекопитающее, более конкретно человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, вводят в эффективном количестве в клетку. В других вариантах осуществления изобретения активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, вводят в терапевтически эффективном количестве индивидууму для лечения болезни.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая доза активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении (при ее применении индивидуально или в сочетании с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими средствами), должна зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, пути введения, веса тела пациента, типа активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, серьезности и течения заболевания, от того, вводят ли активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу в превентивных или терапевтических целях, предшествующих или осуществляемых одновременно терапевтических вмешательств, истории болезни пациента и ответа на активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу и предписания лечащего врача. Практикующий специалист, ответственный за введение, в любом случае, должен определять концентрацию действующего(их) вещества(в) в композиции и соответствующую(ие) дозу(ы) для индивидуального пациента. Различные схемы введения доз включают (но, не ограничиваясь только ими) однократное введение или несколько введений в различные моменты времени, болюсное введение и пульсирующую инфузию.

Активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу можно вводить пациенту в виде одной обработки или серий обработок. В зависимости от типа и серьезности заболевания возможная начальная доза активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы для введения пациенту, например, с использованием одного или нескольких индивидуальных введений или с помощью непрерывной инфузии, может составлять примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-10 мг/кг). Типичная суточная доза может составлять от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от отмеченных выше факторов. Для повторных введений в течение нескольких дней или более продолжительного периода в зависимости от состояния лечение, как правило, должно продолжаться до достижения требуемого подавления имеющихся симптомов заболевания. В качестве примера, доза активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы может составлять от примерно 0,005 до примерно 10 мг/кг. В другом примере (но, не ограничиваясь только указанным) доза на одно введение может составлять от примерно 1, примерно 5, примерно 10, примерно 50, примерно 100, примерно 200, примерно 350, примерно 500 мкг/кг веса тела, примерно 1, примерно 5, примерно 10, примерно 50, примерно 100, примерно 200, примерно 350, примерно 500 до примерно 1000 мг/кг веса тела или более, и находиться в любом указанном диапазоне. В качестве примеров (но, не ограничиваясь только ими) указанного диапазона значений, можно вводить от примерно 5 до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 5 мкг/кг веса тела до примерно 500 мг/кг веса тела и т.д. с учетом указанных выше уровней доз. Так, пациенту можно вводить одну или несколько доз, составляющих примерно 0,5, 2,0, 5,0 или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Указанные дозы можно вводить прерывисто, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, чтобы пациент получал от примерно двух до примерно двадцати или, например, примерно шесть доз активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы). Можно вводить начальную более высокую ударную дозу, после которой применять одну или несколько более низких доз.

Однако можно использовать другие схемы введения доз. Успех такой терапии легко оценивать с помощью общепринятых методик и анализов.

Активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, как правило, следует применять в количестве, эффективном для достижения поставленной цели. При применении для лечения или предупреждения болезненного состояния активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, или их фармацевтические композиции, вводят или применяют в терапевтически эффективном количестве. Определение терапевтически эффективного количества находится в компетенции специалистов в данной области, прежде всего в свете представленного подробного описания изобретения.

Для системного введения терапевтически эффективную дозу можно сначала определять с помощью анализов *in vitro*, например, анализов с использованием клеточных культур. Затем дозу можно включать в форму для изучения на животных моделях для достижения концентрации в кровотоке, находящейся в диапазоне, включающем значение  $IC_{50}$ , определенное на клеточной культуре. Указанную информацию можно использовать для более точного определения доз, которые можно применять на людях.

Начальные дозы можно оценивать также, исходя из данных, полученных *in vivo*, например, на животных моделях, используя методики, хорошо известные в данной области. Обычный специалист в данной области легко может оптимизировать применение на людях на основе данных, полученных на животных.

Уровень доз и интервал можно регулировать индивидуально для получения уровней в плазме акти-

вирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, которые являются достаточными для поддержания терапевтического действия. Обычные дозы, предназначенные для введения пациенту путем инъекции, составляют от примерно 0,1 до 50 мг/кг/день, как правило, от примерно 0,5 до 1 мг/кг/день. Для достижения терапевтически эффективных уровней в плазме можно вводить несколько доз каждый день. Уровни в плазме можно оценивать, например, с помощью ЖХВР.

В случаях местного применения или избирательного поглощения эффективная местная концентрация активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул может не соответствовать концентрации в плазме. Специалист в данной области может оптимизировать терапевтически эффективные местные дозы без чрезмерных экспериментов.

Применение в терапевтически эффективной дозе активирующих Т-клетки биспецифических антигенсвязывающих молекул, представленных в настоящем описании, должно, как правило, обеспечивать терапевтическую пользу, не вызывая существенной токсичности. Токсичность и терапевтическую эффективность активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы можно определять с помощью стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или экспериментальных животных. Анализы на клеточных культурах или опыты на животных можно применять для определения значений LD<sub>50</sub> (доза, смертельная для 50% популяции) и ED<sub>50</sub> (доза, терапевтически эффективная для 50% популяции). Соотношение доз, характеризующих токсические и терапевтические действия, обозначают как терапевтический индекс, который можно выражать в виде соотношения LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, имеющие высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. В одном из вариантов осуществления изобретения активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, предлагаемая в настоящем изобретении, характеризуется высоким терапевтическим индексом. Данные, полученные в анализах с использованием клеточных культур и в опытах на животных, можно применять для определения диапазона доз, которые можно применять на людях. Доза лежит предпочтительно в диапазоне концентраций в кровотоке, которые включают ED<sub>50</sub>, обладающих невысокой токсичностью или совсем не обладающих токсичностью. Доза может варьироваться в зависимости от различных факторов, например, от применяемой лекарственной формы, применяемого пути введения, состояния индивидуума и т.п. Точную препаративную форму, путь введения и дозу может выбирать индивидуально врач в зависимости от состояния пациента (см., например, Fingl и др. в: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, гл. 1, 1975, с. 1, публикация полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

Лечащему врачу пациентов, которым вводят активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, должно быть очевидно, как и когда заканчивать, прерывать или регулировать введение из-за токсичности, дисфункции органов и т.п. И, наоборот, лечащему врачу должны быть очевидно, как регулировать лечение в сторону применения более высоких доз, если клинический ответ является неадекватным (предотвращая токсичность). Величина вводимой дозы при лечении представляющего интерес нарушения должна варьироваться в зависимости от серьезности состояния, подлежащего лечению, пути введения и т.п. Серьезность состояния можно, например, оценивать среди прочего с помощью стандартных прогностических методов оценки. Кроме того, доза и предполагаемая частота введения дозы должны также варьироваться в зависимости от возраста, веса тела и ответа индивидуального пациента.

Другие средства и варианты лечения.

Активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, при лечении можно вводить в сочетании с одним или несколькими другими средствами. Например, активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении, можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством. Понятие "терапевтическое средство" включает любое средство, которое вводят для лечения симптома или заболевания у индивидуума, который нуждается в таком лечении. Указанное дополнительное терапевтическое средство может представлять собой любое действующее вещество, которое можно применять при конкретном показании, подлежащем лечению, предпочтительно с дополнительными видами активности, которые не оказывают отрицательное действие друг на друга. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой иммуномодулятор, цитостатическое средство, ингибитор клеточной адгезии, цитотоксическое средство, активатор клеточного апоптоза или средство, повышающее чувствительность клеток к индукторам апоптоза. В конкретном варианте осуществления изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой противораковое средство, например, агент, разрушающий микротрубочки, антимаболит, ингибитор топоизомеразы, интеркалятор ДНК, алкилирующий агент, средство гормональной терапии, ингибитор киназ, антагонист рецептора, активатор апоптоза опухолевых клеток или антиангиогенное средство.

Указанные другие средства могут присутствовать в комбинации в количествах, эффективных для указанных целей. Эффективное количество указанных других средств зависит от количества применяемой активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, типа нарушения или лечения, и других указанных выше факторов. Активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие

вающие молекулы, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием указанных в настоящем описании путей введения, или в дозах, составляющих примерно от 1 до 99% от указанных в настоящем описании доз, или в любой дозе и с использованием любого пути введения, которые согласно эмпирическим/клиническим данным рассматриваются как приемлемые.

Отмеченные выше комбинированные терапии предусматривают совместное введение (когда два или большее количество терапевтических средств включают в одну и ту же или в отдельные композиции) и раздельное введение, в этом случае введение активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, предлагаемой в изобретении, можно осуществлять до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адьюванта. Активирующие Т-клетки биспецифические антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в изобретении, можно применять также в сочетании с лучевой терапией.

#### Изделия.

Другим объектом изобретения является изделие, которое содержит продукты, применяемые для лечения, предупреждения и/или диагностирования указанных выше нарушений. Изделие представляет собой контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковку, которая размещена на контейнере или прилагаются к нему. Приемлемыми контейнерами являются, например банки, пузырьки, шприцы, пакеты для внутривенного (IV) раствора и т.д. Контейнеры можно изготавливать из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностирования состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или пузырек, снабженный пробкой, которую можно прокалывать с помощью иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет собой активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении. На этикетке или листовке-вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения выбранного состояния. Кроме того, изделие может включать (а) первый контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, предлагаемую в изобретении; и (б) второй контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит дополнительное цитотоксическое или иное терапевтическое средство. Согласно этому варианту осуществления изобретения изделие может содержать листовку-вкладыш в упаковку, которая содержит информацию о том, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. В альтернативном или дополнительном варианте изделие может дополнительно включать второй (или третий) контейнер с фармацевтически приемлемым буфером, таким как бактериостатическая вода для инъекций (БСВИ), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может включать другие материалы, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, в частности, другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

#### Примеры

Ниже представлены примеры способов и композиций, предлагаемых в изобретении. Как должно быть очевидно, можно воплощать на практике различные другие варианты осуществления изобретения в целом с учетом представленного выше описания изобретения.

##### Общие методы.

##### Методы рекомбинантной ДНК.

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., *Molecular cloning: A laboratory manual*; изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии применяли согласно инструкциям производителей. Общую информацию, касающуюся нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческих иммуноглобулинов, см. у: Kabat E.A. и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ое изд., изд-во NIH, публикация N91-3242, 1991.

##### Секвенирование ДНК.

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования двух цепей.

##### Синтез генов.

Требуемые сегменты генов либо создавали с помощью ПЦР с использованием соответствующих матриц, либо синтезировали на фирме Genent AG (Регенсбург, Германия) из синтетических олигонуклеотидов и ПЦР-продуктов посредством автоматического синтеза генов. В тех случаях, когда точная генная последовательность не была доступна, создавали олигонуклеотидные праймеры на основе последовательностей ближайших гомологов и гены выделяли с помощью ОТ-ПЦР из РНК, полученной из соответствующей ткани. Сегменты генов, фланкированные единичными сайтами, распознаваемыми рестрикционными эндонуклеазами, клонировали в стандартных клонирующих/секвенирующих векторах. Плазмидную ДНК очищали из трансформированных бактерий и определяли концентрацию с помощью УФ-спектрокопии. Последовательность ДНК субклонированных фрагментов генов подтверждали ДНК-секвенированием. Создавали сегменты генов с требуемыми сайтами рестрикции, позволяющими субклонировать их в соответствующих экспрессионных векторах. Все конструкции создавали с 5'-концевой

последовательностью ДНК, кодирующей лидерный пептид, который направляет секрецию белков в эукариотических клетках.

Пример 1. Получение активирующих Т-клетки биспецифических (ТСВ) антител с модификациями зарядов и без них (анти-CD20 /анти-CD3)

В этом примере описано получение следующих молекул, схематические иллюстрации которых представлены на фиг. 2:

А. "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" без модификаций зарядов (CH1/CL-обмен в CD3-связывающем компоненте) (фиг. 2А, SEQ ID NO: 14-17),

Б. "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, модификация зарядов в CD20-связывающих компонентах) (фиг. 2Б, SEQ ID NO: 18-21),

В. "2+1 IgG CrossFab" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, модификация зарядов в CD20-связывающих компонентах) (фиг. 2В, SEQ ID NO: 32, 19-21),

Г. "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" без модификаций зарядов (VH/VL-обмен CD3-связывающем компоненте) (фиг. 2Г, SEQ ID NO: 33, 15, 17, 21),

Д. "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" без модификаций зарядов (VH-CH1/VL-CL-обмен в CD3-связывающем компоненте) (фиг. 2Д, SEQ ID NO: 34, 15, 17, 35),

Е. "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен в CD20-связывающих компонентах, модификация зарядов в CD3-связывающем компоненте) (фиг. 2Е, SEQ ID NO: 36-39),

Ж. "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов и DDKK-мутацией в Fc-области (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, модификации зарядов в CD20-связывающих компонентах) (фиг. 2Ж, SEQ ID NO: 40,41,20,21),

З. "1 + 1 CrossMab" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, модификация зарядов в CD20-связывающем компоненте) (фиг. 2З, SEQ ID NO: 42, 43, 20, 21),

И. "1 + 1 CrossMab" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, модификация зарядов в CD20-связывающем компоненте, другой CD20-связывающий компонент) (фиг. 2И, SEQ ID NO: 43-45,21),

К. "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов 213E, 123R (VH/VL-обмен в CD3-связывающем компоненте, модификация зарядов в CD20-связывающем компоненте) (фиг. 2К, SEQ ID NO: 69-71, 21),

Л. "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов (VH/VL-обмен и модификация зарядов в CD3-связывающем компоненте) (фиг. 2Л, SEQ ID NO: 15, 17, 72, 73).

Последовательности ДНК переменных областей тяжелых и легких цепей субклонировали в рамке считывания либо с константной областью тяжелой цепи, либо с константной областью легкой цепи, предварительно встроеной в соответствующий реципиентный экспрессионный вектор для клеток млекопитающих. Экспрессия антитела находилась под контролем промотора MPSV, и вектор нес синтетическую сигнальную поли(А)-последовательность на 3'-конце каждой CDS. Кроме того, каждый вектор содержал OriP-последовательность EBV.

Молекулы получали путем совместной трансфекции клеток, растущих в суспензии, экспрессионными векторами для клеток млекопитающих, используя полиэтиленмин (ПЭИ). Клетки трансфектировали соответствующими экспрессионными векторами в соотношении 1:2:1:1 (А: "вектор тяжелой цепи (VH-CH1-VH-CL-CH2-CH3)" : "вектор легкой цепи" (VL-CL)": "вектор тяжелой цепи (VH-CH1-CH2-CH3)" : "вектор легкой цепи (VL-CH1)"; Б, Г, Ж, К, Л: "вектор тяжелой цепи (VH-CH1-VL-CH1-CH2-CH3)" : "вектор легкой цепи (VL-CL)" : "вектор тяжелой цепи (VH-CH1-CH2-CH3)" : "вектор легкой цепи (VH-CL)"; В: "вектор тяжелой цепи (VL-CH1-VH-CH1-CH2-CH3)" : "вектор легкой цепи (VL-CL)": "вектор тяжелой цепи (VH-CH1-CH2-CH3)" : "вектор легкой цепи (VH-CL)"; Д: "вектор тяжелой цепи (VH-CH1-VL-CL-CH2-CH3)" : "вектор легкой цепи (VL-CL)" : "вектор тяжелой цепи (VH-CH1-CH2-CH3)" : "вектор легкой цепи (VH-CH1)"; Е: вектор тяжелой цепи (VL-CH1-VH-CH1-CH2-CH3)": "вектор легкой цепи (VH-CL)": "вектор тяжелой цепи (VL-CH1-CH2-CH3)": "вектор легкой цепи (VH-CH1)") или в соотношении 1:1:1:1 (З, И: "вектор тяжелой цепи (VL-CH1-CH2-CH3)": "вектор легкой цепи (VL-CL)": "вектор тяжелой цепи (VH-CH1-CH2-CH3)": "вектор легкой цепи (VH-CL)").

Для трансфекции клетки НЕК293 EBNA культивировали в суспензионной бессывороточной культуральной среде Excell, содержащей 6 mM L-глутамин и 250 мг/л G418. Для получения в 600-миллилитровых колбах (биореакторах) TubeSpin (максимальный рабочий объем 400 мл) 600 млн клеток НЕК293 EBNA высевали за 24 ч до трансфекции. Для трансфекции клетки центрифугировали в течение 5 мин при 210 × g и супернатант заменяли на 20 мл предварительно нагретой среды CD CHO. Экспрессионные векторы смешивали в 20 мл среды CD CHO до получения конечного количества ДНК, составляющего 400 мкг. После добавления 1080 мкл раствора ПЭИ (2,7 мкг/мл) смесь интенсивно перемешивали в течение 15 с и затем инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки смешивали с раствором ДНК/ПЭИ, переносили в 600-миллилитровую колбу TubeSpin и инкубировали в течение 3 ч при 37°C в инкубаторе в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации добавляли 360

мл среды Excell + 6мМ L-глутамин + 5 г/л Pepsy + 1,0мМ среду VPA и клетки культивировали в течение 24 ч. Через 1 день после трансфекции добавляли 7% Feed 1 (фирма Lonza). После культивирования в течение 7 дней супернатант собирали для очистки путем центрифугирования в течение 20-30 мин при 3600×g (центрифуга Sigma 8K), раствор стерилизовали фильтрацией (0,22мМ-фильтр) и добавляли азид натрия в конечной концентрации 0,01% (мас./об.). Раствор выдерживали при 4°C.

Концентрацию конструкций в культуральной среде определяли с помощью белокА-ЖХВР. В основу разделения положено связывание содержащих Fc молекул с белком А при рН 8,0 и осуществление стадии элюции при рН 2,5. Применяли две подвижные фазы. Они включали буферы на основе Трис (10 мМ) - глицина (50мМ) - NaCl (100 мМ), идентичные за исключением того, что их регулировали для получения различных величин рН (8 и 2,5). Основой колонки являлась предколонка Upchurch 2×20 мм с внутренним объемом ~63 мкл, упакованная POROS 20А. По 100 мкл каждого образца инъецировали на уравновешенный материал со скоростью потока 0,5 мл/мин. Через 0,67 мин образец элюировали, используя рН на этой стадии 2,5. Для количественной оценки определяли абсорбцию при длине волны 280 нм и рассчитывали, используя стандартную кривую, для получения которой использовали человеческий IgG1 в диапазоне концентраций от 16 до 166 мг/л.

Секретируемый белок очищали из супернатантов клеточных культур с помощью аффинной хроматографии, применяя аффинную хроматографию на белке А с последующей стадией гель-фильтрации.

При осуществлении аффинной хроматографии супернатант загружали в колонку HiTrap ProteinA HP (CV=5 мл, фирма GE Healthcare), уравновешенную 25 мл буфера, содержащего 20 мМ фосфат натрия, 20мМ цитрат натрия, рН 7,5. Несвязанный белок удаляли промывкой, используя объем, кратный по меньшей мере 10 объемам колонки, буфера, содержащего 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, 0,5 М хлорид натрия, рН 7,5, с последующей дополнительной стадией промывки, для которой использовали объем, кратный 6 объемам колонки, буфера, содержащего 10 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, 0,5 М хлорид натрия, рН 5,45. Затем колонку промывали, используя 20 мл буфера, содержащего 10 мМ MES, 100 мМ хлорид натрия, рН 5,0, и требуемый белок элюировали, применяя в объеме, кратном 6 объемам колонки, 20 мМ цитрат натрия, 100 мМ хлорид натрия, 100 мМ глицин, рН 3,0. Белковый раствор нейтрализовали, добавляя 1/10 0,5М фосфата натрия. Требуемый белок концентрировали перед загрузкой в колонку HiLoad Superdex 200 (фирма GE Healthcare), уравновешенную буфером, содержащим 20 мМ гистидин, 140 мМ хлорид натрия, 0,01% Твин-20, рН 6,0. Молекулу А следует очищать, используя дополнительную стадию препаративной гель-фильтрации (SEC) для достижения конечного содержания мономера, составляющего 100%. Для этой цели фракции с высоким содержанием мономера после первой стадии гель-фильтрации объединяли, концентрировали и вновь загружали в колонку HiLoad Superdex 200 (фирма GE Healthcare). Указанная дополнительная стадия очистки не была необходимой для других молекул (в зависимости от профиля побочного продукта, однако объединенные фракции и, следовательно, выход после первой стадии гель-фильтрации, были различными для указанных молекул).

Чистоту и молекулярную массу молекул анализировали после первой стадии очистки (аффинная хроматография на белке А) с помощью ДСН-ПААГ в отсутствие восстановителя и осуществляли окрашивание кумасси (SimpleBlue™ SafeStain, фирма Invitrogen). Гелевую систему NuPAGE® Pre-Cast (фирма Invitrogen, США) применяли согласно инструкции производителя (4-12% Трис-ацетатные гели или 4-12% Бис-Трис).

Концентрацию белка в очищенных белковых образцах определяли путем измерения оптической плотности (ОП) при 280 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности.

Чистоту и молекулярную массу молекул после конечной стадии очистки анализировали с помощью КЭ-ДСН-анализов в присутствии восстановителя и без него. Применяли систему Caliper LabChip GXII (фирма Caliper Lifescience) согласно инструкциям производителя. Для анализов использовали 2 мкг образца.

Содержание агрегатов в образцах антител анализировали, используя колонку для аналитической гель-фильтрации TSKgel G3000 SW XL (фирма Tosoh) в подвижном буфере, содержащем 25 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 125мМ NaCl, 200 мМ моногидрохлорид L-аргинина, 0,02% (мас./об.) NaN<sub>3</sub>, рН 6,7, при 25°C.

Все молекулы получали и очищали с помощью одного и того же метода (за исключением молекулы А, которую подвергали, как указано выше, дополнительно стадии SEC).

Для молекулы А характерно высокое содержание агрегатов после первой стадии препаративной гель-фильтрации. Содержание агрегатов после указанной стадии очистки не поддавалось определению, поскольку на базовом уровне не удавалось разделять высокомолекулярные примеси и мономерную фракцию. Для получения 100%-ного мономерного продукта была необходима дополнительная стадия препаративной гель-фильтрации. Молекула Б представляла собой 100%-ный мономер после первой стадии препаративной гель-фильтрации.

Концентрация в супернатанте была более высокой для молекулы А, но конечный выход был (из-за высокого содержания агрегатов) в 2,3 раза ниже, чем для молекулы Б (табл. 2).

Конечная чистота по данным КЭ-ДСН-анализов оказалась более высокой у молекулы Б, чем у мо-

лекулы А (табл. 3, фиг. 3А и Б). На фиг. 3Н и 3О продемонстрированы хроматограммы, полученные на стадии очистки с помощью SEC (препаративная SEC), на которых молекула А имеет более широкий пик по сравнению с молекулой Б, что свидетельствует о том, что препарат молекулы А, загруженный в колонку для SEC, не являлся гомогенным, а препарат молекулы Б был в целом мономерным.

Молекулу В можно получать с высоким титром, но по сравнению с молекулой Б ее конечный выход оказался более низким из-за высокого содержания конечных продуктов, которые не удалось полностью удалить с помощью применяемых хроматографических методов (табл. 2; табл. 3; фиг. 3Б и 3К, и фиг. 3В и 3Л). Как показано на фиг. 3Б и 3Л, ДСН-ПААГ-анализ после стадии очистки на белке А продемонстрировал отсутствие побочных продуктов для молекулы Б, в то время как препарат молекулы В содержал некоторые побочные продукты, соответствующие кажущейся молекулярной массе 100 кДа.

Молекула Г отличалась от молекулы Б только отсутствием заряженных остатков в анти-CD20 Fab-фрагментах. Указанную молекулу можно получать также кратковременно с высоким титром, но, как это уже было описано для молекулы В, конечная чистота, установленная с помощью аналитической SEC (98% мономера для молекулы Г и 100% мономера для молекулы Б), и выход оказались более низкими, чем для молекулы Б, из-за высокого содержания побочных продуктов (табл. 2; табл. 3; фиг. 3Б и 3К, и фиг. 3Г и 3М). Как показано на фиг. 3К и 3М, с помощью ДСН-ПААГ-анализа после стадии очистки на белке А не обнаружено никаких побочных продуктов для молекулы Б, в то время как препарат молекулы Г содержал некоторые побочные продукты, соответствующие кажущейся молекулярной массе 66 кДа и 40 кДа.

На фиг. 3О и 3П показаны хроматограммы, полученные после стадии SEC-очистки (препаративная SEC), на которых молекула Г имеет более широкий пик по сравнению с молекулой Б, что свидетельствует о том, что препарат молекулы Г, загруженный в колонку для SEC, не являлся гомогенным, а препарат молекулы Б был в целом мономерным.

Кроме того, титр после получения молекулы Д был высоким, но конечный продукт все еще включал низкомолекулярные примеси, что продемонстрировано с помощью аналитической SEC и капиллярного электрофореза (табл. 2; табл. 3; фиг. 3Д).

В отличие от молекулы Б, молекула Е имеет VH-VL-обмен на Fab-фрагменте, связывающимся с опухолью-мишенью, при этом модификации зарядов интродуцированы в анти-CD3 Fab. Указанную молекулу можно получать также с высокими титрами, но конечный выход был низким из-за побочных продуктов. Для анти-CD20/анти-CD3 TCB с позиций получения и очистки предпочтительным оказался формат с модификациями зарядов в анти-CD20 Fab.

Молекула Ж представляет собой молекулу с модификациями зарядов в Fc-области ("DD" = K392D; K409D в одной из субъединиц Fc-домена, "KK" = D356K; D399K в другой субъединице Fc-домена (EU-нумерация)), вместо мутации типа "knob into hole". Образование биспецифических молекул усиливали путем интродукции двух остатков аспарагина в одну тяжелую цепь и двух остатков лизина во вторую тяжелую цепь (фиг. 2Ж). Указанную молекулу можно получать с высоким титром, но конечный продукт все еще содержит некоторые высокомолекулярные и низкомолекулярные примеси, что продемонстрировано с помощью аналитической SEC и капиллярного электрофореза (табл. 2; табл. 3), в то время как побочные продукты можно полностью удалить в случае такой же молекулы, несущей мутацию "knob into hole" (молекула Б).

Для молекулы И, которая отличается от молекулы З своим CD20-связывающим компонентом, установлено более высокое содержание агрегатов после конечной препаративной гель-фильтрации по сравнению с молекулой З. По данным КЭ-ДСН-анализов конечная чистота оказалась более высокой для молекулы З, чем для молекулы И (табл. 3; фиг. 3З и 3И). Кроме того, выход молекулы З оказался на 40% выше, чем выход молекулы И (табл. 2). Этот результат продемонстрировал, что качество молекулы зависит также от антитела, применяемого в активирующем Т-клетки биспецифическом формате.

При получении молекулы К и молекулы Л имели высокие исходные титры, что приводило к высокому выходу. Однако конечный выход составлял около 20% для обеих молекул, что было намного меньше выхода 48%, достигаемого для молекулы Б (табл. 2). Обе молекулы имели сходное конечное качество с содержанием мономера >99% (табл. 2). Чистота при использовании КЭ-ДСН в невосстанавливающих условиях оказалась лучше для молекулы К (в которой отсутствовали модификации зарядов в положении 124 CL-домена и положении 147 CH1-домена), что составляло около 99% по сравнению с молекулой Л (которая имела модификации зарядов и VL-VH-обмен в CD3-связывающем компоненте), чистота которой составляла 90% (табл. 3, фиг. 3О и 3П). Для молекулы К характерно некоторое осаждение в процессе стадии концентрирования после стадии аффинной хроматографии. Молекула Л имела модификации зарядов в CD3-связывающем CrossFab, а не в CD20-связывающих Fab. Это оказывало влияние на конечное качество, что продемонстрировано с помощью КЭ-ДСН (табл. 3, фиг. 3П). Различия в качестве оказались наиболее значительными после первой стадии очистки при использовании метода ДСН-ПААГ (фиг. 3Р, 3С). Молекула К содержала больше побочных продуктов с молекулярной массой 150 кДа и 70 кДа (половинные молекулы и конструкции, вероятно без легких цепей), чем молекула К. Обе молекулы имели такую же термостабильность, что и молекула Б (табл. 4).

Для анти-CD20/анти-CD3 TCB "инвертированная" версия с модификациями зарядов на анти-CD20

Fab (молекула Б) представляет собой формат, который можно получать с наиболее высоким выходом и конечным качеством.

Таблица 2. Обобщение данных о производстве и очистке анти-CD20/анти-CD3 TCB-молекул с модификациями зарядов и без модификаций зарядов

Молекула	Титр (мг/л)	Выход [%]	Выход (мг/л)	Аналитическая SEC (HMW/мономер/ LMW) [%]	Приблизительная чистота, определенная с помощью ЖХ-МС [%]
А	16,7	7,2	1,2	0/100/0 *	85-90 *
Б	5,5	48,2	2,8	0/100/0	93
В	25	12,9	3,24	4/93/3	Nd
Г	55	9,8	5,42	2/98/0	Nd
Д	30,5	3,3	0,99	0/96,3/3,7	Nd
Е	57	11,8	6,43	3,4/96,6/0	Nd
Ж	56	21	11,8	3,75/92,3/3,43	Nd
З	29	9,2	2,66	2/98/0	Nd
И	52,5	5,8	3,05	2,7/95,3/2	Nd
К	77	18	17,4	0,7/99,3/0	Nd
Л	71,5	21,8	15,5	0/99,7/0,3	Nd

\* конечный продукт после двух стадий SEC

Таблица 3. Результаты КЭ-ДСН-анализов (невосстанавливающие условия) анти-CD20 /анти-CD3 TCB-молекул с модификациями зарядов и без модификаций зарядов

Молекула	Пик. №	Размер [кДа]	Чистота [%]	
А	1	34,13	0,49	
	2	55,10	0,58	
	3	58,89	0,97	
	4	152,30	1,76	
	5	165,95	2,25	
	6	177,64	7,75	
	7	186,15	14,06	
	8	194,17	18,37	
	9	201,68	53,77	
Б	1	160,09	0,57	
	2	180,70	1,62	
	3	194,42	97,81	
В	1	131,12	0,82	
	2	141,45	3,45	
	3	182,86	2,39	
	4	192,1	13,5	
	5	198,13	79,84	
Г	1	207,04	100	
Д	1	176,36	0,67	
	2	196,54	14,36	
	3	209,22	84,97	
Е	1	30,41	0,55	
	2	65,04	1,33	
	3	198,80	2,05	
	4	203,10	7,94	
	5	213,93	88,12	
	Ж	1	96,50	1,67
		2	208,46	96,77
		3	216,11	1,55
З	1	131,98	1,13	
	2	140,64	1,96	
	3	153,02	92,24	
	4	161,24	4,67	
И	1	55,75	1,88	
	2	158,62	50,78	
	3	178,6	46,14	
	4	218,64	1,2	
К	1	186,5	1,4	
	2	198,2	98,6	
Л	1	164,7	4	
	2	182,4	6	
	3	200,1	90	

Подтверждение молекулярной массы с помощью ЖХ-МС-анализов.

Дегликозилирование.

Для подтверждения гомогенности препаратов молекул конечный белковый раствор анализировали с помощью ЖХ-МС. Для устранения гетерогенности, связанной с углеводами, конструкции обрабаты-

ли PNGазойF. Для этой цели значение pH белкового раствора доводили до pH 7,0, добавляя 2 мкл 2M Трис к 20 мкг белка с концентрацией 0,5 мг/мл. Добавляли 0,8 мкг PNGазыF и инкубировали в течение 12 ч при 37°C.

ЖХ-МС-анализ - онлайн обнаружение

Для осуществления метода ЖХ-МС применяли устройство Agilent HPLC 1200, соединенное с масс-спектрометром TOF 6441 (фирма Agilent). Хроматографическое разделение осуществляли на полистирольной колонке Macherey Nagel; RP1000-8 (размер частиц 8 мкм, 4,6×250 мм; каталожный № 719510). Элюент А представлял собой 5% ацетонитрила и 0,05 об.% муравьиной кислоты в воде, элюент Б представлял собой 95% ацетонитрила, 5% воды и 0,05% муравьиной кислоты. Скорость потока составляла 1 мл/мин, разделение осуществляли при 40°C и с использованием 6 мкг (15 мкл) белкового образца, полученного с помощью описанной выше обработки.

Время (мин.)	% Б
0,5	15
10	60
12,5	100
14,5	100
14,6	15
16	15
16,1	100

Полученный в течение первых 4 мин элюат отправляли в отходы для предупреждения загрязнения солями масс-спектрометра. Через ESI-источник пропускали осушающий газ со скоростью 12 л/мин, температура составляла 350°C и давление в распылителе составляло 60 фунтов на кв.дюйм. МС-спектры получали, используя напряжение фрагментатора 380 В и диапазон масс от 700 до 3200 m/z в режиме положительной ионизации. МС-данные получали, используя программное обеспечение устройства, начиная с 4 мин, до 17 мин.

В препарате молекулы А обнаружено примерно 10-15% молекул с ошибочно спаренными легкими цепями и следовые количества свободных или связанных легких цепей. В препарате молекулы Б обнаружены следовые количества молекул, содержащих две легкие цепи CD3. Не удалось обнаружить примеси, такие как свободные легкие цепи или связанные легкой цепи (табл. 2).

Определение термостабильности на основе статического рассеяния света.

Мониторинг термостабильности проводили на основе статического рассеяния света (SPC) и путем измерения присущей белку флуоресценции в ответ на подвергание температурному стрессу.

30 мкг профильтрованного белкового образца с концентрацией белка 1 мг/мл вносили с дублированием в устройство Optim 2 (фирма Avacta Analytical Ltd; Великобритания). Температуру повышали с 25 до 85°C со скоростью 0,1 С/мин, получая данные о радиусе и общей интенсивности рассеяния. Для определения присущей белку флуоресценции использовали для возбуждения образца длину волны 295 нм и испускание оценивали при длине волны от 266 до 473 нм.

Термостабильность определяли для всех молекул, результаты представлены в табл. 4. Температуру агрегации ( $T_{Agg}$ ) определяли на основе динамического рассеяния света и температуру плавления ( $T_M$ ), измеренную по флуоресценции белка после применения температурного градиента, сравнивали для всех молекул с  $T_{Agg}$  в диапазоне от 54-58°C и  $T_M$  в диапазоне от 56 до 60°C (табл. 4).

Таблица 4. Термостабильность анти-CD20/анти-CD3 TCB-молекул с модификациями зарядов и без модификаций зарядов

Молекула	$T_{Agггации}$ [°C]	$T_M$ [°C]
А	54,4	55,9
Б	54,3	56,4
В	56	59
Г	56	59
Д	56	60
Е	58	60
Ж	57	59
З	55	56
И	53	57
К	54	55
Л	54	55

Связывание с CD3 и CD20 антител к CD3/к CD20 в виде TCB. Оценивали связывание с CD3 антител к CD3 /CD20 в виде активирующих Т-клетки биспецифических молекул (TCB) с модификациями зарядов или без них (молекулы "А" и "Б", описанные выше), применяя экспрессирующие человеческий CD3 клетки Jurkat. Связывание с CD20 определяли, используя экспрессирующие человеческий CD20 клетки Z-138. Собирали суспензию клеток, промывали однократно 3ФР и определяли жизнеспособность и плотность клеток с помощью устройства Vicell. Суспензию клеток ресуспендировали из расчета  $2 \times 10^6$  клеток/мл в FACS-буфере. 100 мкл клеточной суспензии применяли для посева в 96-луночный круглодонный планшет. Каждую стадию осуществляли при 4°C. Планшеты центрифугировали при 360×g в течение

5 мин и супернатант удаляли. Приготавливали разведения антител в ЗФР/0,1% БСА. Добавляли в лунки 30 мкл разведенных антител к CD3/к CD20 в виде TCB или FACS-буфера и клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C. После инкубации добавляли по 120 мкл FACS-буфера на лунку, планшет центрифугировали в течение 5 мин при 350×g и супернатант удаляли. Стадию промывки повторяли один раз. Добавляли по 30 мкл на лунку предварительно разведенного вторичного антитела, как указано на схеме планшета. Планшеты инкубировали в течение еще 30 мин при 4°C. После инкубации добавляли по 120 мкл на лунку FACS-буфера, планшеты центрифугировали в течение 5 мин при 350×g и супернатант удаляли. Стадию промывки повторяли один раз для всех планшетов, за исключением планшета с клетками Jurkat, которые фиксировали непосредственно после указанной одной стадии промывки. Клетки фиксировали, используя 100 мкл на лунку буфера для фиксации фирмы BD (фирма BD Biosciences, № 554655) при 4°C в течение 20-30 мин. Клетки ресуспендировали, используя 80 мкл/лунку FACS-буфера, для измерения FACS с помощью устройства BD FACS CantoII.

Результаты указанного эксперимента представлены на фиг. 4.

Лизис опухолевых клеток и активация CD4- и CD8-T-клеток после опосредуемого T-клетками цитолиза экспрессирующих CD20 опухолевых клеток-мишеней, индуцированного антителами к CD3/к CD20 в виде TCB.

Опосредуемый T-клетками цитолиз клеток-мишеней и активацию T-клеток, индуцируемую антителами к CD3/к CD20 в виде TCB с модификациями зарядов или без них (молекулы "А" и "Б" описанные выше) оценивали на опухолевых клетках Z-138 и Nalm-6. Человеческие РВМС применяли в качестве эффекторных клеток и цитолиз, а также активацию T-клеток определяли через 22 ч после инкубации с биспецифическим антителом. В целом, метод состоял в следующем: клетки-мишени собирали, промывали и высевали с плотностью 30000 клеток/лунку в круглодонные 96-луночные планшеты. Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) получали центрифугированием в градиенте плотности Histopaque® свежей крови здоровых доноров. Свежую кровь разводили стерильным ЗФР и наслаивали на градиент Histopaque (фирма Sigma, №H8889). После центрифугирования (450×g, 30 мин, комнатная температура) плазму над содержащей РВМС интерфазой отбрасывали и РВМС переносили в новую фальковскую пробирку, в которую затем добавляли 50 мл ЗФР. Смесь центрифугировали (400×g, 10 мин, комнатная температура), супернатант отбрасывали и дебрис РВМС промывали дважды стерильным ЗФР (стадии центрифугирования при 350×g, 10 мин). Осуществляли автоматический подсчет (ViCell) полученной популяции РВМС и выдерживали в среде RPMI1640, содержащей 10% FCS и 1% L-аланил-L-глутамин (фирма Biochrom, K0302) в инкубаторе для клеток (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) вплоть до дальнейшего использования (не более 24 ч). Для анализа цитолиза антитела добавляли в указанных концентрациях (диапазон от 1000 пМ до 0,1 пМ в трех повторностях). РВМС добавляли к клеткам-мишеням в конечном соотношении Е:Т 6:1. После инкубации планшеты центрифугировали при 420×g в течение 4 мин и переносили из расчета 50 мкг/лунку в свежие 96-луночные плоскодонные планшеты для ЛДГ-детекции. ЛДГ-детекцию осуществляли, применяя набор для детекции цитотоксичности (Cytotoxicity Detection Kit) (фирма Roche, № 11644793001) согласно инструкциям производителя. Оставшиеся клетки промывали ЗФР, содержащим 0,1% БСА. Окрашивание для выявления на поверхности CD8 (APCCy7-антитело к человеческому CD8, фирма Biolegend, № 301016), CD4 (ФИТЦ-антитело к человеческому CD4, фирма Biolegend, № 300506), CD69 (BV421-антитело к человеческому CD69, фирма Biolegend, № 310930) и CD25 (PECy7-антитело к человеческому CD25, фирма Biolegend, № 302612) осуществляли согласно рекомендациям поставщика. После выдерживания в течение 30 мин при 4°C клетки промывали дважды, используя 150 мкл/лунку ЗФР, содержащего 0,1% БСА, и фиксировали, используя 100 мкл/лунку 2% парафторфенилаланина (PFA). Измерения осуществляли с помощью устройства BD FACS CantoII.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 5, 6 и 7. Обе молекулы обладали сопоставимой активностью касательно лизиса опухолевых клеток и активации T-клеток.

Истощение В-клеток и активация CD4 - и CD8 -T-клеток после опосредуемого T-клетками цитолиза здоровых человеческих В-клеток, индуцированного антителами к CD3/к CD20 в виде TCB, в цельной крови человека.

Человеческую цельную кровь здорового донора инкубировали с антителами к CD3/к CD20 в виде TCB с модификациями зарядов или без них (молекулы "А" и "Б", описанные выше) в указанных концентрациях (диапазон от 50000 до 1 пМ в трех повторностях). Через 22 ч кровь перемешивали и 5 мкл отбирали для окрашивания с помощью 20 мкл смеси антител для FACS, содержащей антитела, предназначенные для обнаружения CD8 (APCCy7-антитело к человеческому CD8, фирма Biolegend, № 301016), CD4 (ФИТЦ-антитело к человеческому CD4, фирма Biolegend, № 300506), CD69 (BV421-антитело к человеческому CD69, фирма Biolegend, № 310930), CD25 (PECy7-антитело к человеческому CD25, фирма Biolegend, № 302612), CD22 (APC-антитело к человеческому CD22, фирма Biolegend, № 302510) и CD45 (PerCPCy5.5-антитело к человеческому CD45, фирма Biolegend, № 304028). После инкубации в течение 15 мин при комнатной температуре кровь фиксировали с помощью лизирующего раствора для FACS (фирма BD, №349202) и анализировали с помощью проточной цитометрии. Истощение В-клеток рассчитывали на основе соотношения количества В-клеток и количества CD4 -T-клеток, принимая истощение

В-клеток в необработанных образцах за 0%.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 8 и 9. Обе молекулы обладали сопоставимой активностью касательно истощения В-клеток в цельной крови и активации Т-клеток.

Связывание антитела к CD3/к CD20 в виде ТСВ с экспрессирующими человеческий CD20 и CD3 клетками-мишенями.

Связывание антитела к CD3/к CD20 в виде ТСВ, обозначенного выше как молекула "Б", тестировали на экспрессирующей человеческий CD20 линии клеток диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) (WSU DLCL2,  $0,5-1 \times 10^6$  сайтов связывания CD20) и экспрессирующей CD3 иммортализованной линии Т-лимфоцитов (Jurkat). В целом, метод состоял в следующем: клетки собирали, подсчитывали, определяли жизнеспособность и ресуспендировали из расчета  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл в FACS-буфере (ЗФР, 0,1% БСА). 100 мкл клеточной суспензии (содержащей  $0,15 \times 10^6$  клеток) инкубировали в круглодонном 96-луночном планшете в течение 30 мин при 4°C с возрастающими концентрациями CD20 ТСВ (50 пМ - 200 нМ), промывали дважды холодным ЗФР, 0,1% БСА, повторно инкубировали в течение еще 30 мин при 4°C с разбавленным вторичным антителом, конъюгированное с PE F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом козы античеловеческое IgG, AffiniPure Fcγ-фрагмент специфическое (фирма Jackson Immuno Research Lab PE, № 109-116-170), промывали трижды холодным ЗФР, 0,1% БСА, фиксировали, добавляя 2% PFA, и анализировали с помощью FACS, применяя устройство FACS CantoII (программа FACS Diva), исключая из анализа мертвых клеток путем FSC/SSC-дискриминации (дискриминация на основе сигналов рассеяния FSC (детектор прямого светорассеяния)/SSC (детектор бокового светорассеяния)).

Результаты представлены на фиг. 10А (связывание с клетками WSU DLCL2) и на фиг. 10Б (связывание с клетками Jurkat). Кривые связывания и величины EC<sub>50</sub>, характеризующие связывание, рассчитывали с помощью программы GraphPadPrism5. Величины EC<sub>50</sub> составляли 0,98 нМ (двухвалентное связывание с экспрессирующими CD20 клетками WSU DLCL2) и примерно 12,5 нМ (одновалентное связывание с экспрессирующими CD3 клетками Jurkat).

Связывание антитела к CD3/к CD20 в виде ТСВ с экспрессирующими CD20 и CD3 клетками-мишенями человека и обезьян циномоглус.

Перекрестную реактивность антитела к CD3 /к CD20 в виде ТСВ, обозначенного выше как молекула "Б", оценивали по связыванию с экспрессирующими CD20 В-клетками человека и обезьян циномоглус и экспрессирующими CD3 CD4- и CD8-Т-клетками. В целом, метод состоял в следующем: гепаринизированную кровь человека и обезьян циномоглус здоровых доноров применяли для выделения РВМС путем центрифугирования в градиенте плотности. Выделенные РВМС подсчитывали, оценивали жизнеспособность и ресуспендировали из расчета  $4 \times 10^6$  клеток/мл в FACS-буфере (100 мкл ЗФР, 0,1% БСА). 100 мкл клеточной суспензии (содержащей  $0,4 \times 10^6$  клеток) высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном и центрифугировали (420×g, 4 мин). После удаления супернатантов РВМС инкубировали в течение 30 мин при 4°C с возрастающими концентрациями CD20 ТСВ-AlexaFlour488 (200 пМ - 200 нМ), промывали дважды холодным ЗФР, 0,1% БСА, повторно инкубировали в течение еще 30 мин при 4°C с антителами, дающими перекрестную реакцию с антигенами человека/обезьян циномоглус: антитело к D19 (разработанное в лаборатории заявителей, клон 8B8)-AlexaFluor647, антитело к CD4 (фирма BD, №552838, клон L200)-PerCPy5.5 и антитело к CD8 (фирма BD, №555367, клон RPA-T8)-PE. Через 30 мин РВМС промывали дважды холодным ЗФР, 0,1% БСА и обрабатывали лизирующим раствором для FACS (фирма BD, № 349202), после чего осуществляли FACS-анализ с использованием устройства FACS CantoII (программа FACS Diva). Кривые связывания получали с помощью программы GraphPadPrism5.

Результаты представлены на фиг. 11А (связывание с В-клетками человека и обезьян циномоглус), фиг. 11Б (связывание с CD4-Т-клетками человека и обезьян циномоглус) и фиг. 11В (связывание с CD8-Т-клетками человека и обезьян циномоглус). Величины EC<sub>50</sub>, характеризующие связывание с экспрессирующими CD20 В-клетками, рассчитывали с помощью программы GraphPadPrism5, они составляли 4,8 нМ (человеческие В-клетки) и 3,3 нМ (В-клетки обезьян циномоглус).

Лизис Т-клеток, опосредуемый различными форматами антител к CD20 /к CD3 в виде ТСВ.

Лизис опухолевых клеток, опосредуемый различными форматами антител к CD20/к CD3 в виде ТСВ (молекулы "Б", "А", "В" и "З", описанные выше) оценивали на клетках Z138 (лимфома из клеток мантии,  $0,06-0,23 \times 10^6$  сайтов связывания CD20). Человеческие РВМС применяли в качестве эффекторных клеток и лизис опухолей определяли после инкубации в течение 21-24 ч с различными форматами биспецифических антител. В целом, метод состоял в следующем: клетки-мишени собирали, промывали и высевали с плотностью 50000 клеток/луноку в 96-луночные планшеты с U-образным дном. Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) получали центрифугированием в градиенте плотности Histopaque крови здорового человека. Свежую кровь разводили стерильным ЗФР и наслаивали на градиент Histopaque (фирма Sigma, №H8889). После центрифугирования (450×g, 30 мин, комнатная температура, без перерыва) плазму над содержащей РВМС интерфазой отбрасывали и РВМС переносили в новую фальконовскую пробирку, в которую затем добавляли 50 мл ЗФР. Смесь центрифугировали (350×g, 10 мин, комнатная температура), супернатант отбрасывали и дебрис РВМС промывали дважды стерильным ЗФР (300×g, 10 мин). Осуществляли автоматический подсчет (ViCell) полученной популяции РВМС и

выдерживали в среде RPMI1640, содержащей 10% FCS и 1% L-аланил-L-глутамин (фирма Biochrom, K0302) в инкубаторе для клеток при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> вплоть до дальнейшего использования (не более 24 ч). Для анализа лизиса опухолей антитела добавляли в указанных концентрациях (диапазон от 0,1 пМ до 1 нМ в трех повторностях). РВМС добавляли к клеткам-мишеням в конечном соотношении Е:Т, равном 6:1. Лизис опухолевых клеток оценивали после инкубации в течение 21-24 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> путем количественной оценки ЛДГ, высвободившейся в клеточные супернатанты апоптозными/некротизированными клетками (набор для детекции ЛДГ (LDH detection kit), фирма Roche Applied Science, № 11 644 793 001). Максимальный лизис клеток-мишеней (= 100%) получали путем инкубации клеток-мишеней с Тритоном X-100 в концентрации 1%. Минимальный лизис (= 0%) соответствовал совместной инкубации клеток-мишеней с эффекторными клетками без биспецифической конструкции.

На фиг. 12 представлены различные форматы антител CD20 TCB, которые индуцировали сильный и мишень специфический лизис CD20 -клеток-мишеней. На панели А продемонстрировано, что "CD20 TCB\_2+1\_с зарядами, инвертированная" (молекула "Б", описанная выше) обладает активностью, сопоставимой с активностью молекулы "CD20 TCB\_2+1\_без зарядов, инвертированная" (молекула "А", описанная выше), и что обе являлись более эффективными, чем молекула формата "CD20 TCB\_1 + 1\_с зарядами" (молекула "З", описанная выше). На панели Б продемонстрировано, что "CD20 TCB\_2+1\_с зарядами, инвертированная" (молекула "Б", описанная выше) является более эффективной, чем молекула формата "CD20 TCB\_2+1\_с зарядами, классическая" (молекула "В", описанная выше). Величины EC<sub>50</sub>, определенные в анализах по оценке цитолиза, которые рассчитывали с помощью программы GraphPad-Prism5, представлены в табл. 5.

Таблица 5. Величины EC<sub>50</sub> (пМ), характеризующие лизис опухолевых клеток, опосредуемый различными форматами антител к CD20/к CD3 в виде TCB, определенные с использованием экспрессирующих CD20 опухолевых клеток-мишеней Z138

Панель	Формат антитела к CD20	EC <sub>50</sub> [пМ]
А	CD20 TCB_2+1_с зарядами, инвертированная (молекула Б)	2,18
А	CD20 TCB_2+1_без зарядов, инвертированная (молекула А)	0,76
А	CD20 TCB_1+1_с зарядами (молекула З)	17,54
Б	CD20 TCB_2+1_с зарядами, инвертированная (молекула Б)	0,96
Б	CD20 TCB_2+1_с зарядами, классическая (молекула В)	43,34

Лизис опухолевых клеток и последующая Т-клеточная активация, опосредуемые различными форматами антител к CD20/к CD3 в виде TCB.

Лизис опухолевых клеток, опосредуемый различными форматами антител к CD20/к CD3 в виде TCB (молекулы "Б" и "Н", описанные выше) дополнительно оценивали на клетках Z138 (лимфома из клеток мантии), используя человеческие РВМС из трех здоровых доноров, а также более широкую панель клеточных линий DLBCL, включая OCI Ly-18 (0,06-0,2×10<sup>6</sup> сайтов связывания CD20), Ramos (0,1-0,4×10<sup>6</sup> сайтов связывания CD20), SU-DHL-5 (0,13-0,21×10<sup>6</sup> сайтов связывания CD20), SU-DHL-8 (уровень сайтов связывания CD20 ниже предела обнаружения метода), Toledo (0,02×10<sup>6</sup> сайтов связывания CD20) и U2932 (0,09-0,4×10<sup>6</sup> сайтов связывания CD20). Опухолевые клетки собирали, РВМС выделяли и осуществляли анализ в условиях, аналогичных описанным в предыдущем примере. Соотношение Е:Т, применяемое в анализах, результаты которых показаны на фиг. 13 А-В, составляло 6:1, для анализа, результаты которого показаны на фиг. 13Г, оно составляло 3:1. Лизис опухолевых клеток оценивали после инкубации в течение 21 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> путем количественной оценки ЛДГ, высвободившейся в клеточные супернатанты апоптозными/некротизированными клетками (набор для детекции ЛДГ (LDH detection kit), фирма Roche Applied Science, № 11 644 793 001). Для оценки Т-клеточной активации, происходящей после лизиса опухолевых клеток, РВМС переносили в круглодонный 96-луночный планшет, центрифугировали при 400×g в течение 5 мин и промывали дважды ЗФР, содержащим 0,1% БСА. Окрашивание для выявления на поверхности CD8 (АРССу7-антитело к человеческому CD8, фирма Biolegend, № 301016), CD4 (ФИТЦ-антитело к человеческому CD4, фирма Biolegend, № 300506) и CD25 (РЕСу7-антитело к человеческому CD25, фирма Biolegend, № 302612) осуществляли согласно рекомендациям поставщика. Клетки промывали дважды, используя 150 мкл/луноку ЗФР, содержащего 0,1% БСА, и фиксировали с помощью 2% PFA или лизирующего раствора для FACS (фирма BD, № 349202). Образцы анализировали с помощью устройства BD FACS CantoII.

На фиг. 13 продемонстрировано, что антитело формата "CD20 TCB\_2+1\_с зарядами, инвертированная" (молекула "Б", описанная выше) является более эффективным, чем антитело формата "CD20 TCB\_1 + 1" (молекула "З", описанная выше) по результатам оценки как лизиса опухолевых клеток (панели А, Г), так и Т-клеточной активации (панели Б, В) при использовании РВМС различных доноров. Величины EC<sub>50</sub>, характеризующие лизис опухолей и Т-клеточную активацию при использовании клеток Z138,

представлены в таблице 6а. Величины  $EC_{50}$ , характеризующие лизис опухолей, полученные в анализах с использованием панели клеточных линий DLBCL, представлены в табл. 6б. Величины  $EC_{50}$  рассчитывали с помощью программы GraphPad Prism5.

Таблица 6а. Величины  $EC_{50}$  (пМ), характеризующие лизис опухолевых клеток и Т-клеточную активацию, опосредуемые антителами к CD20/к CD3 в виде ТСВ, определенные с использованием экспрессирующих CD20 опухолевых клеток-мишеней Z138

Формат антитела к CD20	$EC_{50}$ [пМ] 24 ч (среднее для 3 доноров)
CD20 ТСВ_2+1_с зарядами, инвертированная (лизис опухолей) (молекула Б)	1,6
CD20 ТСВ_1+1 (лизис опухолей) (молекула Н)	751
CD20 ТСВ_2+1_с зарядами, инвертированная (активация CD8-Т-клеток) (молекула Б)	2,2
CD20 ТСВ_1+1 (активация CD8-Т-клеток) (молекула З)	174,8
CD20 ТСВ_2+1_с зарядами, инвертированная (активация CD4-Т-клеток) (молекула Б)	1,2
CD20 ТСВ_1+1 (активация CD4-Т-клеток) (молекула З)	122

Таблица 6б. Величины  $EC_{50}$  (пМ), характеризующие лизис опухолей DLBCL из панели линий опухолевых клеток, опосредуемый антителами к CD20/к CD3 в виде ТСВ

$EC_{50}$ [пМ] через 24 ч, лизис опухолей	CD20 ТСВ_2+1_с зарядами, инвертированная (молекула Б)	CD20 ТСВ_1+1 (молекула З)
Ocly-18	0,3	250,4
Ramos	n.d.	n.d.
SU-DHL-5	1,2	69,7
SU-DHL-8	0,5	218,9
Toledo	n.d.	120,2
U2932	0,9	72,7

Истощение В-клеток в человеческой цельной крови, опосредуемое различными форматами антител к CD20/к CD3 в виде ТСВ.

Истощение здоровых В-клеток, опосредуемое различными форматами антител к CD20/к CD3 в виде ТСВ (молекулы "Б" и "З", описанные выше) и обинутузумабом, дополнительно изучали с использованием свежей человеческой крови здоровых добровольцев. В целом, метод состоял в следующем: свежую кровь собирали в содержащие гепарин шприцы. Аликвоты крови (180 мкл/лунку) помещали в 96-луночные планшеты с глубокими лунками, вносили разведения ТСВ или антитела (10 мкл/лунку +10 мкл/лунку ЗФР) и инкубировали в течение 24 ч при 37°C во влажной камере для клеток в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации кровь перемешивали с помощью пипетки, затем переносили аликвоты крови объемом 35 мкл в 96-луночные планшеты с U-образным дном и инкубировали с флуоресцентомеченными антителами к CD45 (APC, фирма Biolegend, № 304037), к CD4 (PerCPCy5.5, фирма BD, № 552838), к CD8 (APCCy7, фирма Biolegend, № 301016), к CD19 (PE, фирма Biolegend, № 302208), к CD25 (PECy7, фирма Biolegend, № 302612) и к CD69 (BV421, фирма Biolegend, № 310930) в общем объеме 55 мкл для анализа методом проточной цитометрии. После инкубации в течение 15 мин при комнатной температуре (в темноте) добавляли 180 мкл/лунку лизирующего раствора для FACS (фирма BD Biosciences) для истощения эритроцитов и для фиксации клеток перед осуществлением проточной цитометрии.

На фиг. 14 продемонстрировано, что конструкция "CD20 ТСВ\_2+1\_с зарядами, инвертированная" (молекула "Б", описанная выше) является более эффективной в отношении истощения здоровых В-клеток, чем как обинутузумаб (газива), так и "CD20 ТСВ\_1 + 1" (молекула "З", описанная выше).

Таблица 7. Величины  $EC_{50}$  (пМ), характеризующие истощение В-клеток в цельной крови здорового человека различными антителами, мишенью которых является CD20

Антитела, направленные против CD20	$EC_{50}$ [пМ], 24 ч
CD20 ТСВ_2+1_с зарядами, инвертированная (молекула Б)	13,2
Обинутузумаб (Gazyva®)	79,2
CD20 ТСВ_1+1 (молекула З)	3753

Активация Т-клеток, оцененная количественно по интенсивности передачи сигналов CD3 в прямом направлении с помощью репортерного анализа Jurkat-NFAT.

Способность различных форматов антител к CD20/к CD3 в виде ТСВ индуцировать перекрестное сшивание Т-клеток и, как следствие, Т-клеточную активацию оценивали с применением совместных культур экспрессирующих CD20 опухолевых клеток-мишеней и репортерных клеток Jurkat-NFAT (экспрессирующая CD3 репортерная линия человеческих клеток острого лимфолейкоза с промотором NFAT, GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, фирма Promega, № CS176501). После одновременного связывания

анти-CD20/анти-CD3 TCB с антигеном CD20 (который экспрессируется на опухолевых клетках) и антигеном CD3 (который экспрессируется на репортерных клетках Jurkat-NFAT) промотор NFAT активируется, и это приводит к экспрессии активной люциферазы светляка. Интенсивность люминесцентного сигнала (полученного после добавления субстрата люциферазы) пропорциональна интенсивности активации и передаче сигналов CD3. Репортерные клетки Jurkat-NFAT выращивали в суспензии и культивировали в среде RPMI1640, 2 г/л глюкозы, 2 г/л NaHCO<sub>3</sub>, 10% FCS, 25мМ HEPES, 2мМ L-глутамин, 1× NEAA, 1× пируват натрия с плотностью 0,1-0,5 млн клеток на мл с добавлением 200 мкг на мл гигромицина. Для анализа опухолевые клетки-мишени (Z138) собирали и определяли жизнеспособность с помощью устройства ViCell. К клеткам-мишеням добавляли 50 мкл/лунку разведенных антител или среды (в качестве контроля). Высеивали 20000 клеток/лунку в плоскодонный 96-луночный планшет с белыми стенками (№ 655098, фирма Greiner bio-one). Затем собирали репортерные клетки Jurkat-NFAT и оценивали их жизнеспособность с помощью устройства ViCell. Клетки ресуспендировали с плотностью 2 млн клеток/мл в среде для культивирования клеток без гигромицина В и добавляли к опухолевым клеткам с плотностью 0,1×10<sup>6</sup> клеток/лунку (50 мкл/лунку) с получением конечного соотношения Е:Т 5:1 и конечного объема 100 мкл на лунку. Клетки инкубировали в течение 6 ч при 37°С во влажной камере. После окончания инкубации в лунки добавляли 100 мкл/лунку раствора ONE-Glo (объемное соотношение 1:1 ONE-Glo и среды для анализа на лунку) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте. Люминесценцию определяли с помощью ридера для ELISA WALLAC Victor3 (фирма PerkinElmer2030), продолжительность детекции составляла 5 с/лунку.

На фиг. 15 продемонстрировано, что конструкция "CD20 TCB\_2+1\_с зарядами, инвертированная" (молекула "Б" описанная выше) приводит к более сильной Т-клеточной активации и передаче сигналов CD3 в прямом направлении, чем "CD20 TCB\_1 + 1" (молекула "З", описанная выше).

Таблица 8. Величины EC<sub>50</sub> (пМ), характеризующие активацию CD3, обнаруженную с помощью репортерных клеток Jurkat-NFAT

Формат антитела к CD20	EC <sub>50</sub> [пМ]
CD20 TCB 2+1 с зарядами, инвертированная (молекула Б)	28,98
CD20 TCB 1+1 (молекула З)	1001

ФК исследование с применением однократной дозы анти-CD20/анти-CD3 TCB, проведенное на здоровых NOG-мышам.

Осуществляли фармакокинетическое исследование с применением однократной дозы (SDPK) для оценки экспозиции анти-CD20/анти-CD3 TCB-молекулы "Б" (далее в контексте настоящего описания обозначена как "CD20 TCB") в процессе проведения опытов по оценке эффективности (фиг. 16). Осуществляли i.v.-болюсное введение дозы 0,5 мг/кг мышам линии NOG и отбирали образцы крови в определенные моменты времени для фармакокинетической оценки. Для измерения общих концентраций CD20 TCB применяли стандартный иммуноанализ. Калибровочный диапазон стандартной кривой для CD20 TCB составлял от 0,78 до 50 нг/мл, при этом концентрация 15 нг/мл представляла собой нижний предел количественного определения (LLOQ).

Обнаружено двухфазное снижение с бета-фазой времени полужизни, соответствующей 10 дням (некомпарментальный анализ), и клиренсом, составляющем 8 мл/д/кг (2-компарментальная модель). Как и ожидалось, время полужизни и клиренс были сопоставимы с параметрами обычного, не имеющего специфической мишени "ненаправленного" IgG (табл. 9).

Для ФК-анализа, моделирования и симуляции применяли программу Phoenix v6.2 фирмы Pharsight Ltd.

Таблица 9. Фармакокинетические параметры после i.v.-болюсного введения CD20 TCB в дозе 0,5 мг/кг NOG-мышам

Время полужизни	10 дней
Клиренс	7, мл/д/кг
C <sub>max</sub>	9,4 мкг/мл
AUC	1554 ч×мкг/мл

Активность анти-CD20/анти-CD3 TCB в отношении В-клеточного истощения *in vivo*.

Тестировали активность CD20 TCB в отношении истощения В-клеток периферической крови на полностью гуманизированных мышам линии NOD/Shi-scid/IL-2Rγ<sup>null</sup> (NOG).

Полностью гуманизированных мышей линии NOG возрастом 14 недель, несущих физиологические уровни циркулирующих человеческих В- и Т-клеток (Hayakawa J. и др., Stem Cells 27(1), 2009, сс. 175-182), обрабатывали либо наполнителем (n = 7), либо CD20 TCB (n = 6) в дозе 0,5 мг/кг, которую вводили внутривенно (i.v.) один раз в неделю. Как продемонстрировано на схеме эксперимента, приведенной на фиг. 17, у мышей брали образцы крови для анализа В-клеток и Т-клеток через 1 и 3 дня после первой терапевтической инъекции (D1, D3) и через 3 дня после второй (D10), в этот момент времени опыт прекращали. В более поздний момент времени изымали также селезенки для анализа В-клеток и Т-клеток. Мышей обследовали за 4 дня до терапевтической инъекции (D-4) для определения количества циркулирующих В- и Т-клеток на исходном уровне. На фиг. 18 представлены данные о количестве В- и Т-клеток по данным проточной цитометрии *ex vivo* крови обработанных наполнителем (левая панель) и CD20

ТСВ (правая панель) в различные моменты времени. Результаты продемонстрировали, что происходило очень эффективное истощение циркулирующих В-клеток уже через 1 день после инъекции CD20 ТСВ, и их количество оставалось на уровне, не поддающемся обнаружению на протяжении всего опыта. В противоположность этому, количество циркулирующих Т-клеток лишь кратковременно снижалось в D1 после терапевтической инъекции, возвращаясь к исходному уровню в D3, и оставалось стабильным на протяжении всего опыта. Анализировали также статус Т-клеточной активации в крови обработанных мышей в D3 и D10 после первой терапевтической инъекции с помощью проточной цитометрии *ex vivo* с применением различных маркеров поверхности Т-клеток и маркера пролиферации Ki67 (фиг. 19). У Т-клеток из обработанных CD20 ТСВ мышей обнаружен активированный фенотип в D3 после терапевтической инъекции (верхняя панель) с повышающей регуляцией маркеров активации CD25, 4-1BB, PD-1 и гранзима-В (GZB) в субпопуляциях как CD4-, так и CD8-Т-клеток по сравнению с Т-клетками из контрольных мышей, обработанных наполнителем. Т-клетки из обработанных мышей экспрессировали также более высокие уровни маркера пролиферации Ki67. В D10 после первой терапевтической инъекции уровни большинства маркеров активации Т-клеток возвращались к исходным значениям за исключением GZB и PD-1, уровни экспрессии которых все еще оставались более высокими по сравнению с уровнями в группе, обработанной применяемым в качестве контроля наполнителем.

На фиг. 20 продемонстрированы результаты анализа В-клеток и Т-клеток, полученные при изучении селезенки обработанных наполнителем и CD20 ТСВ мышей в конце опыта (D10). Установлено, что обработка CD20 ТСВ опосредовала очень эффективное истощение В-клеток в указанном вторичном лимфоидном органе (фиг. 20А), в то время как количество Т-клеток оказалось сопоставимым с уровнями у мышей, обработанных применяемым в качестве контроля наполнителем (фиг. 20Б). Статус Т-клеточной активации (фиг. 20В) оказался сходным с обнаруженным в крови, и отличался более высоким уровнем экспрессии GZB и PD-1 в селезеночных Т-клетках обработанных мышей по сравнению с контрольным обработанным наполнителем мышами.

Взятые в совокупности, указанные результаты продемонстрировали, что обработка CD20 ТСВ может опосредовать очень эффективное истощение В-клеток периферической крови уже через 1 день после терапевтической инъекции, при этом количество В-клеток оставалось на неподдающемся обнаружению уровне вплоть до окончания эксперимента (три дня после второй терапевтической инъекции). Обнаружено также эффективное истощение В-клеток в селезенке обработанных мышей. Активность В-клеточного истощения оказалась параллельной активности кратковременной Т-клеточной активации в крови обработанных животных, которая возвращалась к исходному уровню через 3 дня после терапевтической инъекции за исключением маркеров активации GZB и PD-1, экспрессия которых сохранялась на более высоком уровне по сравнению с необработанным контролем.

Противоопухолевая активность анти-CD20/анти-CD3 ТСВ на модели WSU-DLCL2.

Противоопухолевую активность CD20 ТСВ тестировали на NOG-мышьях, несущих клетки человеческой диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы линии WSU-DLCL2, и которым вводили моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) человека. В целом, метод состоял в следующем: самкам NOG-мышей инъекцировали подкожно (s.c.)  $1,5 \times 10^6$  клеток WSU-DLCL2 (исходно полученных из Европейской коллекции клеточных культур). Когда средний объем опухоли достигал 200 мм<sup>3</sup>, мышам вводили с помощью внутривенной инъекции человеческие PBMC ( $10 \times 10^6$  клеток на мышшь) в качестве источника человеческих Т-клеток. Через 2 дня мышей подвергали терапевтической *i.v.*-обработке CD20 ТСВ в дозе 0,5 мг/кг, которую вводили 1 раз в неделю. Как продемонстрировано на фиг. 21, CD20 ТСВ обладала высокой противоопухолевой активностью, вызывая почти полный регресс опухолей в конце эксперимента (день 34).

Пример 2. Получение активирующего Т-клетки биспецифического антитела "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов и без них (анти-BCMA/анти-CD3).

Схематические иллюстрации молекул, полученных в этом примере, представлены на фиг. 22. Молекула анти-BCMA/анти-CD3 "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" без модификаций зарядов (обозначенная в этом примере как "83A10-ТСВ") содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 22-25, молекула анти-BCMA/анти-CD3 "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов (обозначенная в этом примере как "83A10-ТСВcv") содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 26-29.

Для создания векторов для BCMA×CD3 биспецифических антител применяли полученные из IgG1 биспецифические молекулы, состоящие по меньшей мере из двух антигенсвязывающих фрагментов, которые обладают способностью связываться специфически с двумя различными антигенными детерминантами CD3 и BCMA. Антигенсвязывающие фрагменты представляли собой Fab-фрагменты, состоящие из тяжелой и легкой цепи, каждая из которых содержит переменную и константную область. По меньшей мере один из Fab-фрагментов представлял "Crossfab"-фрагмент, в котором обменены VH и VL. Обмен VH и VL в Fab-фрагменте гарантирует, что Fab-фрагменты с различной специфичностью не будут иметь идентичные организации доменов. Сконструированная биспецифическая молекула являлась одновалентной в отношении CD3 и двухвалентной в отношении BCMA, в которой один Fab-фрагмент слит с

N-концом внутреннего CrossFab (2+1). Биспецифическая молекула содержала Fc-область для удлинения времени полужизни молекулы. Молекулы получали путем котрансфекции клеток НЕК293 EBNA, растущих в суспензии, экспрессионными векторами для клеток млекопитающих с использованием полиэтиленimina (ПЭИ). Для получения конструкцией 2+1 CrossFab-IgG клетки трансфектировали соответствующими экспрессионными векторами в соотношении 1:2:1:1 ("вектор Fc(выступ)" : "вектор легкой цепи" : "вектор легкой цепи CrossFab": "вектор тяжелой цепи-CrossFab").

Для биспецифических антител интродукция замены/обмена в одно связывающее плечо "Crossfab" значительно снижает количество побочных продуктов, но указанный путь получения не полностью свободен от побочных продуктов (что описано подробно в WO 2009/080252 и у Schaefer W. и др., PNAS, 108, 2011, сс. 11187-11191). Таким образом, для дополнительного снижения побочных продуктов, образование которых связано с ошибочным спариванием легкой цепи антитела к первому антигену с "неправильной" тяжелой цепью антитела к второму антигену, и для повышения выхода биспецифического антитела применяли дополнительный подход к созданию молекулы путем интродукции заряженных аминокислот с противоположным зарядом в специфические аминокислотные положения в СН1- и СL-доменах, при этом (I) в константном домене СL первой легкой цепи, указанной в подпункте а), аминокислоту в положении 124 заменяли независимо на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (К), аргинин (R)), и в константном домене СН1 первой тяжелой цепи, указанной в подпункте а), аминокислоту в положении 147 или аминокислоту в положении 213 заменяли независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно Кэботу); или II) в константном домене СL второй легкой цепи, указанной в подпункте б), аминокислоту в положении 124 заменяли непосредственно на лизин (К), аргинин (R) или гистидин (H) (нумерация согласно Кэботу) (в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения независимо на лизин (К), аргинин (R)), и в константном домене СН1 второй тяжелой цепи, указанной в подпункте б), аминокислоту в положении 147 или аминокислоту в положении 213 заменяли независимо на глутаминовую кислоту (E) или аспарагиновую кислоту (D) (нумерация согласно Кэботу).

Для получения биспецифических антител биспецифические антитела экспрессировали в НЕК293-EBNA-клетках путем кратковременной котрансфекции соответствующими экспрессионными векторами для клеток млекопитающих, которые культивировали в суспензии, с использованием полиэтиленimina (ПЭИ). За 1 день до трансфекции клетки НЕК293-EBNA высевали из расчета 1,5 млн жизнеспособных клеток/мл в среду Ex-Cell, дополненную 6 мМ L-глутамином. Для получения каждого 1 мл конечного объема для производства центрифугировали 2 млн жизнеспособных клеток (5 мин при 210×g). Супернатант удаляли аспирацией и клетки ресуспендировали в 100 мкл среды CD CHO. Для получения каждого 1 мл конечного объема для производства, содержащего ДНК, смешивали 1 мкг ДНК (соотношение тяжелая цепь: модифицированная тяжелая цепь: легкая цепь: модифицированная легкая цепь = 1:1:2:1) в 100 мкл среды CD CHO. После добавления 0,27 мкл раствора ПЭИ (1 мг/мл) смесь интенсивно перемешивали в течение 15 с и выдерживали при комнатной температуре в течение 10 мин. Через 10 мин ресуспендированные клетки и смесь ДНК/ПЭИ объединяли и затем переносили в соответствующий контейнер, который помещали в шейкер (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). После инкубации в течение 3 ч добавляли 800 мкл среды Ex-Cell, дополненной 6 мМ L-глутамином, 1,25 мМ вальпроевой кислотой и 12,5% Peppsoy (50 г/л) на каждый 1 мл конечного объема для производства. Через 24 ч добавляли 70 мкл Feed (SF40, фирма Lonza) на каждый 1 мл конечного объема для производства. Через 7 дней или после того, когда жизнеспособность клеток становилась равной 70% или ниже, клетки отделяли от супернатанта центрифугированием и подвергали стерилизующей фильтрации. Антитела очищали с помощью стадии аффинной хроматографии и одной или двух стадий окончательной очистки с использованием катионообменной хроматографии и гель-фильтрации. При необходимости применяли дополнительную стадию окончательной очистки.

При осуществлении стадии аффинной хроматографии супернатант загружали в колонку с белком А (HiTrap Protein A FF, 5 мл, фирма GE Healthcare), уравновешенную 6 CV буфера, содержащего 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, рН 7,5. После стадии промывки таким же буфером антитело элюировали из колонки, используя стадию элюции буфером, содержащим 20 мМ фосфат натрия, 100 мМ хлорид натрия, 100 мМ глицин, рН 3,0. Фракции, содержащие требуемое антитело, немедленно нейтрализовали 0,5 М фосфатом натрия, рН 8,0 (1:10), объединяли и концентрировали центрифугированием. Концентрат подвергали стерилизующей фильтрации и дополнительно обрабатывали с помощью катионообменной хроматографии и/или гель-фильтрации.

При осуществлении стадии катионообменной хроматографии концентрированный белок разводили в соотношении 1:10 таким же буфером для элюции, который применяли для стадии аффинной хроматографии, и загружали в катионообменную колонку (Pogos 50 HS, фирма Applied Biosystems). После двух стадий промывки уравновешивающим буфером и промывочным буфером, которые содержали соответственно 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, 20 мМ Трис, рН 5,0 и 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, 20 мМ Трис, 100 мМ хлорид натрия, рН 5,0, белок элюировали с помощью градиента, используя 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, 20 мМ Трис, 100 мМ хлорид натрия. рН 8,5. Фрак-

ции, содержащие требуемое антитело, объединяли, концентрировали центрифугированием, подвергали стерилизующей фильтрации и дополнительно обрабатывали, используя стадию гель-фильтрации.

При осуществлении стадии гель-фильтрации концентрированный белок инъецировали в колонку XK16/60 HiLoad Superdex 200 (фирма GE Healthcare), применяя в качестве буфера для композиции 20 mM гистидин, 140 mM хлорид натрия, pH 6,0 с добавлением Твин20 или без него. Фракции, содержащие мономеры, объединяли, концентрировали центрифугированием и подвергали стерилизующей фильтрации, помещали в стерильный пузырек.

Определение концентрации антитела осуществляли при длине волны абсорбции 280 нм, используя теоретическое значение абсорбции 0,1%-ного раствора антитела. Эта величина основывалась на аминокислотной последовательности и ее рассчитывали с помощью программы GPMW (фирма Lighthouse data).

Чистоту и содержание мономера конечного препарата белка определяли с помощью КЭ-ДСН (система Caliper LabChip GXII (фирма Caliper Life Sciences)), соответственно ЖХВР (аналитическая колонка для гель-фильтрации TSKgel G3000 SW XL (фирма Tosoh)) в буфере, содержащем 25mM фосфат калия, 125 mM хлорид натрия, 200mM моногидрохлорид L-аргинина, 0,02% (мас./об.) азида натрия, pH 6,7.

Для подтверждения молекулярной массы конечных белковых препаратов и подтверждения гомогенности препарата молекул в конечном белковом растворе применяли жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию (ЖХ-МС). Сначала осуществляли стадию дегликозилирования. Для устранения связанной с углеводами гетерогенности конструкции обрабатывали PNGазойF (фирма ProZyme). Для этой цели значение pH белкового раствора доводили до pH 7,0, добавляя 2 мкл 2M Трис к 20 мкг белка с концентрацией 0,5 мг/мл. Добавляли 0,8 мкг PNGазыF и инкубировали в течение 12 ч при 37°C. Затем осуществляли онлайн детекцию с помощью ЖХ-МС. Для осуществления метода ЖХ-МС применяли устройство Agilent HPLC 1200, соединенное с масс-спектрометром TOF 6441 (фирма Agilent). Хроматографическое разделение осуществляли на полистирольной колонке Macherey Nagel; RP1000-8 (размер частиц 8 мкм, 4,6×250 мм; каталожный № 719510). Элюент А представлял собой 5% ацетонитрила и 0,05 об.% муравьиной кислоты в воде, элюент Б представлял собой 95% ацетонитрила, 5% воды и 0,05% муравьиной кислоты. Скорость потока составляла 1 мл/мин, разделение осуществляли при 40°C и с использованием 6 мкг (15 мкл) белкового образца, полученного с помощью описанной выше обработки.

Время (мин.)	%Б
0,5	15
10	60
12,5	100
14,5	100
14,6	15
16	15
16,1	100

Полученный в течение первых 4 мин элюат отправляли в отходы для предупреждения загрязнения солями масс-спектрометра. Через ESI-источник пропускали осушающий газ со скоростью 12 л/мин, температура составляла 350°C и давление в распылителе составляло 60 фунтов на кв.дюйм. МС-спектры получали, используя напряжение фрагментатора 380 В и диапазон масс от 700 до 3200 m/z в режиме положительной ионизации. МС-данные получали, используя программное обеспечение устройства, начиная с 4 мин и до 17 мин.

На фиг. 23 представлены изображения, полученные с помощью КЭ-ДСН (невосстанавливающие условия) конечных белковых препаратов после применения различных методов очистки антител 83A10-TCB и 83A10-TCBsv. После стадий очистки антитела 83A10-TCB с помощью аффинной хроматографии на белке А (РА) и гель-фильтрации (SEC) установлено, что его чистота составляла <30% и содержание мономера 82,8% (А). После применения дополнительных стадий очистки, включающих катионообменную хроматографию (cIEX) и конечную гель-фильтрацию (re-SEC), конечных белковых препаратов, указанных на фиг. 23А, чистота повышалась до 93,4%, однако содержание мономеров оставалось таким же и выход значительно снижался, составляя 0,42 мг/л. Однако, когда осуществляли специфические модификации зарядов в антителе 83A10 анти-BCMA Fab CL-CH1, а именно, антителе 83A10-TCBsv, получали улучшенный профиль касательно получения/очистки TCB-молекулы, о чем свидетельствовали чистота 95,3%, содержание мономера 100% и выход вплоть до 3,3 мг/л, что можно было обнаружить уже после применения стадий очистки РА + cIEX + SEC (фиг. 23В) по сравнению с результатами, представленными на фиг. 23Б, из которых следует, что профиль получения/очистки характеризовался в 7,9 раз более низким выходом и на 17,2% более низким содержанием мономера, несмотря на включение дополнительной стадии очистки с использованием re-SEC.

Затем осуществляли сравнение по принципу "голова-к-голове" профиля получения/очистки антител 83A10-TCB и 83A10-TCBsv для дополнительной оценки преимуществ модификаций зарядов в CL-CH1 в антителах. Как продемонстрировано на фиг. 24, свойства антител 83A10-TCB и 83A10-TCBsv оценивали в режиме "бок-о-бок" и сравнивали после каждой стадии очистки 1) только аффинной РА-хроматографией (А, Б), 2) РА-аффинной хроматографией с последующей SEC (В, Г) и 3) аффинной РА-хроматографией с последующей SEC, после чего осуществляли cIEX и re-SEC (Д, Е). Графики, иллюстр-

рирующие результаты, полученные с помощью КЭ-ДСН (невосстанавливающие условия) конечных белковых растворов после осуществления соответствующих методов очистки антител 83A10-TCB и 83A10-TCBcv, представлены на фиг. 24. Как показано на фиг. 24А и 24Б, улучшения, связанные с применением вариантов зарядов, в антителе в виде TCB, проявляются уже после очистки только аффинной РА-хроматографией. В указанном опыте, проведенном с использованием принципа "голова-к-голове", осуществление стадии очистки антитела 83A10-TCB аффинной РА-хроматографией приводило к получению продукта с чистотой 61,3%, выходом 26,2 мг/л и содержанием мономера 63,7% (фиг. 24А). Для сравнения, когда антитело 83A10-TCBcv очищали с помощью аффинной РА-хроматографии, все показатели улучшались, о чем свидетельствует большая чистота, составляющая 81,0%, больший выход, составляющий 51,5 мг/л, и более высокое содержание мономера, составляющее 68,2% (фиг. 24Б). Когда применяли дополнительную стадию очистки с помощью SEC конечных белковых препаратов, то, как продемонстрировано на фиг. 24А и 24Б, у 83A10-TCB чистота повышалась до 69,5%, выход до 14,1 мг/л и содержание мономера до 74,7%, для сравнения, у 83A10-TCBcv чистота и содержание мономера повышалось до 91,0 и 83,9% соответственно, а выход составлял 10,3 мг/л. Даже с учетом того, что выход 83A10-TCBcv слегка снижался по сравнению с 83A10-TCB (был на 27% ниже) в этом конкретном эксперименте, процентное содержание "правильной" молекулы оказалось значительно более высоким для 83A10-TCBcv, чем для 83A10-TCB, соответственно 90% относительно 40-60%, при измерении с помощью ЖХ-МС. При осуществлении третьей процедуры сравнения по принципу "голова-к-голове" конечные препараты белков 83A10-TCB и 83A10-TCBcv, указанные на фиг. 24В и 24Г, объединяли примерно с 1 л (эквивалентные соотношения) соответствующих конечных препаратов белков из другой очищенной партии (такое же получение) после очистки только с помощью аффинной РА-хроматографии. Затем объединенные белковые препараты дополнительно очищали с помощью методов очистки сIEX и SEC. Как продемонстрировано на фиг. 24Д и 24Е, надежно подтверждено улучшение профиля получения/очистки антитела в виде TCB с вариантами зарядов по сравнению с антителом в виде TCB без варианта зарядов. После нескольких стадий с применением различных методов очистки (т.е. РА +/- SEC + сIEX + SEC), которые использовали для очистки антитела 83A10-TCB, чистота продукта достигала лишь 43,1% и содержание мономера, которое удалось достигнуть, составляло 98,3%, но при этом ухудшался выход, который снижался до 0,43 мг/л. Процентное содержание правильной молекулы, измеренное с помощью ЖХ-МС, все еще оставалось низким, составляя 60-70%. В целом, качество конечного препарата белка оказалось неприемлемым для применения *in vitro*. В полной противоположности этому оказалось, что когда тем же самым стадиям очистки в такой же хронологии подвергали антитело 83A10-TCBcv, то достигали чистоты 96,2% и содержания мономера 98,9%, а также содержания правильной молекулы 95% по данным, полученным с помощью ЖХ-МС. Однако выход также существенно снижался до 0,64 мг/л после стадии очистки с помощью сIEX. Результаты свидетельствуют о том, что более высокой чистоты, более высокого содержания мономера, более высокого процентного содержания правильной молекулы и более высокого выхода можно достигать в случае антитела 83A10-TCBcv уже после двух стандартных стадий очистки, т.е. аффинной РА-хроматографии и SEC (фиг. 24Г), в то время как таких характеристик не удавалось достигать в случае 83A10-TCB, даже при применении дополнительных стадий очистки (фиг. 24Д).

В табл. 10 обобщены свойства 83A10-TCB в сравнении с 83A10-TCVcv после стадии очистки с использованием РА. В табл. 11 обобщены свойства 83A10-TCB в сравнении с 83A10-TCVcv после стадий очистки с использованием РА и SEC. В табл. 12 обобщены свойства 83A10-TCB в сравнении с 83A10-TCVcv после стадий очистки с использованием только РА и SEC плюс РА с последующими стадиями очистки с использованием сIEX и ге-SEC. В таблицах 10-12 величины, выделенные жирным шрифтом, соответствуют улучшенным свойствам при сравнении 83A10-TCB и 83A10-TCVcv. За одним исключением, которое может не являться репрезентативным, все параметры получения/очистки и все величины, полученные в трех сравнительных экспериментах, проведенных по принципу "голова-к-голове", оказались более высокими для 83A10-TCBcv по сравнению с 83A10-TCB. В целом, результаты продемонстрировали, что можно достигать преимуществ касательно получения/очистки при применении модификаций зарядов CL-CH1 в антителах в виде TCB и что только две стадии очистки (т.е. аффинная РА-хроматография и SEC) требовались для достижения уже высокого качества белковых препаратов с очень хорошими технологическими свойствами.

Таблица 10. Профиль получения/очистки активирующих Т-клетки биспецифических антител к ВСМА/к CD3 после стадии очистки аффинной хроматографией на белке А

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Чистота (%)	61,3	<b>81,0</b>
Выход (мг/л)	26,2	<b>51,5</b>
Количество (мг)	24,3	<b>50,2</b>
Мономер (%)	63,7	<b>68,2</b>
«Правильная» молекула по данным ЖХ-МА (%)	n.d.	n.d.

Таблица 11. Профиль получения/очистки активирующих Т-клетки биспецифических антител к ВСМА/к CD3 после стадий очистки аффинной хроматографией на белке А и гель-фильтрацией

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Чистота (%)	69,5	<b>91,0</b>
Выход (мг/л)	14,1	10,3
Количество (мг)	13,1	10,0
Мономер (%)	74,7	<b>83,9</b>
«Правильная» молекула по данным ЖХ-МА (%)	40-60	<b>90</b>

Таблица 12. Профиль получения/очистки активирующих Т-клетки биспецифических антител к ВСМА/к CD3 после стадий очистки 1.а) аффинной хроматографией на белке А и гель-фильтрацией и 1.б) только аффинной хроматографией на белке А при объединении с последующей 2) катионообменной хроматографией и 3) конечной гель-фильтрацией.

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Чистота (%)	43,1	<b>96,2</b>
Выход (мг/л)	0,43	<b>0,64</b>
Количество (мг)	0,73	<b>1,27</b>
Мономер (%)	98,3	<b>98,9</b>
«Правильная» молекула по данным ЖХ-МА (%)	60-70%	<b>&gt;95%</b>

Связывание активирующих Т-клетки биспецифических антител к ВСМА/к CD3 с ВСМА-позитивными клеточными линиями множественной миеломы (проточная цитометрия).

Анализировали с помощью проточной цитометрии связывание антител к ВСМА/к CD3 в виде TCB (83A10-TCB, 13A4-TCBcv) с человеческим ВСМА на экспрессирующих ВСМА клетках NCI-H929 (ATCC® CRL-9068™). Линию MKN45 (линия клеток человеческой аденокарциномы желудка, не экспрессирующая ВСМА) применяли в качестве отрицательного контроля. В целом, метод состоял в следующем: культивированные клетки собирали, подсчитывали количество и определяли жизнеспособность клеток с помощью устройства ViCell. Затем количество жизнеспособных клеток доводили до  $2 \times 10^6$  клеток на мл в содержащем БСА FACS-буфере для окрашивания (фирма BD Biosciences). 100 мкл указанной клеточной суспензии дополнительно разделяли на аликвоты для внесения в лунку круглодонного 96-луночного планшета и инкубировали с 30 мкл антител к ВСМА или с соответствующим применяемым в качестве контроля IgG в течение 30 мин при 4°C. Все антитела к ВСМА/к CD3 в виде TCB (и TCB-контроли) титровали и анализировали в конечном диапазоне концентраций от 1 до 300 нМ. Затем клетки центрифугировали (5 мин, 350×g), промывали, используя 120 мкл/лунку FACS-буфера для окрашивания (фирма BD Biosciences), ресуспендировали и инкубировали в течение еще 30 мин при 4°C с конъюгированным с флуорохромом, конъюгированным с PE F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом козьего античеловеческого IgG AffiniPure, Fc-фрагмент специфического (фирма Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170). Затем клетки промывали дважды буфером для окрашивания (фирма BD Biosciences), фиксировали с использованием 100 мкл фиксирующего BD-буфера на лунку (фирма BD Biosciences, 554655) при 4°C в течение 20 мин, ресуспендировали в 120 мкл FACS-буфера и анализировали с помощью устройства BD FACS CantoII. Как продемонстрировано на фиг. 25, строили график зависимости средней интенсивности флуоресценции антител к ВСМА/к CD3 в виде TCB от концентраций антитела; (А) 83A10-TCB на H929-клетках и MKN45-клетках, (Б) 83A10-TCBcv на H929-клетках и MKN45-клетках. Если это было возможно, рассчитывали EC<sub>50</sub> с помощью программы Prism (фирма GraphPad, Ла-Джола, шт. Калифорния, США), и величины EC<sub>50</sub>, соответствующие концентрации антитела, требуемой для достижения 50% от максимального связывания, характеризующие связывание 83A10-TCB и 83A10-TCBcv с H929-клетками, обобщены в табл. 13. На фиг. 25В продемонстрировано, что 83A10-TCB и 83A10-TCBcv связывались с H929-клетками в зависимости от концентрации и со сходной эффективностью. Указанные результаты являлись ожидаемыми, поскольку молекулы 83A10-TCB и 83A10-TCBcv имеют идентичные последовательности CDR в соответствующих переменных доменах VL и VH. Контрольное антитело DP47-TCB не связывалось с ВСМА-позитивными клетками миеломы H929, по данным, которые свидетельствуют об отсутствии повышения медианной интенсивности флуоресценции. Во втором, проведенном по принципу "голова-к-голове" сравнительном эксперименте, оценивали связывание 83A10-TCB и 83A10-TCBcv с ВСМА-позитивными H929-клетками и отсутствие связывание с ВСМА/CD3-негативными MKN45-клетками. Как продемонстрировано на фиг. 25Г, 83A10-TCB и 83A10-TCBcv связывались с ВСМА-позитивными H929-клетками в зависимости от концентрации и со сходной эффективностью. Величины EC<sub>50</sub>, характеризующие связывание 83A10-TCB и 83A10-TCBcv с H929-клетками в указанном втором эксперименте, обобщены в табл. 14.

Таблица 13. Величины EC<sub>50</sub>, характеризующие связывание антител к ВСМА/к CD3 в виде TCB с H929-клетками (эксперимент 1)

Анти-ВСМА/анти-CD3 TCB-молекулы	EC <sub>50</sub> (нМ)	EC <sub>50</sub> (мкг/мл)
83A10-TCB	9,8	1,9
83A10-TCBcv	14,5	2,8

Таблица 14. Величины  $EC_{50}$ , характеризующие связывание антител к ВСМА/к CD3 в виде ТСВ с H929-клетками (эксперимент 2)

Анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ-молекулы	$EC_{50}$ (нМ)	$EC_{50}$ (мкг/мл)
83A10-ТСВ	16,9	3,25
83A10-ТСВcv	14,5	2,8

Переориентированная Т-клеточная цитотоксичность в отношении клеток миеломы линии H929 с высоким уровнем экспрессии ВСМА, индуцированная активирующими Т-клетки биспецифическим антителами к ВСМА/к CD3 (анализ высвобождения ЛДГ).

Антитела к ВСМА/к CD3 в виде ТСВ анализировали также в отношении их способности индуцировать опосредуемый Т-клетками апоптоз клеток миеломы с высоким уровнем экспрессии ВСМА после перекрестного сшивания конструкции посредством связывания антигенсвязывающих фрагментов с ВСМА на клетках. В целом, метод состоял в следующем: клетки-мишени, представляющие собой экспрессирующие человеческий ВСМА клетки множественной миеломы линии H929, собирали с использованием буфера для диссоциации клеток, промывали и ресуспендировали в среде RPMI, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (фирма Invitrogen). Высевали примерно 30000 клеток на лунку в круглодонный 96-луночный планшет и добавляли соответствующее разведение конструкции антитела до достижения требуемой конечной концентрации (в трех повторностях); конечные концентрации находились в диапазоне от 0,1 пМ до 10 нМ. Для соответствующего сравнения молярность всех ТСВ-конструкций и контролей доводили до одинакового уровня. В лунки добавляли популяцию всех Т-клеток (эффекторные клетки) до получения конечного соотношения эффектор: мишень (Е:Т) 5:1. Когда применяли человеческие РВМС в качестве эффекторных клеток, то использовали конечное соотношение Е:Т 10:1. Для получения групп, представляющих собой отрицательные контроли, применяли только эффекторные клетки или клетки-мишени. Для положительного контроля активации человеческих пан-Т-клеток применяли 1 мкг/мл РНА-М (фирма Sigma, № L8902). Для стандартизации определяли максимальный лизис клеток-мишеней множественной миеломы (ММ) линии H929 (= 100%) путем инкубации клеток-мишеней с Тритоном X-100 в концентрации 1%. Минимальный лизис (= 0%) соответствовал совместной инкубации клеток-мишеней только с эффекторными клетками, т.е. без какой-либо активирующей Т-клетки биспецифической конструкции. После инкубации в течение 2-24 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> оценивали высвобождение ЛДГ в супернатант из апоптотических/некротизированных клеток-мишеней миеломы с помощью набора для детекции ЛДГ (фирма Roche Applied Science), согласно инструкциям производителя. Строили график зависимости высвобождения ЛДГ от концентраций активирующих Т-клетки биспецифических антител к ВСМА/к CD3 с получением кривых концентрация-ответ. Если это было возможно, рассчитывали  $EC_{50}$  с помощью программы Prism (фирма GraphPad) и определяли как концентрацию антитела в виде ТСВ, которая приводила к 50%-ному от максимального высвобождению ЛДГ. Как продемонстрировано на фиг. 26, антитела к ВСМА/к CD3 в виде ТСВ (83A10-ТСВ (А, Б), 83A10-ТСВcv (В, Г)) индуцировали зависимый от концентрации цитолиз ВСМА-позитивных клеток миеломы H929 при оценке по высвобождению ЛДГ. Цитолиз H929 оказался специфическим, поскольку контрольное антитело DP47-ТСВ, которое не связывается с ВСМА-позитивными клетками-мишенями, не индуцировало высвобождение ЛДГ, даже при применении в наиболее высокой концентрации 1нМ (А). Даже с учетом того, что величины  $EC_{50}$  для 83A10-ТСВ (А, Б) и 83A10-ТСВcv (В, эксперимент 1) не поддавались определению с помощью программы статистического анализа Prism (фирма GraphPad), приблизительно можно определить, что характеризующие эффективность величины  $EC_{50}$  находились в нижнем пиколярном диапазоне, как для незаряженных, так и для заряженных ТСВ-молекул. Во втором эксперименте оценивали воздействие 83A10-ТСВcv с помощью анализа определения переориентированной Т-клеточной цитотоксичности и удалось установить, что величина  $EC_{50}$  составляла 1,5пМ. При оценке результатов, полученных при создании изобретения, не следует исключать, что несколько более низкая величина  $EC_{50}$  (несколько лучшая эффективность) может являться следствием вариабельности донорской крови. Однако установлено, что величина, характеризующая способность уничтожать H929-клетки, находится в нижнем пиколярном диапазоне. В целом, результаты позволяют предположить, что 83A10-ТСВ (без варианта зарядов) по сравнению с 83A10-ТСВcv (с вариантом зарядов) обладало сходными биологическими свойствами при оценке с помощью проведенных на клетках анализов.

Таблица 15. Величины  $EC_{50}$  и результаты оценки цитолиза переориентированными Т-клетками H929-клеток, индуцированного антителами к ВСМА/к CD3 в виде ТСВ

Анти-ВСМА/анти-CD3 ТСВ-молекулы	$EC_{50}$ (пМ)	$EC_{50}$ (мкг/мл)
83A10-ТСВ (эксперимент 1 1)	нижний пМ-диапазон (примерно <20)	Однозначное число
83A10-ТСВ (эксперимент 2)	нижний пМ-диапазон (примерно <20)	Однозначное число
83A10-ТСВcv (эксперимент 1)	нижний пМ-диапазон (примерно <20)	Однозначное число
83A10-ТСВcv (эксперимент 2)	1,5	0,3

Пример 3.

Получение активирующего Т-клетки биспецифического антитела "2+1 IgG CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов (анти-Her2/анти-CD3) и активирующего Т-клетки биспецифического антитела "2+1 IgG CrossFab" с модификациями зарядов (анти-Her3/анти-CD3)

Схематическая иллюстрация молекул, получение которых описано в этом примере, представлена на фиг. 27. Молекула анти-Her2/анти-CD3 "2+1 IgG.

CrossFab, инвертированная" с модификациями зарядов (обозначенная в данном примере как "Her2 TCB") содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 21, 52, 53 и 54. Молекула анти-Her3/анти-CD3 "2+1 IgG CrossFab" с модификациями зарядов (обозначенная в данном примере как "Her3 TCB") содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 21, 55, 56 и 57.

Молекулы получали, очищали и анализировали согласно методу, описанному выше в примере (с использованием одной стадии препаративной SEC).

Обе молекулы можно очищать, достигая высокого конечного качества, продемонстрированного с помощью аналитической гель-фильтрации и КЭ-ДСН (табл. 16, 17). Хотя выход Her2 TCB при таком получении был ниже по сравнению с Her3 TCB, белок оказался практически чистым после двух стадий очистки (на белке А и SEC). С помощью анализа методом КЭ-ДСН продемонстрировано наличие лишь 1,18% низкомолекулярных примесей с молекулярной массой примерно 164 кДа (табл. 17). Вид, обнаруженный при 187,28 кДа, соответствовал молекуле-мишени без N-связанного гликозилирования в Fc-домене (этот вид, как правило, обнаруживается с помощью КЭ-ДСН в человеческом IgG<sub>1</sub> после получения в эукариотических клетках).

Her3 TCB можно очищать с достижением высокого выхода. Конечное качество превышало качество Her2 TCB при сравнении содержания конечного мономера. Кроме того, с помощью КЭ-ДСН продемонстрировано присутствие 100% требуемого белка, учитывая, что пик, обнаруженный при 192,05 кДа, соответствует негликозилированному виду Fc.

Для обоих препаратов с помощью КД-ДСН или аналитической гель-фильтрации не обнаружены никакие связанные с продуктом низкомолекулярные примеси, такие как свободные легкие цепи (ожидаемая молекулярная масса 25 кДа), димеризованные легкие цепи, которые могут образовываться в результате интродукции только CH1-CL-обмена в одной легкой цепи (ожидаемая молекулярная масса 50 кДа), или молекулы с ошибочно или нековалентно связанными легкими цепями (ожидаемая молекулярная масса 125, 150 или 175 кДа).

Таблица 16. Обобщение данных о производстве и очистке анти-Her2/анти-CD3 и анти-Her3/анти-CD3 TCB-молекул с модификациями зарядов

Молекула	Титр [мг/л]	Выход [%]	Выход [мг/л]	Аналитическая SEC (HMW/мономер/LMW) [%]
Her2 TCB	45	1,8	1	3,3/96,7/0
Her3 TCB	72	12,7	11,42	0/100/0

Таблица 17. Результаты анализа методом КЭ-ДСН (невосстанавливающие условия) анти-Her2/анти-CD3 и анти-Her3/анти-CD3 TCB-молекул с модификациями зарядов

Молекула	Пик, №	размер [кДа]	Чистота [%]
Her2 TCB	1	163,99	1,18
	2	187,28	1,30
	3	200,81	97,52
Her3 TCB	1	192,05	19,36
	2	198,57	80,64

Связывание Her2 TCB и Her3 TCB с клетками.

Клетки Jurkat из суспензионной культуры собирали, однократно промывали FACS-буфером (3ФР + 0,1% БСА) и определяли жизнеспособность с помощью устройства ViCell.

Прикрепленные опухолевые клетки KPL-4 (любезно предоставленные J. Kurebayashi, медицинская школа Кавасаки, Япония) собирали с использованием буфера для диссоциации клеток (фирма Gibco Invitrogen) и однократно промывали FACS-буфером перед определением жизнеспособности с помощью устройства ViCell.

По 0,2 млн клеток высевали на лунку круглодонного 96-луночного планшета и планшеты центрифугировали в течение 4 мин при 400 × g. Затем к клеткам добавляли по 25 мкг на лунку разведений TCB в FACS-буфере. Клетки инкубировали в течение 30 мин в холодильнике. Затем клетки дважды промывали, используя 150 мкл FACS-буфера на лунку.

25 мкл имеющего соответствующее разведение вторичного антитела (конъюгированный с ФИТЦ F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент козьего античеловеческого IgG AffiniPure, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент специфического, фирма Jackson ImmunoResearch) добавляли в лунку и планшеты окрашивали в течение еще 30 мин при 4°C в темноте.

Планшеты промывали дважды, используя 150 мкл FACS-буфера на лунку, и ресуспендировали в 150 мкл FACS-буфера. Анализ осуществляли с помощью устройства BD FACS CantoII, снабженного программой FACS Diva. Строили график зависимости величины медианной интенсивности флуоресцен-

ции (MFI) от концентрации ТСВ-молекул.

Как продемонстрировано на фиг. 29, для обеих ТСВ обнаружено высокое зависящее от концентрации связывание с соответствующими антигенами-мишенями на клетках.

Активация человеческих эффекторных CD8<sup>+</sup>-Т-клеток после опосредуемого Т-клетками лизиса человеческих опухолевых клеток, индуцированного Her3 ТСВ.

В классическом эксперименте по лизису опухолевых клеток (описанному ниже) оценивали активацию эффекторных CD8<sup>+</sup>-Т-клеток с помощью Her3 ТСВ на основе процента CD69-позитивных клеток при использовании соотношения эффектора к мишени (Е:Т) 10:1 и продолжительности инкубации 48 ч. В целом, метод состоял в следующем: после инкубации РВМС переносили в круглодонный 96-луночный планшет, центрифугировали при 350×g в течение 5 мин и промывали дважды ЗФР, содержащим 0,1% БСА. Окрашивание на поверхности CD8 (фирма Biolegend, № 300908) и CD69 (фирма BioLegend, № 310904) осуществляли согласно руководству поставщика. Клетки промывали дважды, используя 150 мкл/лунку ЗФР, содержащего 0,1% БСА, и фиксировали в течение 20 мин при 4°C, используя 100 мкл/лунку 1% PFA. После центрифугирования образца ресуспендировали в 200 мкл/лунку ЗФР, 0,1% БСА и анализировали с помощью устройства FACS CantoII (программа FACS Diva).

Как продемонстрировано на фиг. 30, Her3 ТСВ индуцирует перекрестное сшивание Т-клеток и опухолевых клеток (KPL-4) через соответствующие направленные к мишенями фрагменты и индуцирует активацию Т-клеток в зависимости от концентрации.

Анализ активации Jurkat-NFAT.

Способность Her2 ТСВ и Her3 ТСВ индуцировать перекрестное сшивание Т-клеток и последующую Т-клеточную активацию исследовали, применяя совместные культуры позитивных по опухолевому антигену клеток-мишеней (KPL-4) и репортерных клеток Jurkat-NFAT (экспрессирующая CD3 репортерная линия клеток острого лимфолейкоза с промотором NFAT, GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, фирма Promega, № CS176501). После одновременного связывания ТСВ-молекулы с антигеном, представляющим собой человеческий Her2, соответственно человеческий Her3 (который экспрессируется на опухолевых клетках), и антигеном CD3 (который экспрессируется на репортерных клетках Jurkat-NFAT) промотор NFAT активируется и приводит к экспрессии активной люциферазы светляка. Интенсивность люминесцентного сигнала (полученного после добавления субстрата люциферазы) пропорциональна интенсивности активации и передачи сигналов CD3.

Для осуществления анализа человеческие опухолевые клетки линии KPL-4 собирали с помощью буфера для диссоциации клеток (фирма Gibco Invitrogen) и определяли жизнеспособность с помощью устройства ViCell. Высевали по 20000 клеток/лунку в плоскодонный 96-луночный планшет с белыми стенками (фирма Greiner bio-one) и добавляли разведения ТСВ или среду (в качестве контролей). Затем собирали репортерные клетки Jurkat-NFAT и определяли жизнеспособность с помощью устройства Vi-Cell. Клетки ресуспендировали в среде для культуры клеток и добавляли к опухолевым клеткам с получением конечного соотношения Е:Т 2,5:1 (для Her2 ТСВ) или 5:1 (для Her3 ТСВ), как указано, и конечного объема 100 мкл на лунку. Клетки инкубировали в течение 5 ч при 37°C во влажной камере. В конце периода инкубации добавляли в лунки 100 мкл/лунку раствора ONE-Glo (фирма Promega, №E6120) (объемное соотношение 1:1 ONE-Glo и среды для анализа на лунку) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте. Люминесценцию определяли с помощью ридера для ELISA WALLAC Victor3 (фирма PerkinElmer2030), продолжительность детекции составляла 5 с/лунку.

Как продемонстрировано на фиг. 31, обе ТСВ-молекулы индуцируют перекрестное сшивание Т-клеток через CD3 и, как следствие, Т-клеточную активацию. Her3 ТСВ оказалась несколько более эффективной в отношении KPL-4-клеток, что можно объяснить более высоким уровнем Her3 относительно Her2 на этих клетках-мишенях.

Лизис опухолевых клеток, индуцированный Her2 ТСВ и Her3 ТСВ

Оценивали лизис опухолевых клеток, т.е. экспрессирующих Her2- или Her3 опухолевых клеток-мишеней, соответствующими ТСВ-молекулами, применяя мононуклеарные клетки периферической крови человека (РВМС) в качестве эффекторных клеток при соотношении Е:Т 10:1. Лизис опухолевых клеток определяли, измеряя высвобождение ЛДГ в супернатанты через 24 и 48 ч после инкубации с указанными ТСВ.

Человеческие РВМС выделяли из свежей крови или из лейкоцитарной пленки. В целом, метод состоял в следующем: кровь разводили ЗФР в соотношении 2:1 (свежая кровь) или 3:1 (лейкоцитарная пленка). Примерно 30 мл смеси кровь/ЗФР наслаивали на 15 мл Histopaque (фирма Sigma) и центрифугировали в течение 30 мин при 450×g без перерыва при КТ. Лимфоциты собирали с помощью 10-миллилитровой пипетки в 50-миллилитровые пробирки, содержащие ЗФР. Пробирки заполняли до 50 мл ЗФР и центрифугировали в течение 10 мин при 350×g. Супернатант отбрасывали, дебрис ресуспендировали в 50 мл ЗФР и центрифугировали в течение 10 мин при 300×g. Стадию промывки однократно повторяли. Клетки ресуспендировали в RPMI, содержащей 10% FCS и 1% GlutaMax (глутамакс) (фирма Life Technologies) и хранили при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе вплоть до начала анализа (не более 24 ч).

Клетки-мишени собирали с помощью трипсина/ЭДТК, промывали и высевали с плотностью 30000

клеток/лунку в плоскодонные 96-луночные планшеты. Клеткам давали прикрепиться во влажной камере. В день анализа планшеты центрифугировали при 350×g в течение 5 мин и среду удаляли аспирацией. Добавляли по 100 мкл на лунку среды для анализа.

ТСВ добавляли в указанных концентрациях (диапазон 0,001 пМ - 1 нМ для Her3 ТСВ и 0,01 пМ - 100 нМ для Her2 ТСВ, три повторности). РВМС добавляли к клеткам-мишеням в конечном соотношении Е:Т 10:1. Цитолиз клеток-мишеней оценивали через 24 и 48 ч после инкубации путем количественного определения ЛДГ (лактатдегидрогеназа), высвободившейся в клеточные супернатанты из апоптотных/некротизированных клеток (набор для детекции ЛДГ, фирма Roche Applied Science, № 11 644 793 001). Максимальный лизис клеток-мишеней (= 100%) получали путем инкубации клеток-мишеней с Тритоном X-100 в концентрации 1%. Минимальный лизис (= 0%) соответствовал совместной инкубации клеток-мишеней с эффекторными клетками без биспецифического антитела. Величины  $EC_{50}$  рассчитывали с помощью программы GraphPadPrism5.

В другом эксперименте лизис опухолевых клеток определяли по активности каспазы 3/7 через 6,5 ч путем измерения люминесценции в ридере для микропланшетов (время считывания 5 с на лунку).

Для определения активности каспазы 3/7 клетки-мишени KPL-4-caspase-3/7 GloSensor (KPL-4, стабильно трансфектированные плазмидой GloSensor) собирали согласно описанному выше методу. После одной промывки ЗФР концентрацию доводили до  $0,3 \times 10^6$  клеток/мл в среде для анализа (RPMI1640, 2% FCS, 1% GlutaMax) и смешивали с 2 об. % реагента GloSensor цАМФ (фирма Promega). 100 мкл (= 30000 клеток) указанной суспензии клеток-мишеней переносили в каждую лунку 96-луночного плоскодонного планшета с белыми стенками.

Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) получали путем центрифугирования в градиенте плотности Histopaque обогащенных лимфоцитами препаратов (лимфоцитарные пленки), полученных из здоровых доноров согласно описанному выше методу. Анализ лизиса опухолевых клеток осуществляли в целом согласно описанному выше методу.

Результаты, представленные на фиг. 32В и фиг. 33, иллюстрируют, что Her3 ТСВ-молекула индуцирует эффективный и зависимый от концентрации апоптоз и лизис опухолевых клеток KPL-4.

Это же обнаружено и для Her2 ТСВ и на фиг. 32А и Б проиллюстрирован выраженный и зависимый от концентрации лизис опухолевых клеток с течением времени. При этом характеризующие цитолиз величины  $EC_{50}$ , вероятно, зависят от уровня экспрессии Her2 на соответствующей клетке-мишени. Чем выше уровень экспрессии, тем выше цитолиз опухолевых клеток с помощью Her2 ТСВ.

Пример 4. Получение активирующих Т-клетки биспецифических антител "(Fab)<sub>2</sub>-CrossFab" с модификациями зарядов и без них (анти-MCSP/анти-CD3).

Схематическое изображение молекул, полученных в этом примере, представлено на фиг. 34. Молекула анти-MCSP/анти-CD3 "(Fab)<sub>2</sub>-CrossFab" с модификациями зарядов в связывающих MCSP компонентах (обозначена в данном примере как "(Fab)<sub>2</sub>-XFab-LC007cv") содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 58, 59 и 60. Молекула анти-MCSP/анти-CD3 "(Fab)<sub>2</sub>-CrossFab" без модификаций зарядов (обозначена в данном примере как "(Fab)<sub>2</sub>-XFab") содержит соответствующие аминокислотные последовательности без модификаций зарядов.

Молекулы получали, очищали и анализировали практически согласно методам, описанным выше в примере 1, со следующими адаптациями.

Для получения указанных молекула клетки НЕК293-EBNA трансфектировали соответствующими экспрессионными векторами в соотношении 1:2:1 ("вектор тяжелой цепи": "вектор легкой цепи анти-MCSP Fab": "вектор легкой цепи анти-CD3 Fab").

Концентрацию конструкций в культуральной среде определяли с помощью белокА-ЖХВР на основе связывания участков СН1-домена с белком А при рН 8,0 и стадии элюции с рН 2,5 согласно методу, описанному в примере 1.

Секретируемые белки очищали из супернатантов клеточных культур с помощью аффинной хроматографии, используя аффинную хроматографию, основанную на связывании с СН1, с последующей стадией гель-фильтрации.

Для осуществления аффинной хроматографии супернатант загружали в колонку HiTrap KappaSelect (CV=5 мл, фирма GE Healthcare), уравновешенную 5 мл буфера, содержащего 50 мМ Трис, 100 мМ глицин, 150 мМ NaCl, рН 8,0. Несвязанный белок удаляли промывкой, используя объем, кратный по меньшей мере 10 объемам колонки, буфера, содержащего 50 мМ Трис, 100 мМ глицин, 150 мМ NaCl, рН 8,0. Требуемый белок элюировали, используя в объеме, кратном 10 объемам колонки, градиент до 50 мМ Трис, 100 мМ глицин, 150 мМ NaCl, рН 2,0. Белковый раствор нейтрализовали, добавляя 1/40 2М Трис, рН 8,0. Требуемый белок концентрировали и фильтровали перед загрузкой в колонку HiLoad Superdex 200 (фирма GE Healthcare), уравновешенную буфером, содержащим 20 мМ гистидин, 140 мМ хлорид натрия, 0,01% Твин-20, рН 6,0.

Обе молекулы получали и очищали с помощью одинакового метода. По сравнению с молекулой без модификаций зарядов ("(Fab)<sub>2</sub>-XFab") титр молекулы с зарядами оказался в 10 раз более низким. Однако конечный выход оказался примерно в 2 раза выше для молекулы с модификациями зарядов в двух анти-

MCSP Fab ("Fab)2-XFab-LC007cv") (табл. 18). Молекулу (Fab)2-XFab-LC007cv можно очищать с получением конечного содержания мономера 95,8% по данным гель-фильтрации и, как установлено с помощью анализа методом КЭ-ДСН, конечная чистота составляла 94,33%.

Таблица 18. Обобщение данных о получении и очистке анти-MCSP/анти-CD3 TCB-молекул с модификациями зарядов и без модификаций зарядов

Молекула	Титр [мг/л]	Выход [%]	Выход [мг/л]	Аналитическая SEC (HMW/мономер/LMW) [%]
(Fab)2-XFab	25	6,24	7,8	0/100/0
(Fab)2-XFab-LC007cv	2,32	10,5	0,24	3,2/95,8/1

Таблица 19. Результаты КЭ-ДСН анализов (невосстанавливающие условия) анти-MCSP/анти-CD3 TCB-молекулы с модификациями зарядов

Молекула	Пик, №	размер [кДа]	Чистота [%]
(Fab)2-XFab-LC007cv	1	162,67	94,33
	2	170,59	5,67

Связывание с клетками активирующих Т-клетки биспецифических антител "(Fab)2-CrossFab" с модификациями зарядов и без них (анти-MCSP/анти-CD3).

Клетки Jurkat из суспензионной культуры собирали, однократно промывали FACS-буфером (3ФР + 0,1% БСА) и определяли жизнеспособность с помощью устройства ViCell.

Прикрепленные опухолевые клетки MV-3 собирали с использованием буфера для диссоциации клеток (фирма Gibco Invitrogen) и однократно промывали FACS-буфером перед определением жизнеспособности с помощью устройства ViCell.

Высевали по 0,2 млн клеток на лунку круглодонного 96-луночного планшета и планшеты центрифугировали в течение 4 мин при 400×g. Затем к клеткам добавляли по 25 мкг на лунку разведений первичных антител в FACS-буфере. Клетки инкубировали в течение 30 мин в холодильнике. Затем клетки дважды промывали, используя 150 мкл FACS-буфера на лунку.

25 мкл разведенного вторичного антитела (конъюгированный с ФИТЦ F(ab')2-фрагмент козьего античеловеческого IgG AffiniPure, F(ab')2-фрагмент специфического, фирма Jackson ImmunoResearch) добавляли в лунку и планшеты окрашивали в течение еще 30 мин при 4°C в темноте.

Планшеты промывали дважды, используя 150 мкл FACS-буфера на лунку, и ресуспендировали в 150 мкл FACS-буфера. Анализ осуществляли с помощью устройства BD FACS CantoII, снабженного программой FACS Diva. Строили график зависимости величин медианной интенсивности флуоресценции (MFI) от концентрации молекул MCSP TCB.

Как продемонстрировано на фиг. 36, для молекулы (Fab)2-XFab-LC007cv обнаружено зависящее от концентрации связывание с человеческим MCSP на MV-3-клетках и с человеческим CD3 на Jurkat-клетках. Для молекулы (Fab)2-XFab без модификаций зарядов обнаружено связывание с человеческим MCSP, сопоставимое с (Fab)2-XFab-LC007cv (характеризующая связывание величина EC<sub>50</sub> составляла 2,3 нМ для (Fab)2-XFab-LC007cv, а для (Fab)2-XFab величина EC<sub>50</sub> составляла 1,5 нМ).

Лизис опухолевых клеток, опосредуемый активирующими Т-клетки биспецифическим антителами "(Fab)2-CrossFab" с модификациями зарядов и без них (анти-MCSP/анти-CD3)

Лизис опухолевых клеток, т.е. экспрессирующих MCSP опухолевых клеток-мишеней линии MV-3, индуцированный молекулами MCSP TCB изучали с использованием человеческих PBMC в качестве эффекторных клеток при соотношении Е:Т 10:1. Лизис опухолевых клеток определяли, измеряя высвобождение ЛДГ в супернатанты через 24 и 48 ч после инкубации с TCB.

В целом, метод состоял в следующем: клетки-мишени собирали с помощью трипсина/ЭДТК, промывали и высеивали с плотностью 25000 клеток/лунку в плоскодонные 96-луночные планшеты. Клеткам давали прикрепиться в течение ночи во влажной камере. В день анализа планшеты центрифугировали при 350×g в течение 5 мин и среду удаляли аспирацией. Добавляли по 100 мкл на лунку среды для анализа.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из свежей крови. В целом, метод состоял в следующем: кровь разводили в соотношении 2:1 с помощью 3ФР. Примерно 30 мл смеси кровь/3ФР наслаивали на 15 мл Histopaque (фирма Sigma) и центрифугировали в течение 30 мин при 450×g без перерыва. Лимфоциты собирали с помощью 10-миллилитровой пипетки в 50-миллилитровые пробирки, содержащие 3ФР. Пробирки заполняли до 50 мл 3ФР и центрифугировали в течение 10 мин при 350×g. Супернатант отбрасывали, дебрис ресуспендировали в 50 мл 3ФР и центрифугировали в течение 10 мин при 300×g. Стадию промывки однократно повторяли. Клетки ресуспендировали в RPMI, содержащей 10% FCS и 1% GlutaMax (фирма Life Technologies) и хранили при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе вплоть до начала анализа (не более 24 ч).

Для анализа цитолиза TCB-молекулы добавляли в указанных концентрациях (диапазон 0,04 пМ - 10 нМ, три повторности). PBMC добавляли к клеткам-мишеням в конечном соотношении Е:Т 10:1. Цитолиз клеток-мишеней оценивали через 24 и 48 ч после инкубации путем количественного определения ЛДГ

(лактатдегидрогеназа), высвободившейся в клеточные супернатанты из апоптозных/некротизированных клеток (набор для детекции ЛДГ, фирма Roche Applied Science, № 11 644 793 001). Максимальный лизис клеток-мишеней (= 100%) получали путем инкубации клеток-мишеней с Тритоном X-100 в концентрации 1%. Минимальный лизис (=0%) соответствовал совместной инкубации клеток-мишеней с эффекторными клетками без биспецифического антитела. Величины  $EC_{50}$  рассчитывали с помощью программы GraphPadPrism5.

Как продемонстрировано на фиг. 37, для обеих молекул обнаружен зависящий от концентрации лизис экспрессирующих hMCSP-клеток-мишеней. Эффективность молекулы (Fab)2-XFab-LC007cv ( $EC_{50}$  2,8 пМ через 24 ч и 8,6 пМ через 48 ч) оказалась сопоставимой с эффективностью молекулы (Fab)2-XFab без модификаций зарядов ( $EC_{50}$  5,9 пМ через 24 ч и 4,8 пМ через 48 ч).

Хотя выше изобретение описано достаточно подробно с помощью иллюстраций и примеров, приведенных для целей лучшего его понимания, описание и примеры не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Все процитированные в настоящем описании патентные и научные публикации полностью включены в него в качестве ссылки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая
  - (а) первую молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном;
  - (б) вторую молекулу Fab, которая специфически связывается со вторым антигеном, и в которой вариабельные домены VL и VH легкой цепи Fab и тяжелой цепи Fab заменены друг на друга;
  - (в) третью молекулу Fab, которая специфически связывается с первым антигеном; и
  - (г) Fc-домен, состоящий из первой и второй субъединиц, которые обладают способностью к стабильной ассоциации;
    - в которой первый антиген представляет собой антиген клетки-мишени, а второй антиген представляет собой CD3; и
    - в которой третья молекула Fab, указанная в подпункте в), идентична первой молекуле Fab, указанной в подпункте а);
    - в которой в константном домене CL первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), и третьей молекуле Fab, указанной в подпункте в), аминокислота в положении 124 замена на лизин (K) (нумерация согласно Кэботу) и аминокислота в положении 123 заменена на аргинин (R) или лизин (K) (нумерация согласно Кэботу), и в которой в константном домене CH1 первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), и третьей молекулы Fab, указанной в подпункте в), аминокислота в положении 147 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота) и аминокислота в положении 213 заменена на глутаминовую кислоту (E) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота); и в которой Fc-домен представляет собой IgG Fc-домен, и в которой в CH3-домене первой субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, образуя тем самым выпуклость в CH3-домене первой субъединицы, которая может помещаться в полость в CH3-домене второй субъединицы, и в CH3-домене второй субъединицы Fc-домена аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, создавая тем самым полость в CH3-домене второй субъединицы, в которую может помещаться выпуклость в CH3-домене первой субъединицы, и где
      - (I) первая молекула Fab, указанная в подпункте а), слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab второй молекулы Fab, указанной в подпункте б), а вторая молекула Fab, указанная в подпункте б), и третья молекула Fab, указанная в подпункте в), каждая слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом одной из субъединиц Fc-домена, указанного в подпункте г), или
      - (II) вторая молекула Fab, указанная в подпункте б), слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом тяжелой цепи Fab первой молекулы Fab, указанной в подпункте а), а первая молекула Fab, указанная в подпункте а), и третья молекула Fab, указанная в подпункте в), каждая слита на С-конце тяжелой цепи Fab с N-концом одной из субъединиц Fc-домена, указанного в подпункте г).
2. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.1, в которой второй антиген представляет собой CD3 эпсилон.
3. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.2, где молекула Fab, которая специфически связывается с CD3, содержит гипервариабельный участок (CDR) 1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 4, CDR 2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 5, CDR 3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 6, CDR 1 легкой цепи SEQ ID NO: 8, CDR 2 легкой цепи SEQ ID NO: 9, и CDR 3 легкой цепи SEQ ID NO: 10.
4. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому пп.1-3, где молекула Fab, которая специфически связывается с CD3, содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.

5. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-4, где антиген клетки-мишени представляет собой CD20, и молекула Fab, которая специфически связывается с антигеном клетки-мишени, содержит гипервариабельный участок (CDR) 1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 46, CDR 2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 47, CDR 3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкой цепи SEQ ID NO: 49, CDR 2 легкой цепи SEQ ID NO: 50, и CDR 3 легкой цепи SEQ ID NO: 51.

6. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-5, где антиген клетки-мишени представляет собой CD20 и молекула Fab, которая специфически связывается с антигеном клетки-мишени, содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31.

7. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-6, в которой первая молекула Fab, указанная в подпункте а), и третья молекула Fab, указанная в подпункте в), каждая содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

8. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-7, в которой вторая молекула Fab, указанная в подпункте б), содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

9. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-8, в которой Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG<sub>1</sub> или IgG<sub>4</sub>.

10. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-9, в которой Fc-домен представляет собой человеческий Fc-домен.

11. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-10, в которой указанный аминокислотный остаток, имеющий больший объем боковой цепи, выбран из группы, состоящей из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y) и триптофана (W), а указанный аминокислотный остаток, имеющий меньший объем боковой цепи, выбран из группы, состоящей из аланина (A), серина (S), треонина (T) и валина (V).

12. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-11, в которой в CH3-доме первой субъединицы Fc-домена остаток треонина в положении 366 заменен на остаток триптофана (T366W), и в CH3-доме второй субъединицы Fc-домена остаток тирозина в положении 407 заменен на остаток валина (Y407V).

13. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.12, в которой во второй субъединице Fc-домена дополнительно остаток треонина в положении 366 заменен на остаток серина (T366S) и остаток лейцина в положении 368 заменен на остаток аланина (L368A) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

14. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-13, в которой в первой субъединице Fc-домена дополнительно остаток серина в положении 354 заменен на остаток цистеина (S354C) или остаток глутаминовой кислоты в положении 356 заменен на остаток цистеина (E356C), а во второй субъединице Fc-домена остаток тирозина в положении 349 дополнительно заменен на остаток цистеина (Y349C) (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

15. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-14, в которой первая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены S354C и T366W, а вторая субъединица Fc-домена содержит аминокислотные замены Y349C, T366S, L368A и Y407V (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

16. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-15, в которой Fc-домен содержит одну или несколько аминокислотную(ых) замену(н), которая(ые) снижает(ют) связывание с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию.

17. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по п.16, в которой указанная(ые) одна или несколько аминокислотная(ые) замена(ы) находится(ятся) в одном или нескольких положениях(ях), выбранном(ых) из группы L234, L235 и P329 (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

18. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где молекула включает по меньшей мере одну тяжелую цепь, которая приблизительно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, по меньшей мере одну тяжелую цепь, которая приблизительно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, по меньшей мере одну легкую цепь, которая приблизительно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, и по меньшей мере одну легкую цепь, которая приблизительно на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21.

19. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-18, в которой каждая субъединица Fc-домена содержит три аминокислотные замены, которые снижают связывание с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, где указанные аминокислотные замены представляют собой L234A, L235A и P329G (нумерация согласно EU-индексу Кэбота).

20. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.1-19, где Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор.

21. Активирующая Т-клетки биспецифическая антигенсвязывающая молекула по одному из пп.16-20, где эффекторная функция представляет собой антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC).

22. Полинуклеотид, кодирующий активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из пп.1-21.

23. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.22.

24. Клетка-хозяин, предназначенная для получения активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы любому из пп.1-21, содержащая полинуклеотид по п.22 или вектор по п.23.

25. Способ получения активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-21, которая обладает способностью специфически связываться с CD3 и антигеном клетки-мишени, включающий осуществление стадий, на которых а) культивируют клетку-хозяина по п.24 в условиях, пригодных для экспрессии активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы, и б) выделяют активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу.

26. Фармацевтическая композиция для опосредуемой Т-клетками иммунотерапии, содержащая активирующую Т-клетки биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по одному из пп.1-21 и фармацевтически приемлемый носитель.

27. Применение активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из пп.1-21 в качестве лекарственного средства для опосредуемой Т-клетками иммунотерапии.

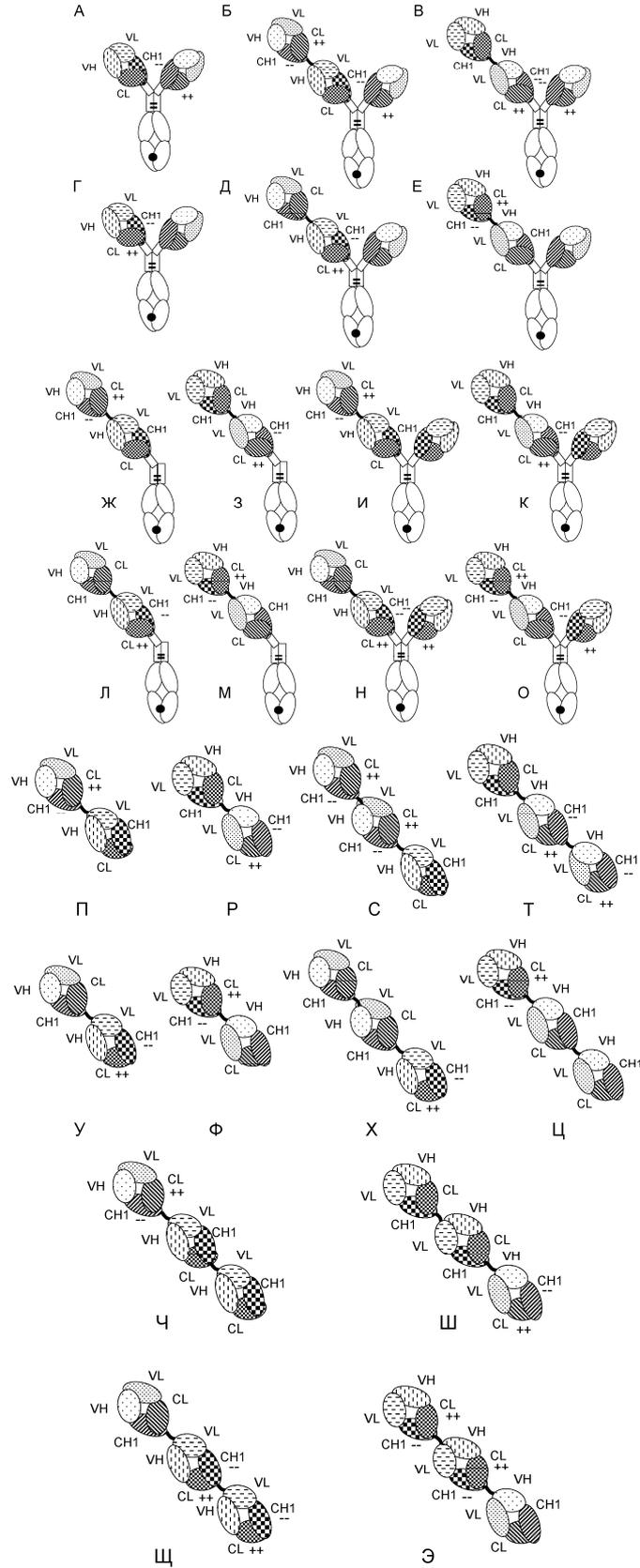
28. Применение фармацевтической композиции по п.26, в качестве лекарственного средства для опосредуемой Т-клетками иммунотерапии.

29. Применение активирующей Т-клетки биспецифической антигенсвязывающей молекулы по одному из пп.1-21 для опосредуемой Т-клетками иммунотерапии.

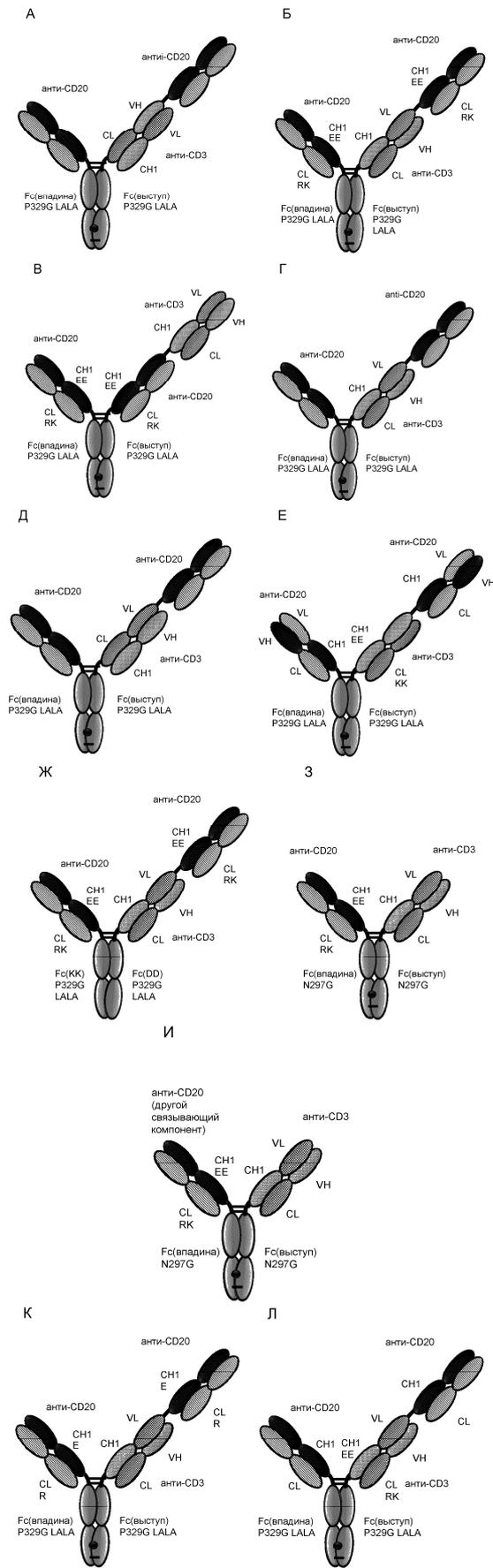
30. Применение по п.29, при котором лечится рак.

31. Применение фармацевтической композиции по п.26 для опосредуемой Т-клетками иммунотерапии.

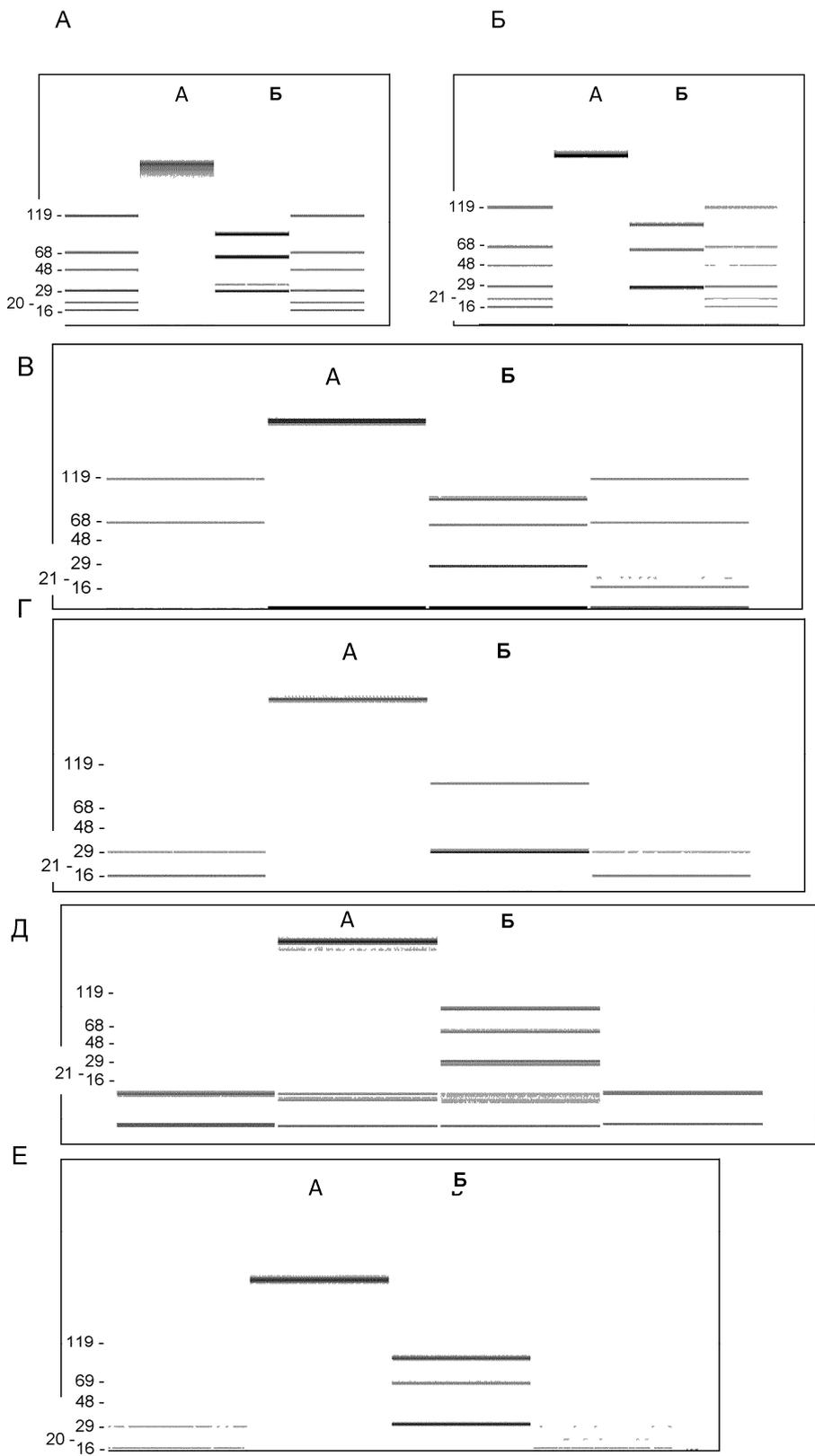
32. Применение по п.31, при котором лечится рак.



Фиг. 1

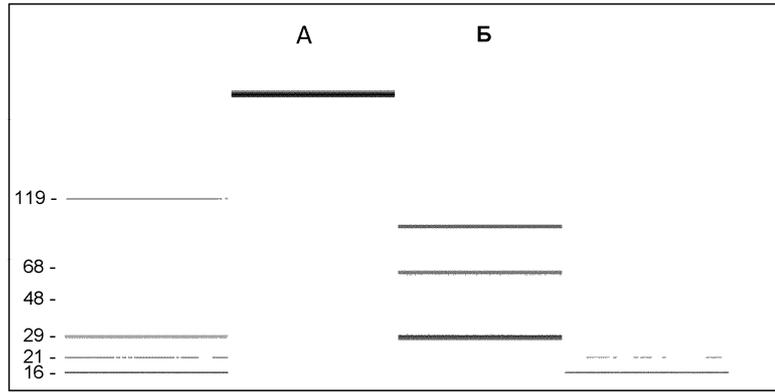


Фиг. 2

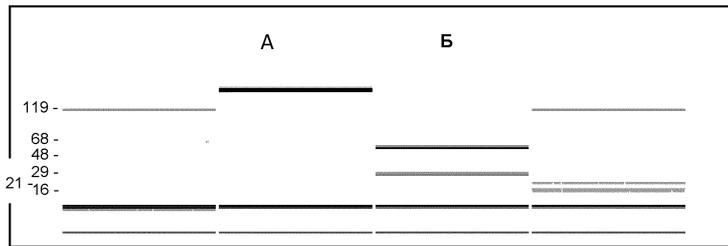


Фиг. 3

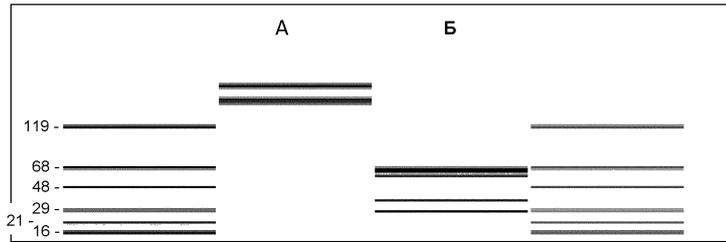
Ж



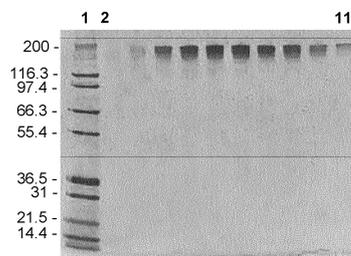
З



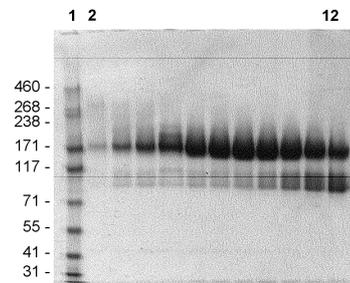
И



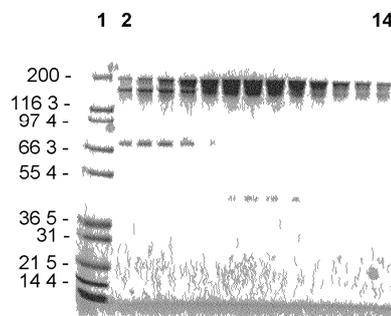
К



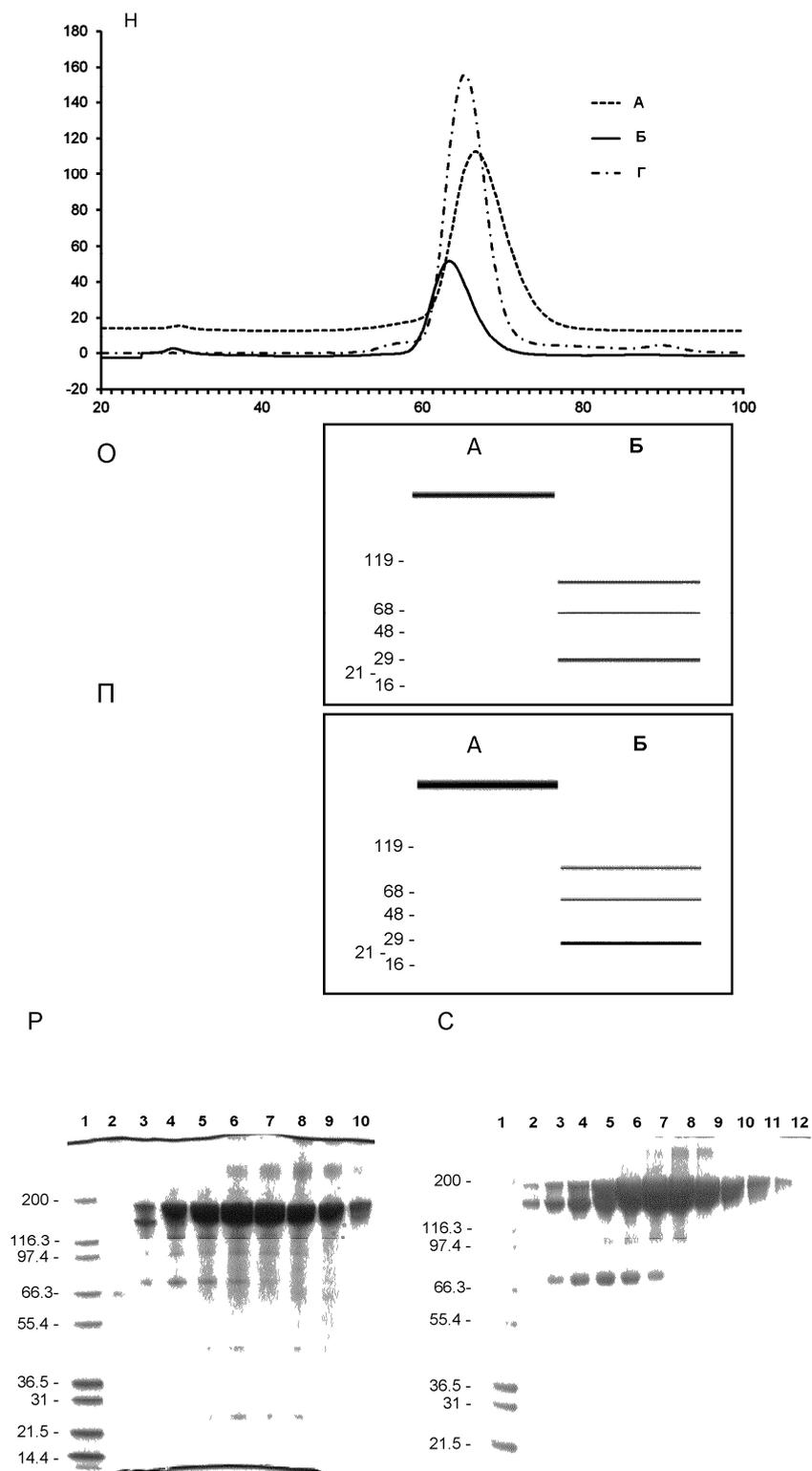
Л



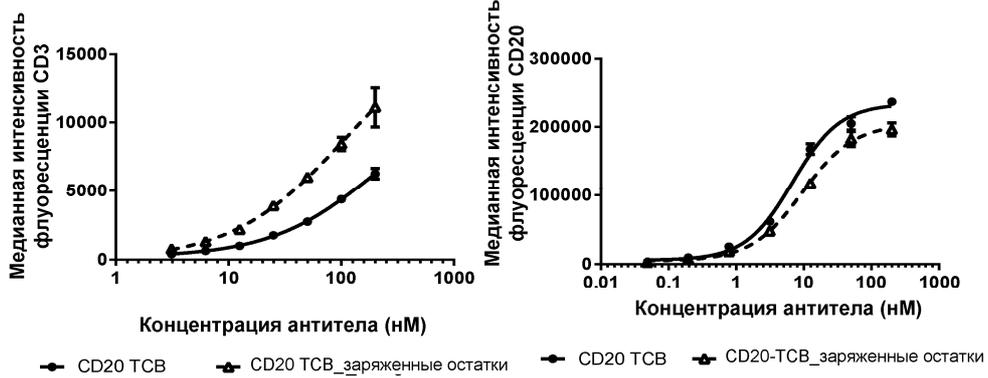
М



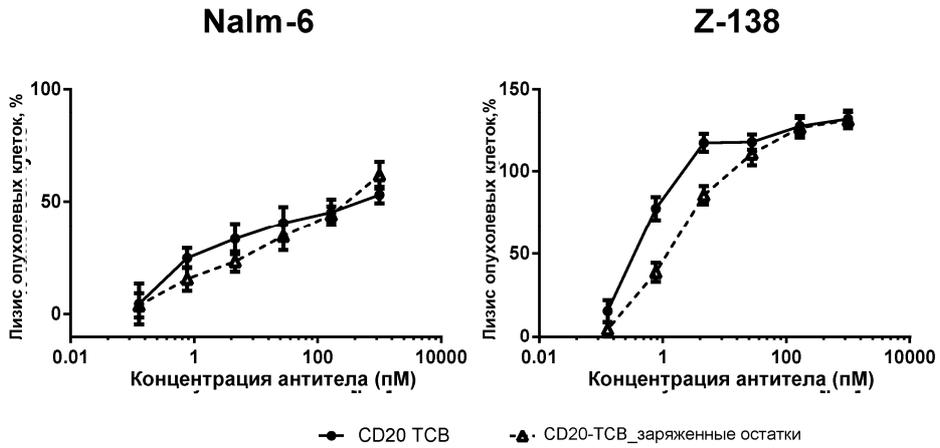
Фиг. 3



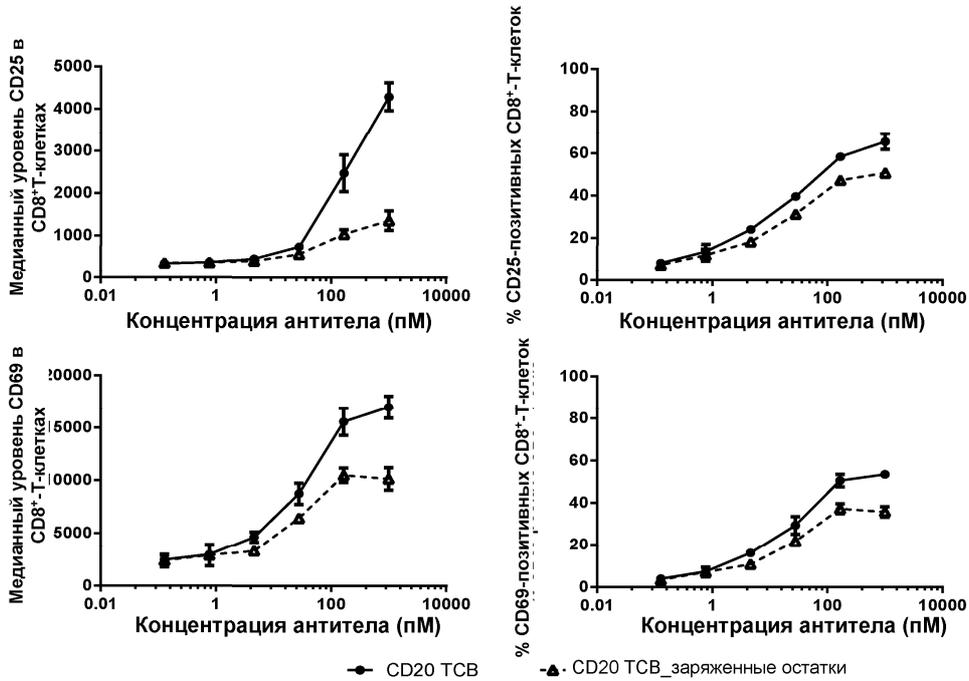
Фиг. 3



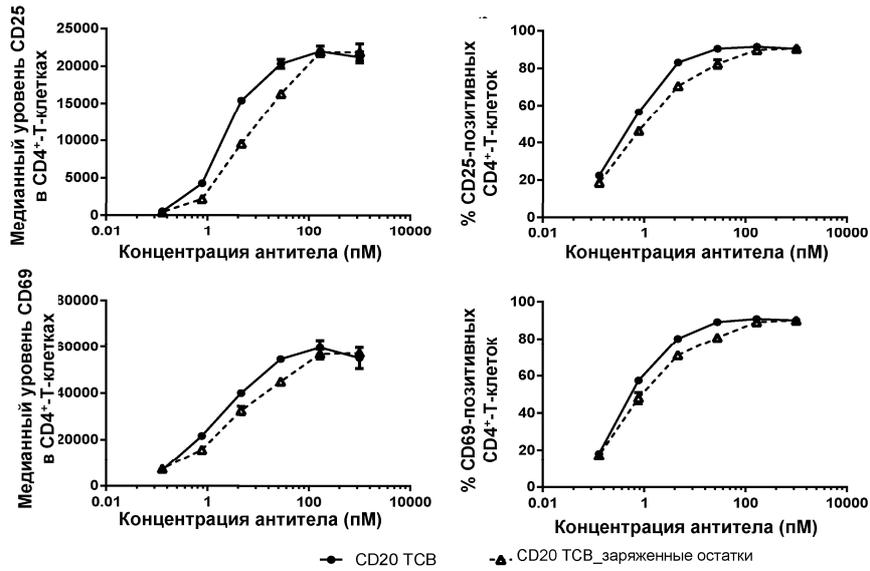
Фиг. 4



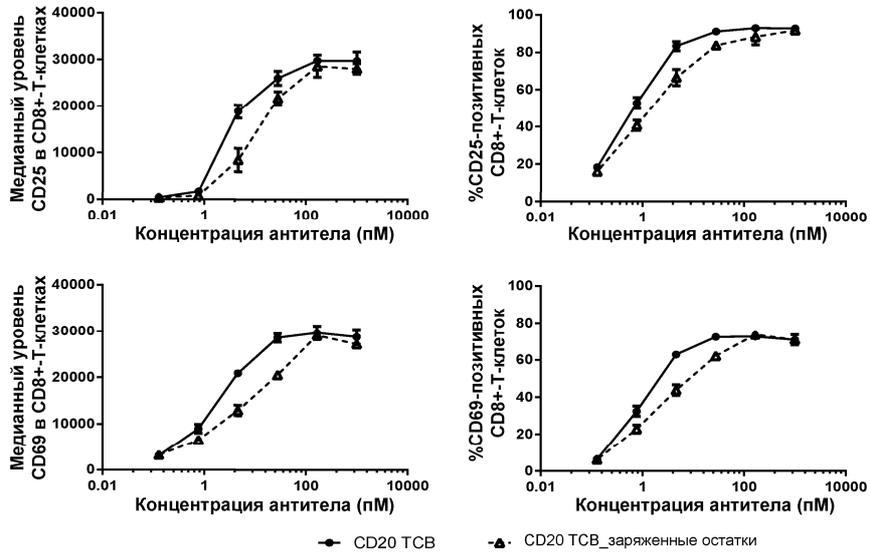
Фиг. 5



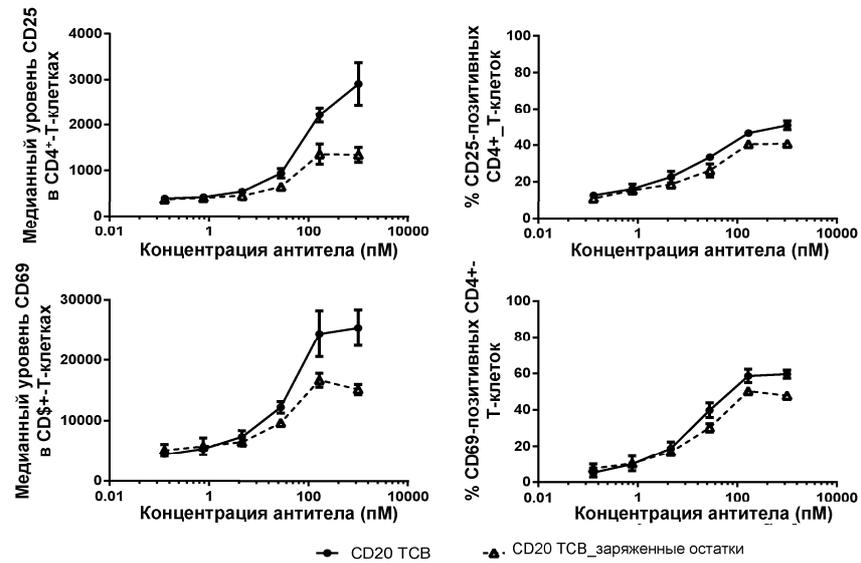
Фиг. 6А



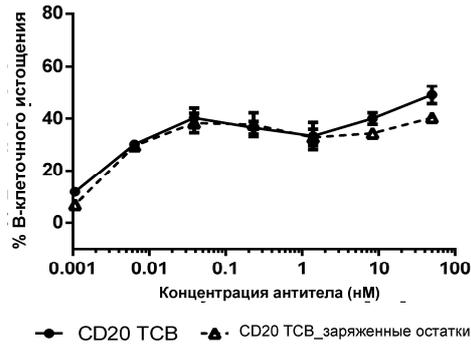
Фиг. 6Б



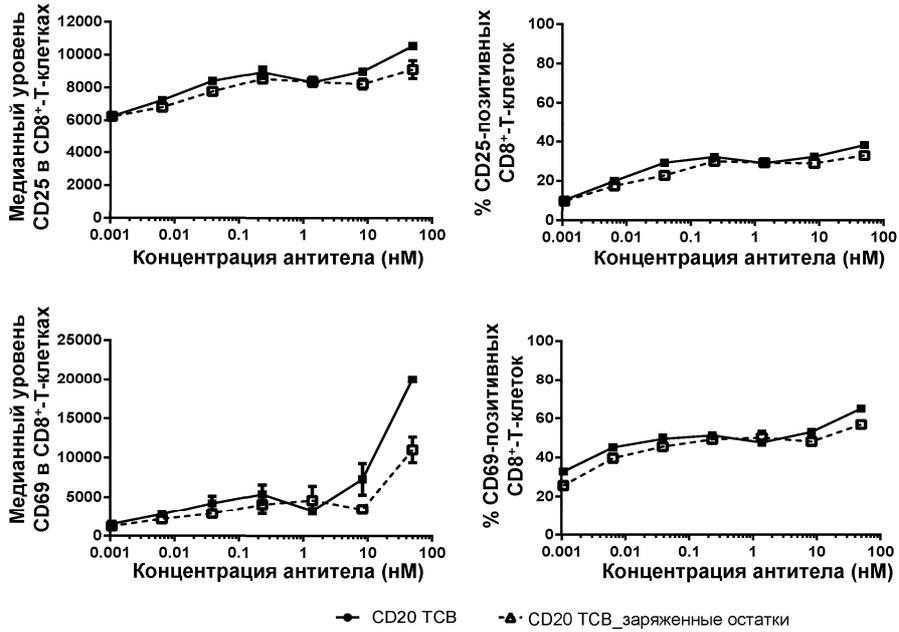
Фиг. 7А



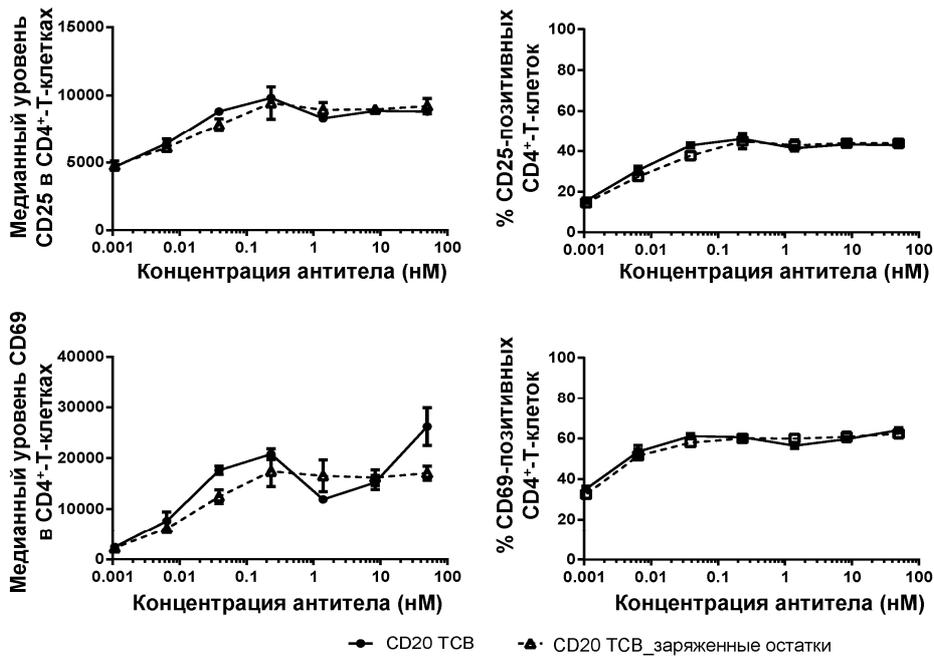
Фиг. 7Б



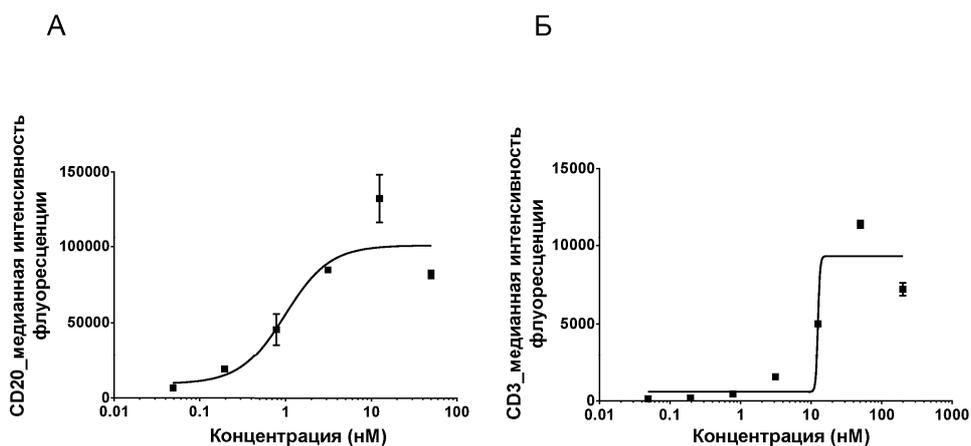
Фиг. 8



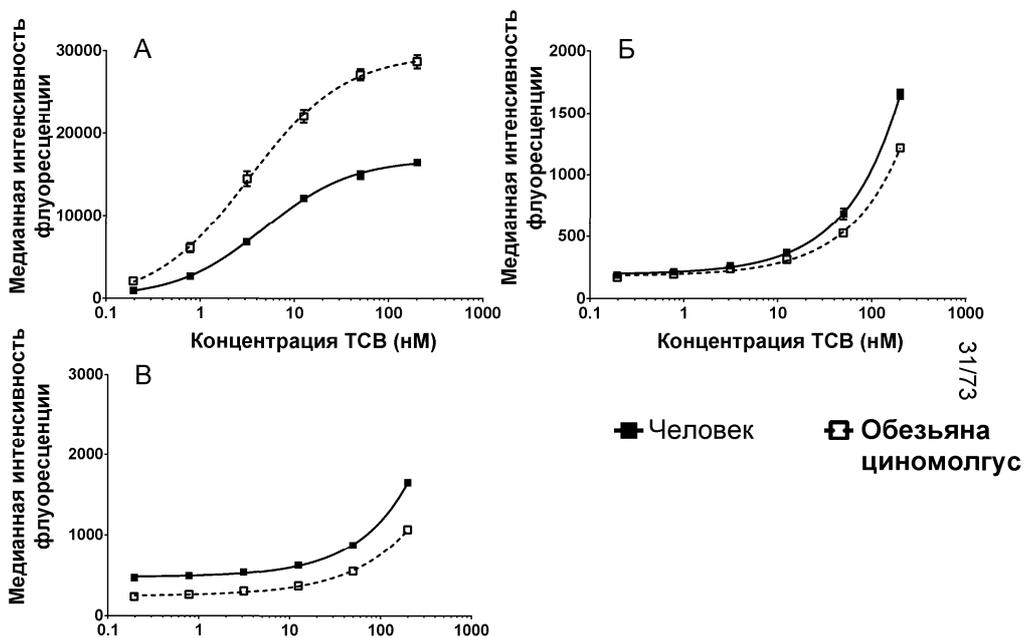
Фиг. 9А



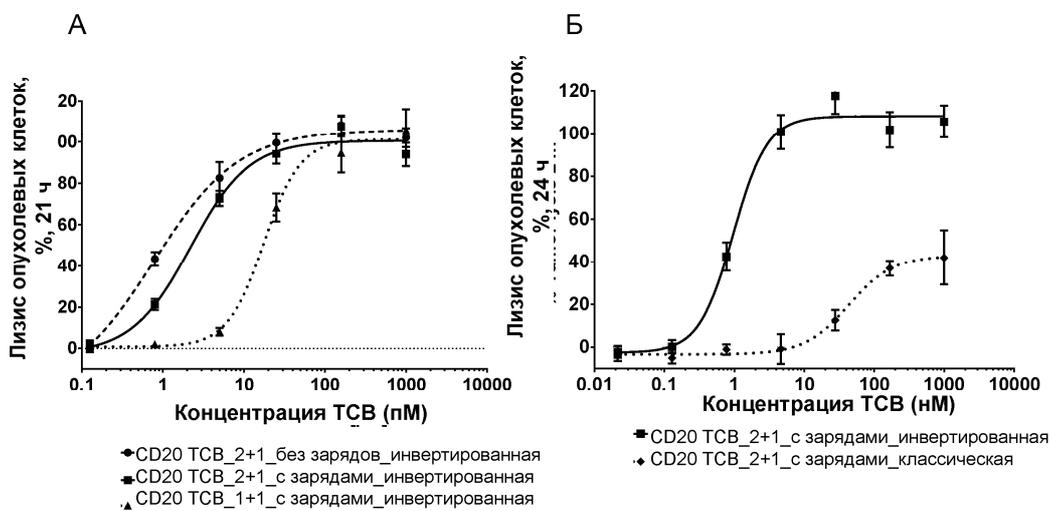
Фиг. 9Б



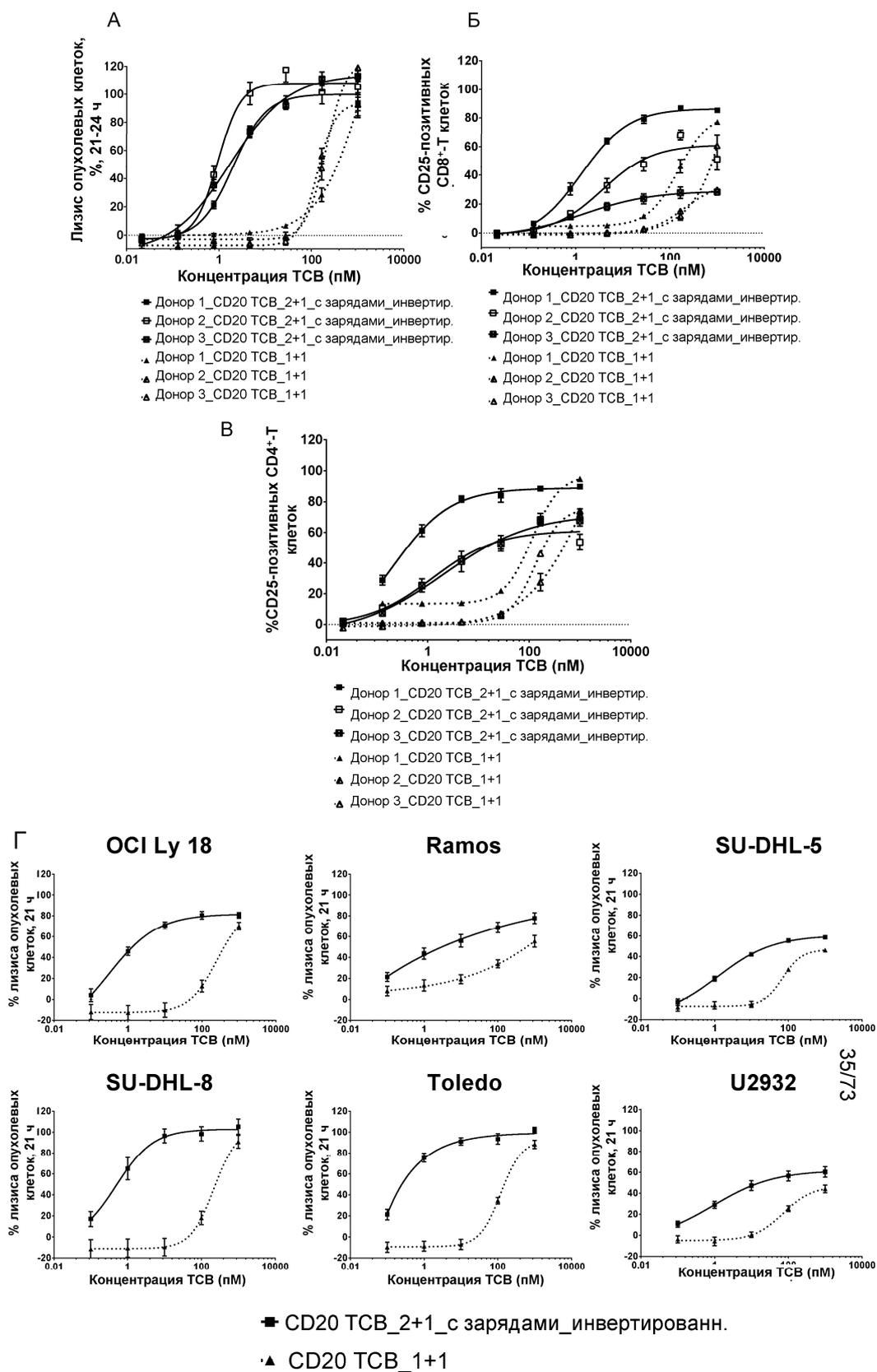
Фиг. 10



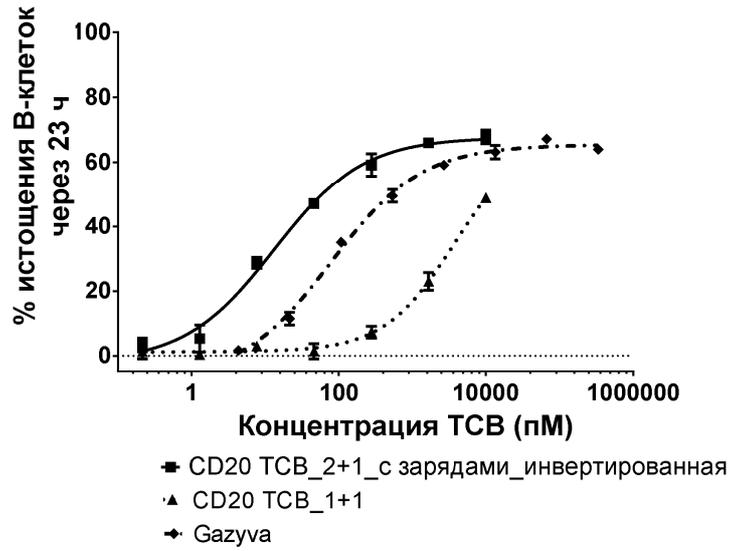
Фиг. 11



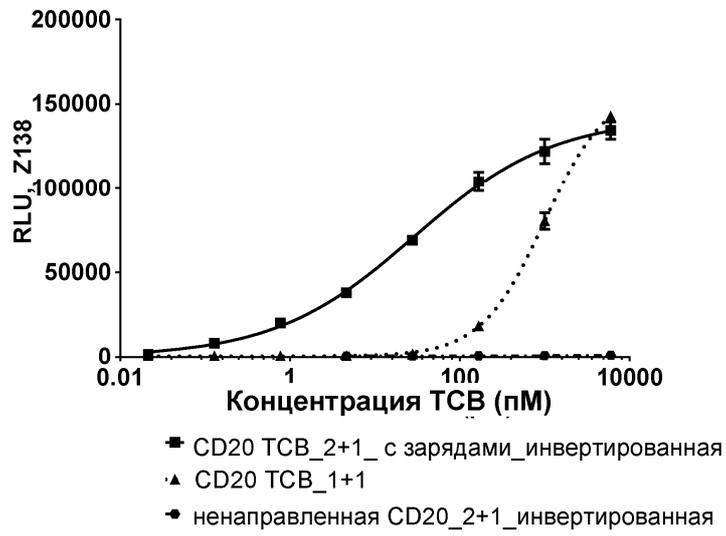
Фиг. 12



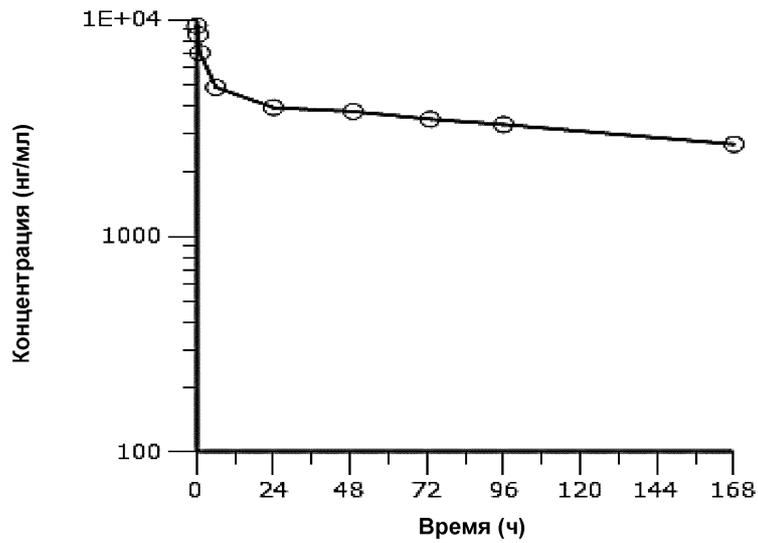
Фиг. 13



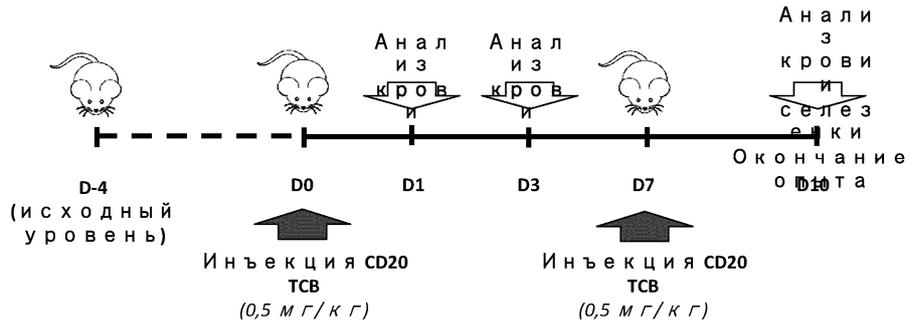
Фиг. 14



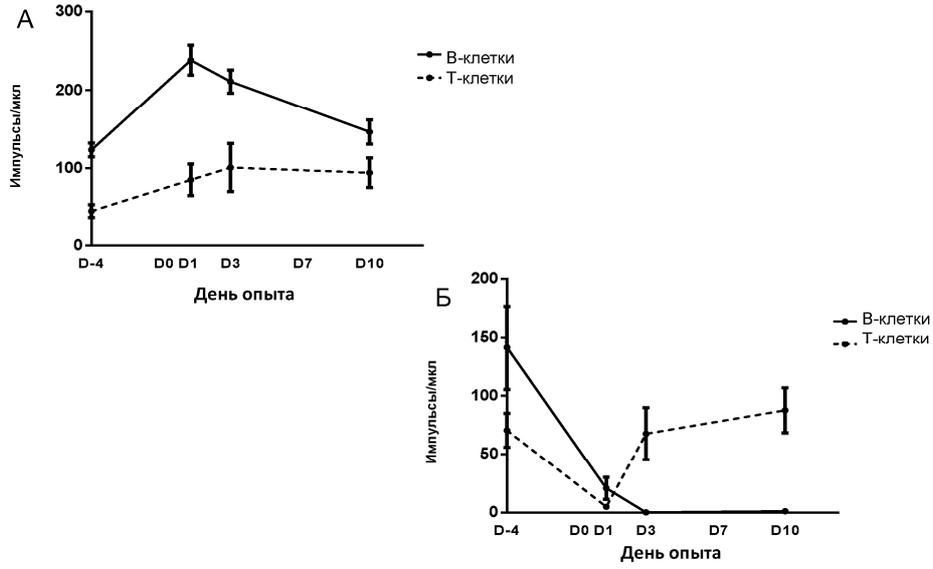
Фиг. 15



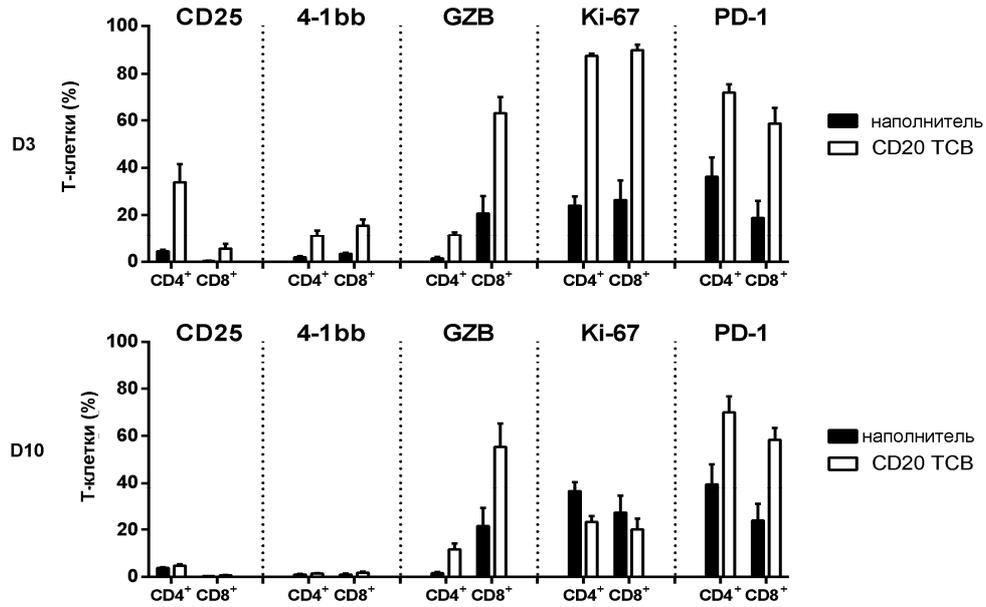
Фиг. 16



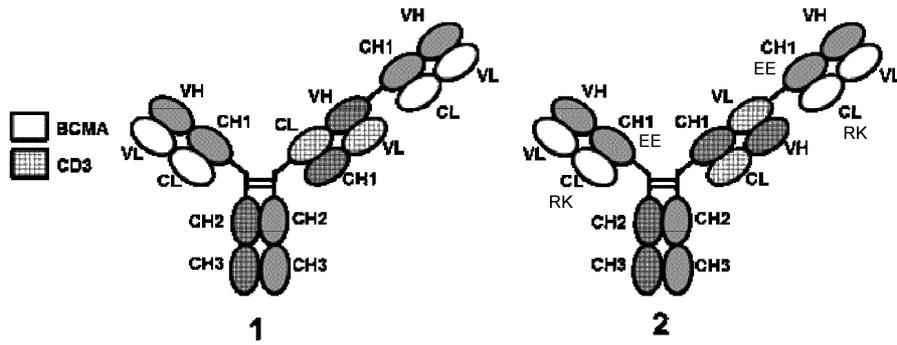
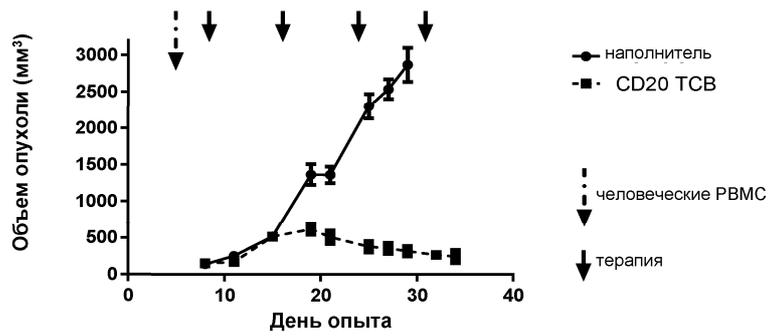
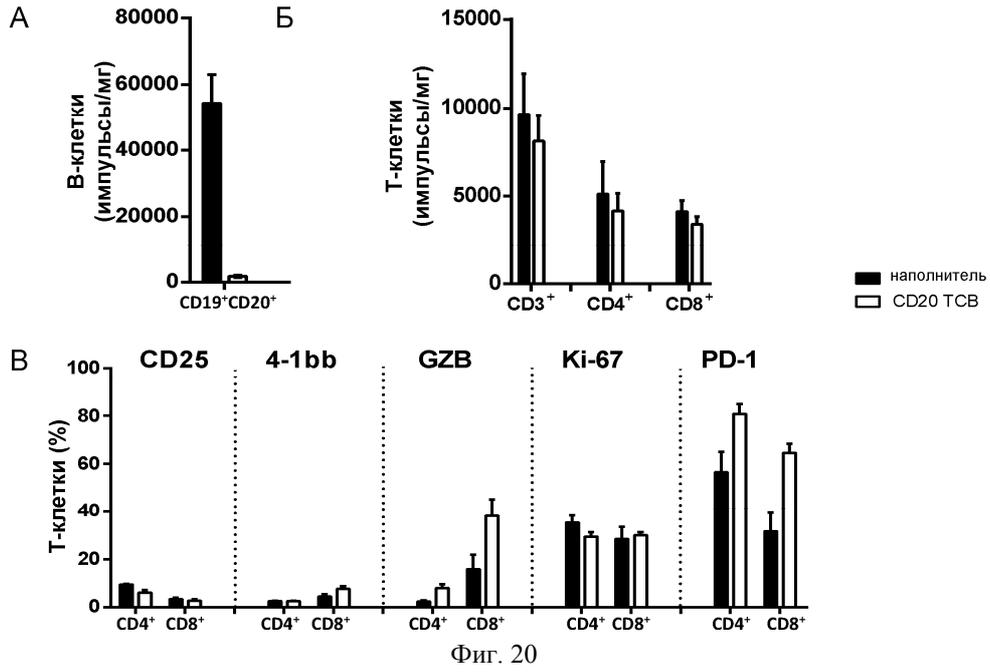
Фиг. 17



Фиг. 18

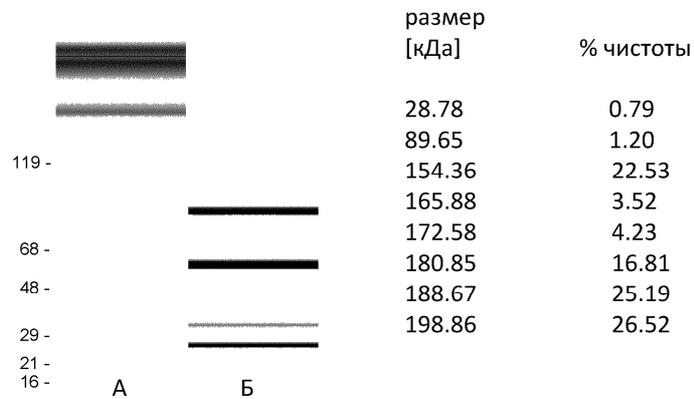


Фиг. 19

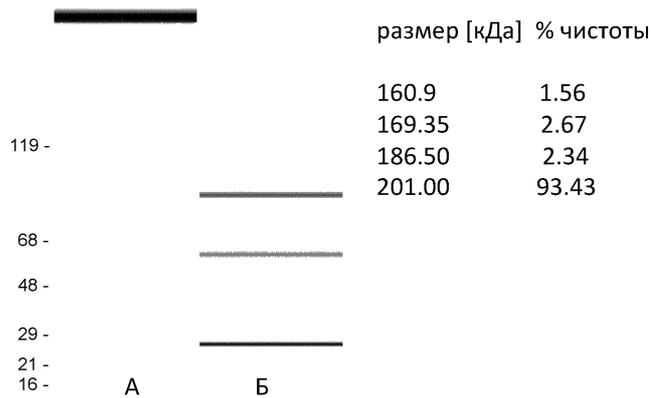


**A.** 83A10-TCB

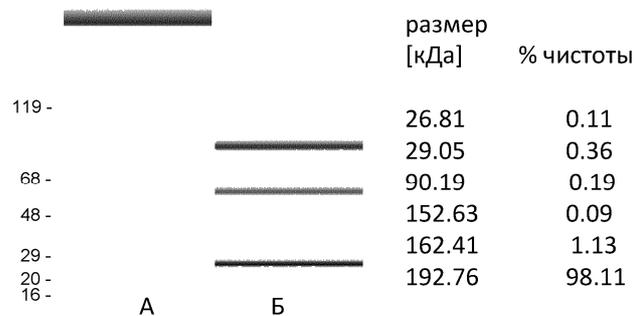
методы очистки: PA+SEC  
 чистота: <30%  
 выход: 6,7 мг/л  
 количество: 2,7 мг  
 мономер: 82,8%

**Б** 83A10-TCB

Методы очистки: PA+SEC+сIEX+re-SEC  
 чистота: 93,4%  
 выход: 0,42 мг/л  
 количество: 0,168 мг  
 мономер: 82,8%

**В** 83A10-TCBcy

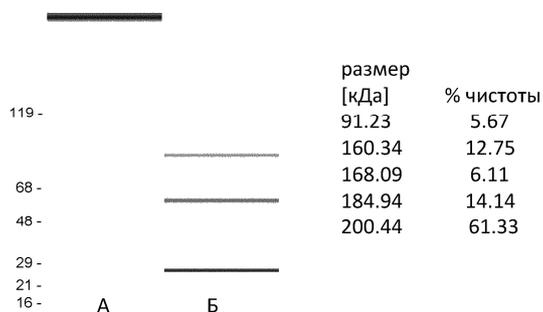
методы очистки: PA+SEC  
 чистота: 95,3%  
 выход: 3,3 мг/л  
 количество: 1,3 мг  
 мономер: 100%



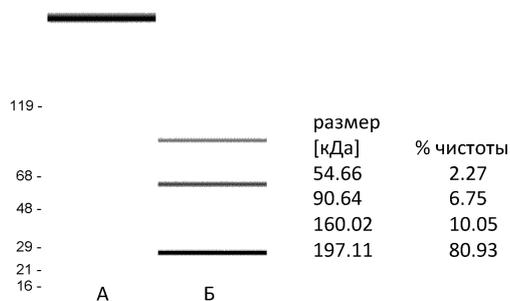
Фиг. 23

**А. 83A10-TCB**

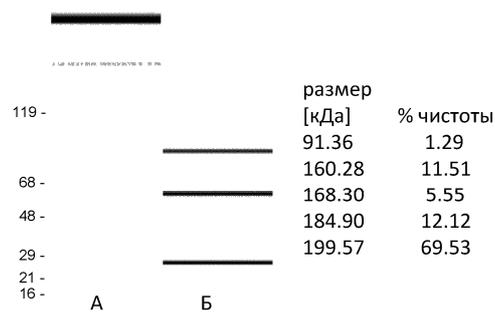
методы очистки: РА  
 чистота: 61,3%  
 выход: 26,2 мг/л  
 количество: 24,3 мг  
 мономер: 63,7%  
 ЖХ-МС: n.d.

**Б 83A10-TCBcy**

методы очистки: РА  
 чистота: 81,0%  
 выход: 51,5 мг/л  
 количество: 50,2 мг  
 мономер: 68,2%  
 ЖХ-МС: n.d.

**В 83A10-TCB**

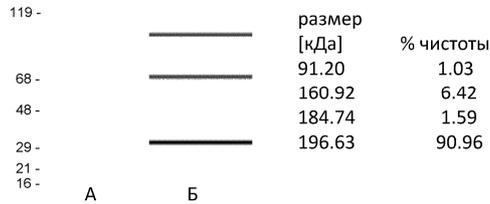
методы очистки: РА+SEC  
 чистота: 69,5%  
 выход: 14,1 мг/л  
 количество: 13,1 мг  
 мономер: 74,7%  
 ЖХ-МС: 40-60%  
 «правильных» молекул



Фиг. 24

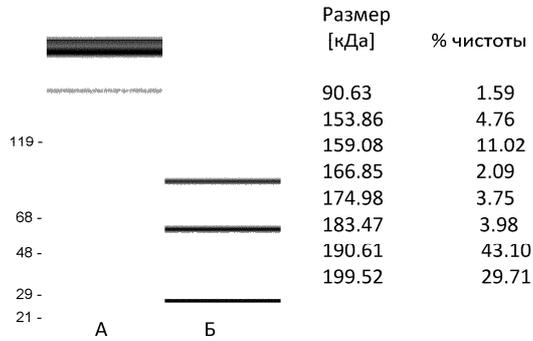
**Г 83A10-TCBcy**

методы очистки: PA+SEC  
 чистота: 91,0%  
 выход: 10,3 мг/л  
 количество: 10,0 мг  
 мономер: 83,9%  
 ЖХ-МС: 90%  
 «правильных»  
 молекул



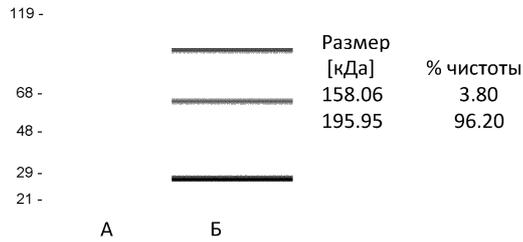
**Д 83A10-TCB**

методы очистки:  
 [(PA+SEC)+(PA)]+cIEX+SEC  
 чистота: 43,1%  
 выход: 0,43 мг/л  
 количество: 0,73 мг  
 мономер: 98,3%  
 ЖХ-МС: 60-70%  
 «правильных»  
 молекул

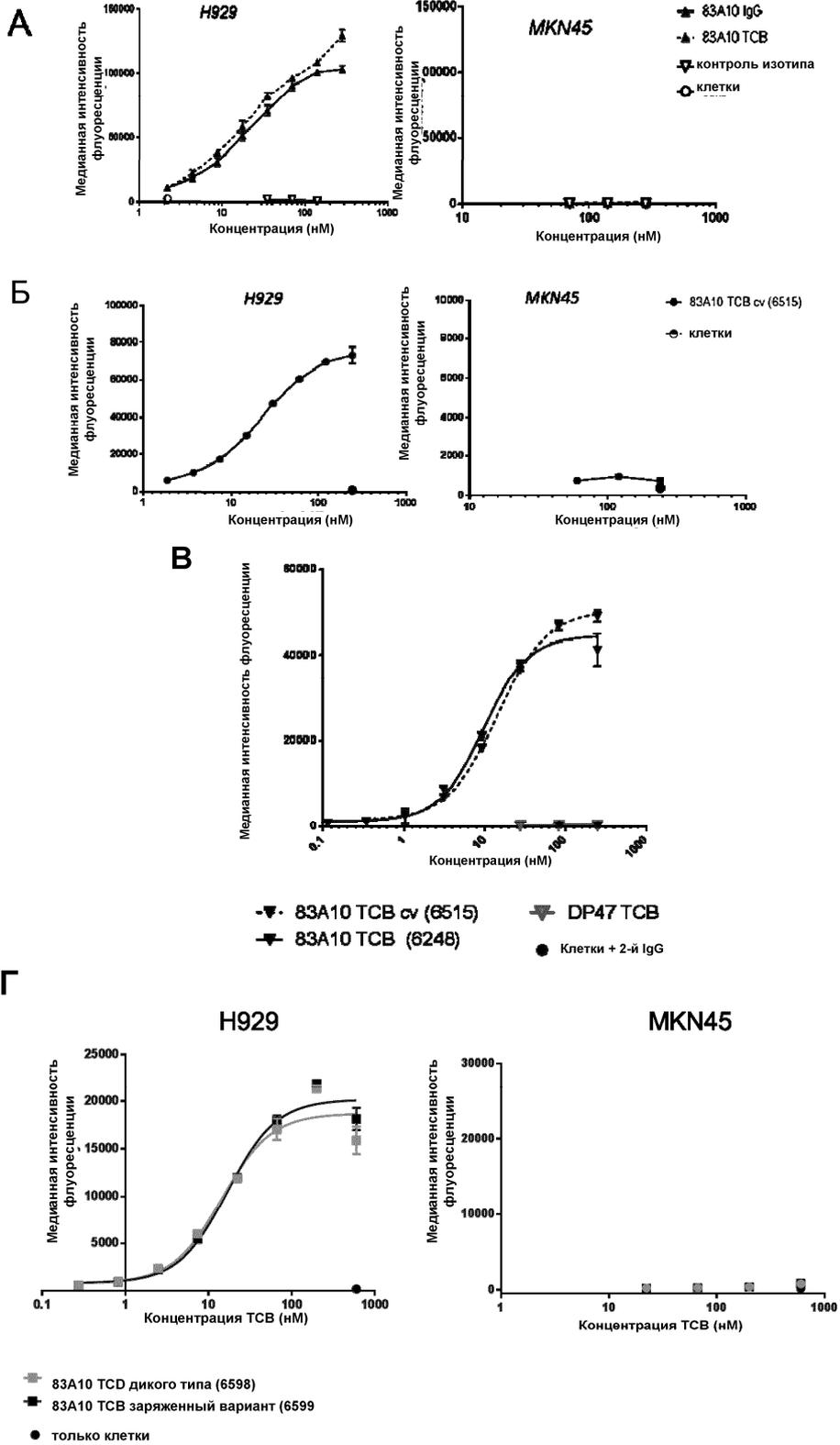


**Е 83A10-TCBcy**

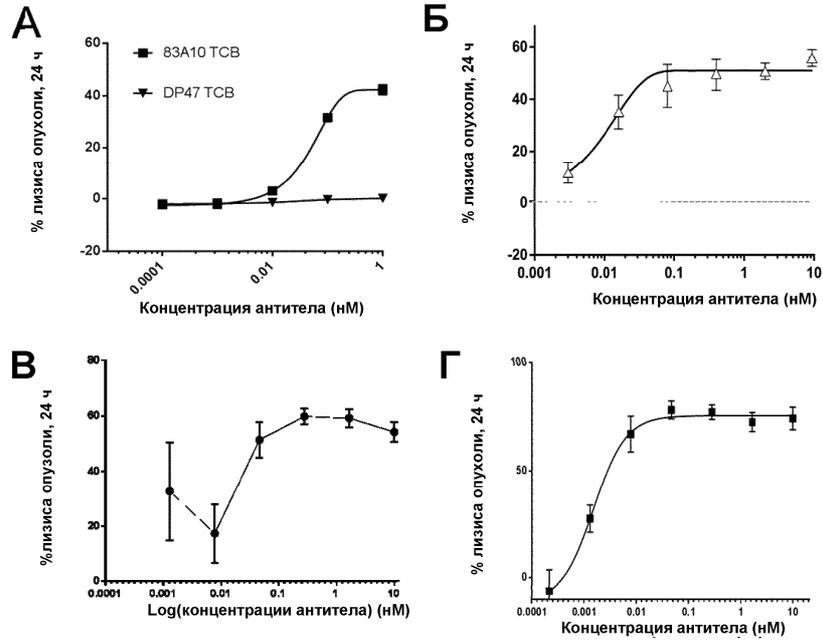
методы очистки:  
 [(PA+SEC)+(PA)]+cIEX+SEC  
 чистота: 96,2%  
 выход: 0,64 мг/л  
 количество: 1,27 мг  
 мономер: 98,9%  
 ЖХ-МС: >95%  
 «правильных» молекул



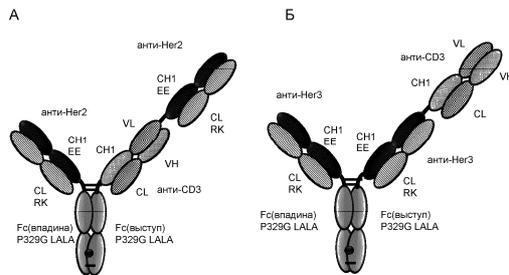
Фиг. 24



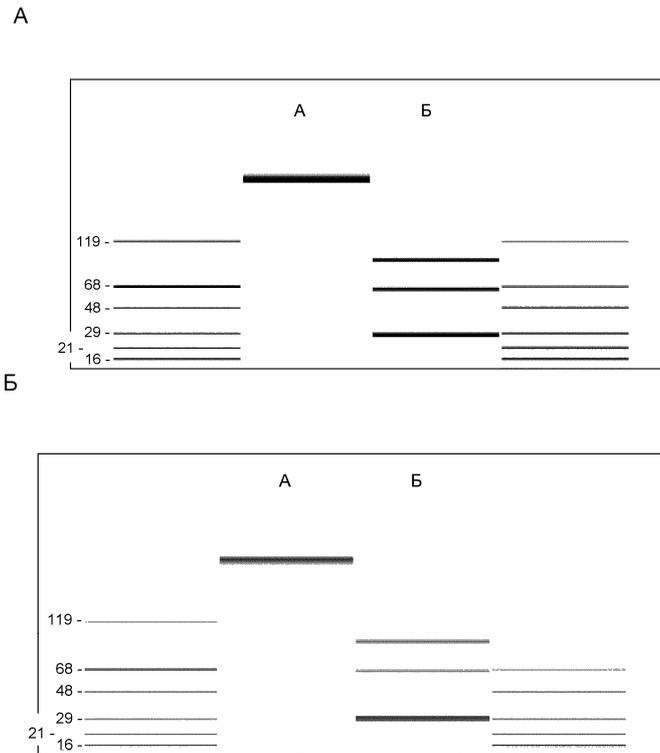
Фиг. 25



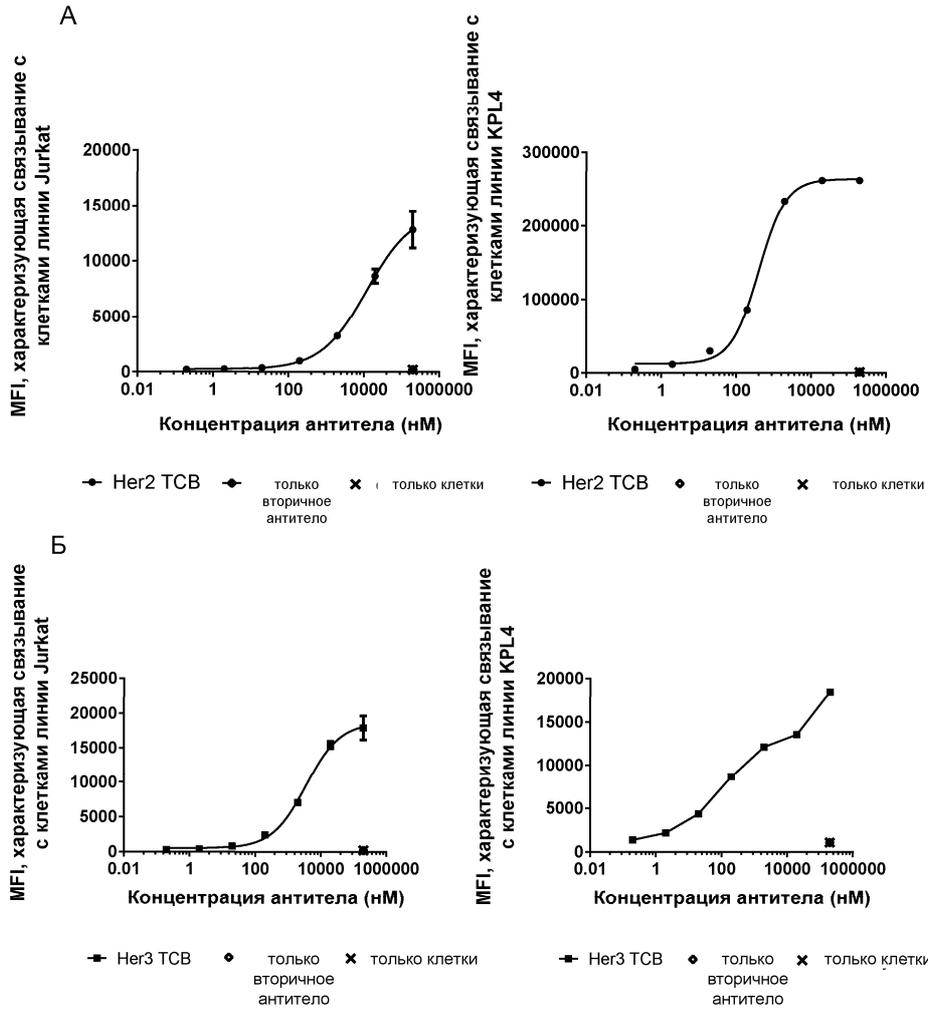
Фиг. 26



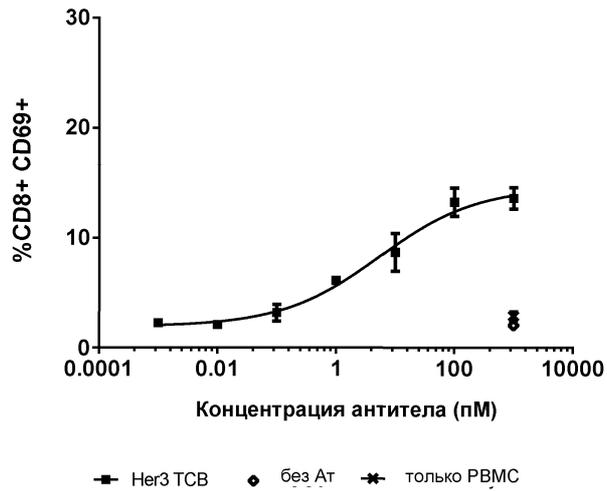
Фиг. 27



Фиг. 28

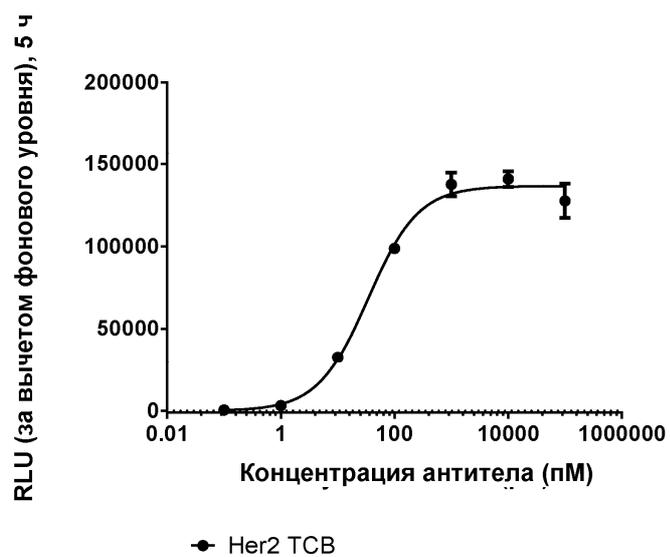


Фиг. 29

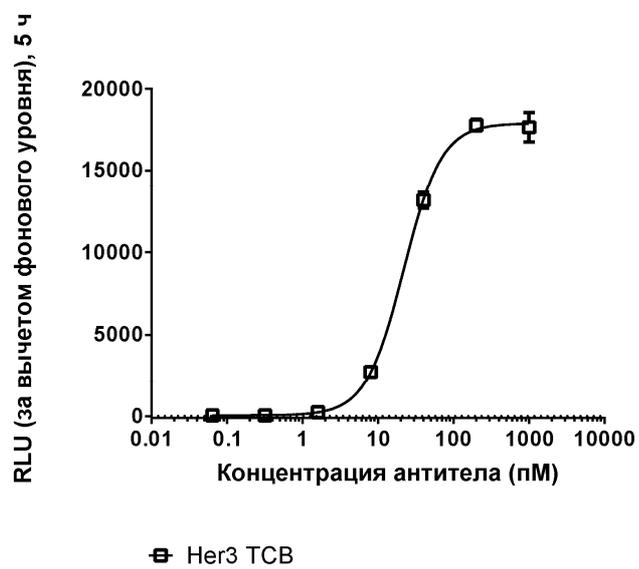


Фиг. 30

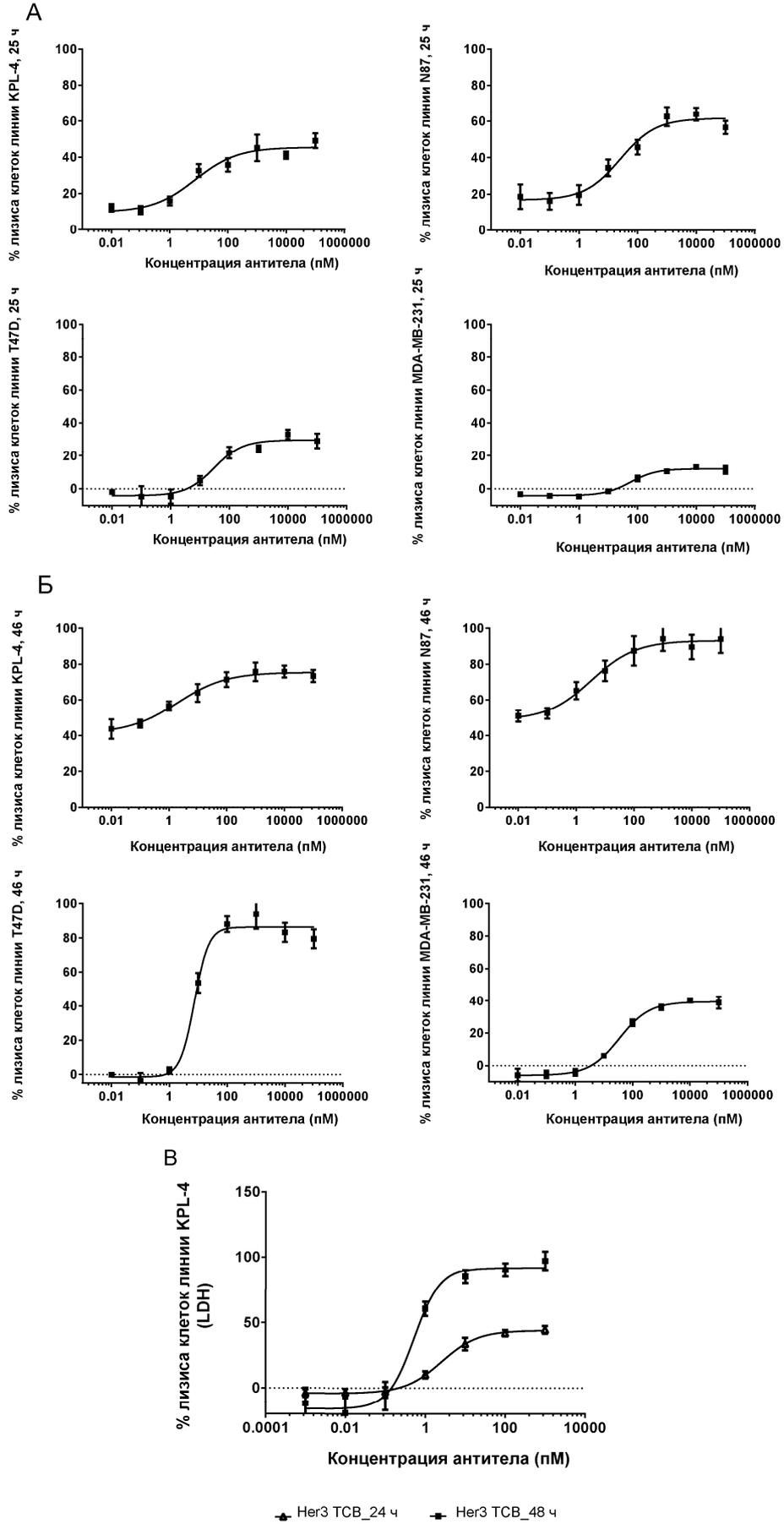
А



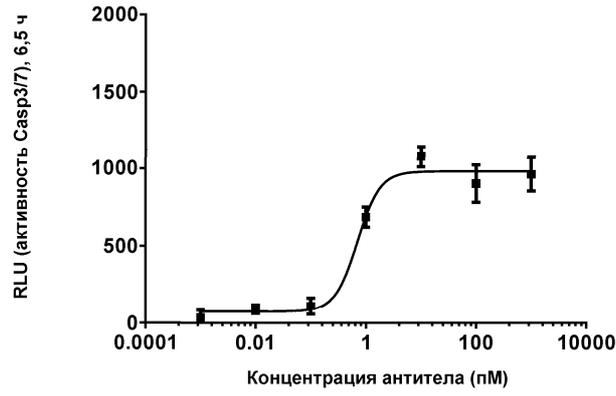
Б



Фиг. 31

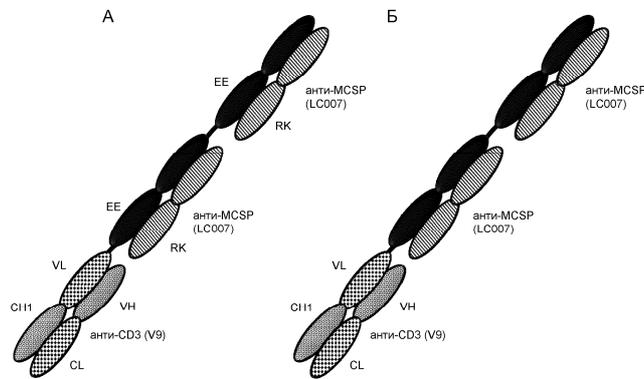


Фиг. 32

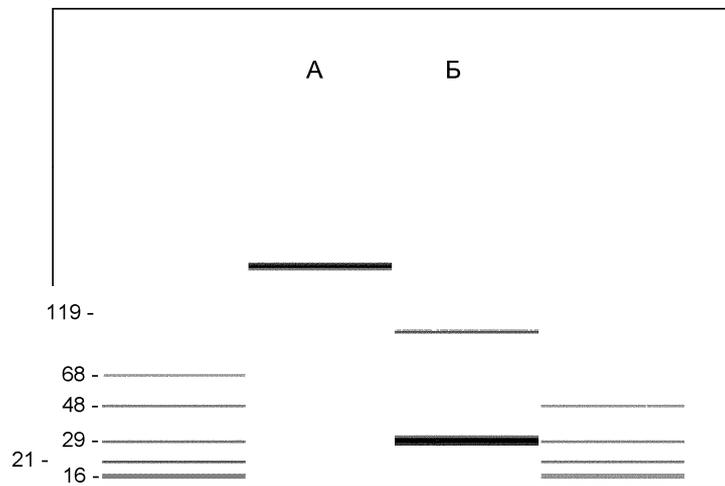


■ Her 3 TCB

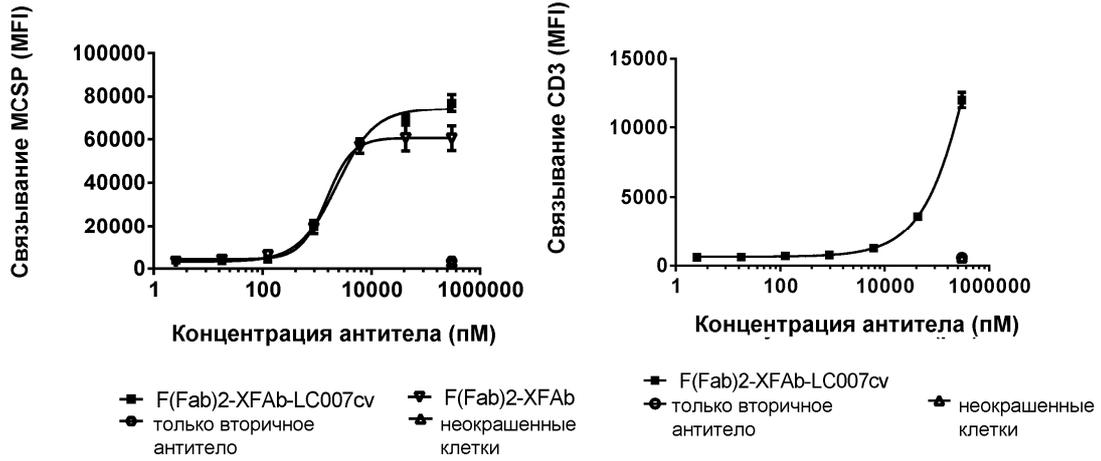
Фиг. 33



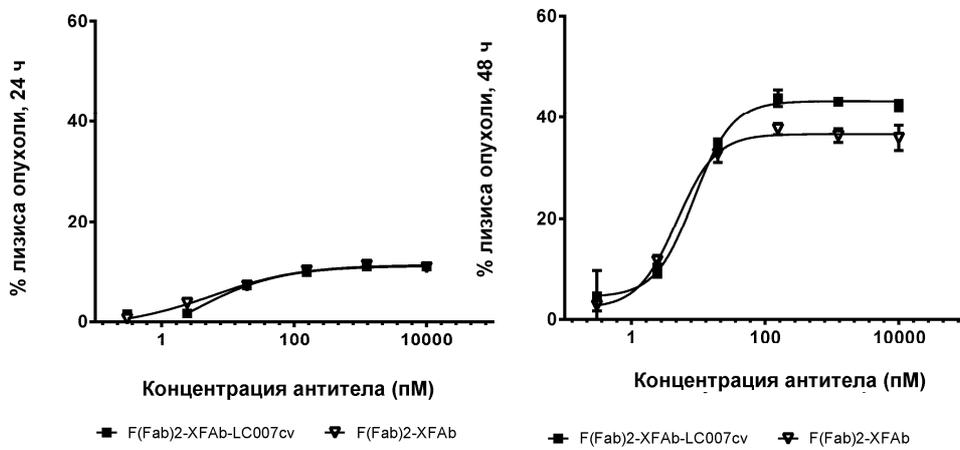
Фиг. 34



Фиг. 35



Фиг. 36



Фиг. 37

