

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039859**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.03.21**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28 (2006.01)**

(21) Номер заявки  
**201890390**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.08.01**

---

(54) **БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОНСТРУКТЫ АНТИТЕЛ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ EGFRvIII И CD3**

---

(31) **62/199,945; 62/290,861**

(56) WO-A2-2008119567  
WO-A1-2015006482  
WO-A1-2015018527  
WO-A2-2005010151  
WO-A1-2016016859

(32) **2015.07.31; 2016.02.03**

(33) **US**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/EP2016/068332**

(87) **WO 2017/021370 2017.02.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЭМДЖЕН РИСЕРЧ (МЮНИК) ГМБХ  
(DE)**

(72) Изобретатель:  
**Раум Тобиас, Куфер Петер, Рау Дорис,  
Мюнц Маркус, Херрманн Инес,  
Хоффманн Патрик, Брози Йоханнес,  
Фридрих Маттиас, Раттель Бенно,  
Богнер Памела, Вольф Андреас,  
Помпе Корнелиус (DE)**

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

---

(57) Настоящее изобретение относится к биспецифическому конструкту антитела, содержащему первый связывающий домен, связывающийся с EGFRvIII человека на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, связывающийся с CD3 человека на поверхности Т-клетки. Кроме того, в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, кодирующий конструкт антитела, вектор, содержащий указанный полинуклеотид, и клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная указанным полинуклеотидом или вектором. Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ получения конструкта антитела согласно настоящему изобретению, медицинское применение указанного конструкта антитела и набор, содержащий указанный конструкт антитела.

**039859**  
**B1**

**039859**  
**B1**

Изобретение относится к биспецифическому конструктору антитела, содержащему первый антиген-связывающий домен, который связывается с EGFRvIII человека на поверхности клетки-мишени, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки. Кроме того, в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, кодирующий конструктор антитела, вектор, содержащий указанный полинуклеотид, и клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная указанным полинуклеотидом или вектором. Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ получения конструктора антитела согласно настоящему изобретению, медицинское применение указанного конструктора антитела и набор, содержащий указанный конструктор антитела.

EGFRvIII - один из нескольких вариантов EGFR, полученный в результате реаранжировки генов, сопровождающейся амплификацией гена EGFR. EGFRvIII содержит делецию длиной 267 аминокислот в рамке считывания внеклеточного домена EGFR. EGFRvIII - наиболее часто встречающийся вариант рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) в злокачественных опухолях человека. В процессе амплификации гена происходит делеция 267 аминокислот во внеклеточном домене, что приводит к появлению нового соединения, которое можно использовать в качестве нового опухоль-специфического эпитопа для моноклональных антител. Этот вариант рецептора ЭФР вносит вклад в прогрессирование опухоли за счет конститутивного сигнального пути, не зависящего от лиганда. Экспрессия EGFRvIII в каких-либо здоровых тканях не описана. Превосходная селективность экспрессии EGFRvIII по отношению к опухолям делает EGFRvIII идеальным антигеном - мишенью для антитела BiTE. Вклад EGFRvIII в прогрессирование опухоли указывает на зависимость раковых клеток от экспрессии EGFRvIII и, соответственно, дополнительно подтверждает его пригодность в качестве мишени.

Показано, что EGFRvIII часто экспрессируется в двух видах злокачественных опухолей центральной нервной системы, а именно, глиобластоме и анапластической астроцитоме. Для обоих указанных заболеваний существует значительная неудовлетворенная потребность в лекарственных средствах. Примером этого является плохая общая выживаемость при стандартном лечении - 13,6% в течение 2 лет для глиобластомы и 25, 9% в течение 5 лет для анапластической астроцитомы. В настоящее время стандартное лечение глиобластомы включает хирургическую резекцию опухоли, которая чаще всего затруднена диффузным характером роста опухоли, а также необходимостью сохранения функционально важных областей головного мозга. После хирургического вмешательства выполняют вспомогательную лучевую терапию и химиотерапию. При стандартном лечении мультиформной глиобластомы и анапластической астроцитомы нормальным явлением является рецидив заболевания, в конечном счете приводящий к смертельному исходу, по существу, у всех пациентов.

Экспрессия EGFRvIII в мультиформной глиобластоме и анапластической астроцитоме конститутивно активирует сигнальный путь киназы PI3 и ассоциирована с ухудшением прогноза при мультиформной глиобластоме и анапластической астроцитоме. Кроме того, описано, что EGFRvIII совместно экспрессируется с CD133 и определяет популяцию раковых стволовых клеток при глиобластоме (Emlet et al., *Cancer Res*, 2014, 74(4): 1238-49). Кроме того, продемонстрировано, что за счет механизма межклеточного переноса антигена EGFRvIII может переноситься на поверхность антиген-отрицательных опухолевых клеток. За счет этого механизма можно преодолеть гетерогенность экспрессии EGFRvIII, продемонстрированную для некоторых случаев глиобластомы и снижающую эффективность лечения, особенно в случае использования EGFRvIII-специфичного конструктора BiTE-антитела, обеспечивающего высокую эффективность цитотоксического действия, компенсирующую потенциально низкий уровень антигена-мишени, достигаемый за счет межклеточного переноса антигена.

Экспрессия EGFRvIII также описана в ряде других видов опухолей (Wikstrand, CJ. et al., *Cancer Research* 55(14) : 3140-3148 (1995); Ge H. et al., *Int J Cancer*. 98(3): 357-61 (2002); Moscatello, G. et al., *Cancer Res*. 55(23): 5536-9 (1995); Garcia de Palazzo, IE. et al., *Cancer Res*. 53(14): 3217-20 (1993); Olapade-Olaopa, EO. et al. , *Br J Cancer*. 82(1): 186-94 (2000)). Поэтому, учитывая высокую опухолевую селективность EGFRvIII, лечение с применением конструкторов BiTE-антител, специфичных по отношению к EGFRvIII, также может быть полезным при других избранных видах или подвидах рака. При выборе видов или подвидов рака или пациентов для лечения можно руководствоваться различными способами анализа экспрессии EGFRvIII в опухоли.

Ввиду наличия потребности в доступных дополнительных вариантах лечения солидных опухолевых заболеваний, связанных со сверхэкспрессией EGFRvIII, например, глиобластомы, астроцитомы, медуллобластомы, карцином молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, карцином яичника, карцином предстательной железы, центральной нервной системы, в настоящем изобретении предложены средства и способы решения этой проблемы в виде биспецифического конструктора антитела, содержащего связывающий домен, специфичный по отношению к EGFRvIII на поверхности опухолевых клеток-мишеней, и второй связывающий домен, специфичный по отношению к CD3 на поверхности Т-клеток.

Таким образом, в первом аспекте настоящего изобретения предложен биспецифический конструктор антитела, содержащий первый связывающий домен, связывающийся с EGFRvIII человека и макака на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, связывающийся с CD3 человека на поверхности Т-клетки, причем первый связывающий домен содержит полипептид, показанный в SEQ ID NO:157, и полипептид согласно SEQ ID NO:158.

Необходимо отметить, что в настоящем документе формы единственного числа включают указание на множественное число, если контекст явно не диктует иного. Так, например, указание на "реагент" включает один или более различных реагентов, а указание на "способ" включает указание на эквивалентные стадии и способы, известные обычным специалистам в данной области техники, которые могут быть модифицированы или заменены способами, описанными в настоящем документе.

Если не указано иное, выражение "по меньшей мере", предшествующее ряду элементов, необходимо понимать как относящееся к каждому элементу ряда. Специалисты в данной области техники распознают или смогут установить, с помощью не более чем шаблонных экспериментов, многие эквиваленты конкретных вариантов реализации изобретения, описанных в настоящем документе. Такие эквиваленты охватываются настоящим изобретением.

Термин "и/или" в настоящем документе включает понятия "и", "или" и всевозможные другие комбинации элементов, объединенные указанным термином".

Термин "примерно" или "приблизительно" в настоящем документе означает диапазон в пределах  $\pm 20\%$ , предпочтительно в пределах  $\pm 15\%$ , более предпочтительно - в пределах  $\pm 10\%$ , и наиболее предпочтительно - в пределах  $\pm 5\%$  от заданного значения или диапазона.

В данном описании и формуле изобретения, если контекст не требует иного, следует понимать, что слово "содержать" и его вариации, например, "содержит" и "содержащий", включает указанное целое значение или этап или группу целых значений или этапов, но не исключает любое другое целое значение или этап или группу целых значений или этапов. В настоящем документе термин "содержащий" может быть заменен термином "который содержит" или "включающий" или, иногда, используемым в настоящем документе термином "обладающий" (имеющий).

В данном контексте термин "состоящий из" исключает любой элемент, этап или ингредиент не указанный в элементе формулы изобретения. В данном контексте термин "состоящий по существу из" не исключает материалы или этапы, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики заявленного изобретения.

В каждом случае в данном описании любой из терминов "содержащий", "состоящий по существу из" и "состоящий из" может быть заменен любым из двух других терминов.

Термин "конструкт антитела" относится к молекуле, структура и/или функция которой основана(ы) на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной или целой молекулы иммуноглобулина. Соответственно, конструкт антитела способен связываться с его специфической мишенью или антигеном. Кроме того, конструкт антитела в соответствии с настоящим изобретением обладает минимальными структурными требованиями к антителу, которые позволяют ему связывать мишень. Это минимальное требование может, например, определяться присутствием по меньшей мере трех CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VL-области) и/или трех CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VH-области), предпочтительно всех шести CDR. Антитела, на которых основаны эти конструкты в соответствии с настоящим изобретением, включают, например, рекомбинантные моноклональные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные антитела и антитела человека.

Определение "конструктов антител" в соответствии с настоящим изобретением включает полноразмерные или целые антитела, также включая антитела верблюдовых и другие иммуноглобулиновые антитела, полученные биотехнологическими способами или с помощью методик белковой инженерии. Эти полноразмерные антитела могут быть, например, моноклональными, рекомбинантными, химерными, деиммунизированными, гуманизированными антителами и антителами человека. Кроме того, определение "конструкты антител" включает фрагменты полноразмерных антител, например, VH, VHH, VL, (s)dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или "r IgG" ("полуантитела"). Конструкты антител в соответствии с настоящим изобретением также могут представлять собой модифицированные фрагменты антител, называемые также вариантами антител, например, scFv, ди-scFv или би(c)-scFv, scFv-Fc, scFv-молния, scFab, Fab2, Fab3, диатела, одноцепочечные диатела, tandemные диатела (Tandab), tandemные ди-scFv, tandemные три-scFv, "мини-антитела", примером которых является следующая структура: (VH-VL-CH3)<sub>2</sub>, (scFv-CH3)<sub>2</sub>, ((scFv)<sub>2</sub>-CH3+CH3), ((scFv)<sub>2</sub>-CH3) или (scFv-CH3-scFv)<sub>2</sub>, полиантитела, например, триатела или тетраатела и однодоменные антитела, например, нанотела или отдельные переменные домены антител, содержащие лишь один переменный домен, который может представлять собой VHH, VH или VL, специфически связывающий антиген или эпитоп независимо от других V-областей или доменов.

Связывающий домен обычно может содержать переменную область легкой цепи антитела (VL) и переменную область тяжелой цепи антитела (VH); однако он не обязательно должен содержать обе указанные структуры. Fd-фрагменты, например, содержат две VH-области и часто сохраняют некоторую антиген-связывающую функцию интактного антиген-связывающего домена. Дополнительные примеры форматов фрагментов антител, вариантов антител или связывающих доменов включают (1) Fab-фрагмент - одновалентный фрагмент, содержащий VL-, VH-, CL- и CH1-домены; (2) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент - двухвалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (3) Fd-фрагмент, содержащий два VH- и CH1-домены; (4) Fv-фрагмент, содержащий VL- и VH-домены одиночного плеча антитела, (5) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546),

содержащий VH-домен; (6) выделенную область, определяющую комплементарность (CDR) и (7) одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv), причем последний вариант является предпочтительным (например, происходит из библиотеки scFv). Примеры вариантов реализации конструкторов антител в соответствии с настоящим изобретением описаны, например, в заявках WO 00/006605, WO 2005/040220, WO 2008/119567, WO 2010/037838, WO 2013/026837, WO 2013/026833, US 2014/0308285, US 2014/0302037, WO2014/144722, WO 2014/151910 и WO 2015/048272.

Кроме того, определение термина "конструкт антитела" включает одновалентные, двухвалентные и поливалентные/мультивалентные конструкторы и, соответственно, моноспецифические конструкторы, специфически связывающиеся с только одной антигенной структурой, а также биспецифические и полиспецифические/мультиспецифические конструкторы, специфически связывающиеся с более чем одной, например, двумя, тремя или более антигенными структурами посредством различных связывающих доменов. Кроме того, определение термина "конструкт антитела" включает молекулы, состоящие только из одной полипептидной цепи, а также молекулы, состоящие из более чем одной полипептидной цепи, причем эти цепи могут быть идентичными (гомодимеры, гомоолигомеры) или различающимися (гетеродимер, гетеротример или гетероолигомер). Примеры вышеуказанных определенных антител и их вариантов или производных описаны, в частности, в руководствах Harlow and Lane, *Antibodies a laboratory manual*, CSHL Press (1988) и *Using Antibodies: a laboratory manual*, CSHL Press (1999), Kontermann and Dubel, *Antibody Engineering*, Springer, 2nd ed. 2010 и Little, *Recombinant Antibodies for Immunotherapy*, Cambridge University Press 2009.

Конструкторы антител согласно настоящему изобретению предпочтительно представляют собой "конструкторы антител, полученные *in vitro*". Этот термин относится к конструктору антитела в соответствии с вышеприведенным определением, где вариабельную область полностью или частично (например, по меньшей мере один CDR) получают при отборе клеток, не являющихся клетками иммунной системы, например, с помощью фагового дисплея *in vitro*, белкового чипа или любого другого способа, при котором можно тестировать способность последовательностей-кандидатов связываться с антигеном. Этот термин, таким образом, предпочтительно исключает последовательность, полученную исключительно за счет геномной реаранжировки в клетке иммунной системы в организме животного. "Рекомбинантное антитело" представляет собой антитело, полученное посредством использования технологии рекомбинантных ДНК или генной инженерии.

Термин "моноклональное антитело" (mAb) или конструкт моноклонального антитела в настоящем документе относится к антителу, полученному из популяции по существу однородных антител, т.е. отдельные антитела в составе популяции являются идентичными, за исключением мутаций, происходящих по естественным причинам, и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, поскольку они направлены против единственного антигенного сайта или антигенной детерминанты, в отличие от препаратов обычных (поликлональных) антител, которые обычно содержат различные антитела, направленные против различных детерминант (или эпитопов). Кроме своей специфичности, моноклональные антитела обладают тем преимуществом, что они синтезируются культурой гибридомы, и поэтому не загрязнены другими иммуноглобулинами. Модификатор "моноклональное" указывает на то, что антитело получено из по существу однородной популяции антител; его не следует интерпретировать как требование о получении антитела посредством какого-либо конкретного способа.

Для получения моноклональных антител можно применять любой способ, позволяющий получать антитела с помощью непрерывных культур клеточных линий. Например, моноклональные антитела, которые предполагается применять, можно получить с помощью способа гибридом, впервые описанного в статье Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), или с применением методик рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567). Примеры дополнительных методик получения моноклональных антител человека включают методику триом, способы на основе B-клеточных гибридом человека (Kozbor, *Immunology Today*, 4 (1983), 72) и EBV-гибридом (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96).

Затем можно выполнить скрининг гибридом с помощью стандартных способов, например, твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА) и поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore™), с целью определения одной или более гибридом, продуцирующих антитело, специфически связывающееся с указанным антигеном. В качестве иммуногена можно применять любую форму соответствующего антигена, например, рекомбинантный антиген, естественные формы, любые варианты или фрагменты антигена, а также их антигенные пептиды. Поверхностный плазмонный резонанс, применяемый в системе BIAcore, можно применять для повышения эффективности фаговых антител, связывающих эпитоп антигена-мишени, например, EGFRVIII или CD3-эпсилон (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmborg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13).

Еще один типичный способ получения моноклональных антител включает скрининг библиотек экспрессии белка, например, библиотек фагового дисплея или рибосомного дисплея. Фаговый дисплей описан, например, в Ladner et al., патент США № 5223409; Smith (1985) *Science* 228: 1315-1317, Clackson

et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

Кроме применения библиотек дисплея, соответствующий антиген можно применять для иммунизации животного, не являющегося человеком, например, грызуна (например, мыши, хомяка, кролика или крысы). В одном варианте реализации животное, не являющееся человеком, несет по меньшей мере часть гена иммуноглобулина человека. Например, можно сконструировать линию мышей, дефектную по продукции антител мыши с крупными фрагментами локусов Ig (иммуноглобулина) человека. С помощью гибридной технологии можно продуцировать и отбирать антиген-специфические моноклональные антитела, происходящие от генов с желательной специфичностью. См., например, XENOMOUSE™, Green et al. (1994) *Nature Genetics* 7: 13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096, и WO 96/33735.

Моноклональное антитело также можно получить из организма животного, не являющегося человеком, а затем модифицировать, например, гуманизировать, деиммунизировать, сделать химерным и т.д., применяя методики рекомбинантных ДНК, известные в данной области техники. Примеры модифицированных конструкторов антител включают гуманизированные варианты антител нечеловеческого происхождения, антител с "созревшей аффинностью" (см., например, Hawkins et al. *J. Mol. Biol.* 254, 889-896 (1992) и Lowman et al., *Biochemistry* 30, 10832-10837 (1991)) и мутанты антител с модифицированной(ыми) эффекторной(ыми) функцией(ями) (см., например, патент США 5648260, Kontermann and Dübel (2010), loc. cit. и Little (2009), loc. cit.).

В иммунологии созревание аффинности представляет собой процесс, при котором В-клетки продуцируют антитела с повышенной аффинностью к антигену в ходе иммунного ответа. При повторном воздействии того же антигена организм хозяина будет продуцировать антитела со все большей аффинностью, аффинностью и в случае естественного прототипа, созревание аффинности *in vitro* основано на принципах мутации и отбора. Созревание аффинности *in vitro* успешно используется для оптимизации антител, конструкторов антител и фрагментов антител. Случайные мутации в пределах CDR вводят с помощью излучения, химических мутагенов или ПЦР пониженной точности. Кроме того, можно повысить генетическое разнообразие путем перетасовки цепей. Два или три цикла внесения мутаций и отбора с помощью методик дисплея, например, фагового дисплея, обычно приводят к получению фрагментов антител с аффинностью в нижнем наномолярном диапазоне.

Предпочтительный вид внесения изменений в конструктор антитела посредством аминокислотных замен включает замену одного или более остатков гипервариабельного участка исходного антитела (например, гуманизированного антитела или антитела человека). Как правило, полученный вариант(ы), отобранные для дальнейшей модификации, будут иметь улучшенные биологические свойства по отношению к исходному антителу, из которого они получены. Подходящий способ получения таких вариантов, полученных путем замены, включает созревание аффинности с применением фагового дисплея. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельного участка (например, 6-7 сайтов) подвергаются мутагенезу с получением всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Варианты антитела, полученные таким образом, экспонируют в одновалентной форме на поверхности частиц нитевидных фагов в виде гибридных белков с продуктами гена III M13, упакованных в каждую частицу. Затем выполняют скрининг вариантов на фаговом дисплее на предмет их биологической активности (например, связывающей активности), как описано в настоящем документе. Для идентификации сайтов гипервариабельного участка, являющихся кандидатами для модификации, можно выполнить мутагенез путем сканирования аланином, идентифицируя остатки гипервариабельного участка, вносящие значительный вклад в связывание антигена. В качестве альтернативы или дополнения, может быть выгодно анализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для выявления точек контакта между связывающим доменом и, например, EGFRVIII человека. Такие контактные остатки и соседние с ними остатки являются кандидатами для замены в соответствии с методиками, разработанными в настоящем документе. После получения таких вариантов панель вариантов подвергают скринингу, как описано в настоящем документе, и отбирают антитела с лучшими свойствами для дальнейшей разработки с помощью одного или более соответствующих анализов.

Моноклональные антитела и конструкторы антител в соответствии с настоящим изобретением, в частности, включают "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител конкретного вида животных или антител, принадлежащих к конкретному классу или подклассу, в то время как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител другого вида животных или антител, принадлежащих к другому классу или подклассу, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Рассматриваемые в настоящем документе химерные антитела включают "приматизированные" антитела, включающие антигенсвязывающие последовательности вариабельного домена, происходящие из антитела примата, не являющегося человеком (например, мартышковых, человекообразных обезьян и т.д.) и последовательности константной области человека. Описаны различные подходы к получению химерных антител. См., например, Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 6851, 1985; Takeda et al., *Nature* 314: 452, 1985, Cabilly et al., патент США № 4816567; Boss et al., патент США № 4816397; Tanaguchi et al., EP 0171496; EP 0173494; и GB

2177096.

Антитело, конструктор антитела, фрагмент антитела или вариант антитела можно модифицировать путем специфической делеции эпитопов Т-клеток человека (способ, называемый "деиммунизацией") посредством способов, описанных, например, в заявках WO 98/52976 или WO 00/34317. Вкратце, переменные домены тяжелой и легкой цепей антитела можно исследовать на предмет присутствия пептидов, связывающихся с ГКГС II класса; эти пептиды представляют собой потенциальные эпитопы Т-клеток (согласно определению в заявках WO 98/52976 и WO 00/34317). Для обнаружения потенциальных эпитопов Т-клеток можно использовать подход компьютерного моделирования, названный "продеванием пептидов", и, кроме того, можно исследовать базу данных пептидов, связывающих ГКГС II класса человека, на предмет наличия мотивов, присутствующих в VH- и VL-последовательностях, как описано в WO 98/52976 и WO 00/34317. Эти мотивы связываются с любым из 18 основных DR аллотипов ГКГС II класса, и, таким образом, составляют потенциальные эпитопы Т-клеток. Обнаруженные потенциальные эпитопы Т-клеток можно удалить путем замены небольшого количества аминокислотных остатков в переменных доменах, или предпочтительно, посредством одиночных аминокислотных замен. Обычно вносят консервативные замены. Часто, но не обязательно, можно использовать аминокислоту, часто встречающуюся в данном положении в эмбриональных последовательностях антител человека. Эмбриональные последовательности человека описаны, например, в статье Tomlinson, et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227: 776-798; Cook, G. P. et al. (1995) *Immunol. Today* Vol. 16 (5) : 237-242; и Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14: 4628-4638. Каталог V BASE представляет полный каталог последовательностей переменных областей иммуноглобулинов человека (составители Tomlinson, LA. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Кембридж, Великобритания). Эти последовательности можно использовать в качестве источника последовательностей человека, например, каркасных областей и CDR. Кроме того, можно использовать консервативные каркасные области человека, например, как описано в патенте США № 6300064.

"Гуманизированные" антитела, конструкторы антител, их варианты или фрагменты (например, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или другие антигенсвязывающие последовательности антител) представляют собой антитела или иммуноглобулины, состоящие главным образом из последовательностей, характерных для человека, и содержащие минимальное количество последовательностей, происходящих из иммуноглобулинов нечеловеческого происхождения. В большинстве случаев гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки гиперварибельного участка (также CDR) реципиента замещены остатками гиперварибельного участка видов, отличных от человека (например, грызунов) (донорное антитело), например, мыши, крысы, хомяка или кролика, обладающими желаемой специфичностью, аффинностью и эффективностью. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека замещаются соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированные антитела, используемые в настоящем изобретении, могут также содержать остатки, не встречающиеся ни в реципиентном антителе, ни в донорном антителе. Эти модификации вносят для дальнейшей оптимизации функционирования антител. Гуманизированное антитело также необязательно содержит по меньшей мере фрагмент константной области иммуноглобулина (Fc), обычно происходящий из иммуноглобулина человека. Дополнительную информацию см. в публикациях Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

Гуманизированные антитела или их фрагменты можно получить путем замены последовательностей переменного домена Fv-фрагмента, непосредственно не вовлеченных в связывание антигена, эквивалентными последовательностями переменных доменов Fv-фрагментов человека. Типичные способы получения гуманизированных антител или их фрагментов приведены в статьях Morrison (1985) *Science* 229: 1202-1207; Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4: 214; и патентах US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 5859205; и US 6407213. Эти способы включают выделение, манипулирование и экспрессию последовательностей нуклеиновых кислот, полностью или частично кодирующих переменные домены Fv-фрагмента иммуноглобулина, происходящие по меньшей мере из одной из тяжелой или легкой цепей. Такие нуклеиновые кислоты можно получить из гибридомы, продуцирующей антитело против заранее определенной мишени, как описано выше, а также из других источников. Затем рекомбинантную ДНК, кодирующую молекулу гуманизированного антитела, можно клонировать в соответствующий экспрессирующий вектор.

Гуманизированные антитела также можно получить с использованием трансгенных животных, например, мышей, экспрессирующих гены тяжелой и легкой цепи человека, но не способных к экспрессии эндогенных генов тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов мыши. Winter описывает пример способа пересадки CDR, который можно использовать для получения гуманизированных антител, описанных в данном документе (патент США № 5225539). Все CDR конкретного антитела человека можно заменить по меньшей мере частью CDR нечеловеческого происхождения, либо лишь некоторые из CDR можно заменить участками CDR нечеловеческого происхождения. Необходимо заменить лишь такое количество CDR, которое необходимо для связывания гуманизированного антитела с заранее определенным антигеном.

Гуманизированное антитело можно оптимизировать путем введения консервативных замен, замен

консенсусной последовательности, эмбриональных замен и/или обратных мутаций. Такие модифицированные молекулы иммуноглобулинов можно получить любым из нескольких способов, известных в данной области техники (например, Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor et al., Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson et al., Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982, и EP 239 400).

Термин "антитело человека", "конструкт антитела человека" и "связывающий домен человека" включает антитела, конструкторы антител и связывающие домены, содержащие такие области антитела, как переменные и константные области, или области, в значительной степени соответствующие последовательностям эмбриональных иммуноглобулинов человека, известным в данной области техники, в том числе, например, последовательностям, описанным в статье Rabat et al. (1991) (loc. cit.). Антитела человека, конструкторы антител или связывающие домены согласно настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями эмбриональных иммуноглобулинов человека (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR, и, в частности, в CDR3. Антитела человека, конструкторы антител или связывающие домены могут содержать по меньшей мере одно, два, три, четыре, пять или более положений, замещенных аминокислотным остатком, не кодируемым последовательностью эмбрионального иммуноглобулина человека. Определение антител человека, конструкторов антител и связывающих доменов в настоящем документе также охватывает полностью человеческие антитела, содержащие исключительно последовательности антител человека без искусственных и/или генетических модификаций, которые, например, можно получить с помощью таких технологий или систем, как Xenomouse.

В некоторых вариантах реализации конструкторы антитела согласно настоящему изобретению представляют собой "выделенные" или "в значительной степени чистые" конструкторы антител. Термин "выделенный" или "в значительной степени чистый" при использовании для описания конструкторов антител, описанных в настоящем документе, означает конструктор антитела, выявленный, отделенный и/или очищенный от компонента среды, в которой он был продуцирован. В предпочтительном случае конструктор антитела не содержит или фактически не содержит связей со всеми другими компонентами среды, в которой он был продуцирован. Загрязняющие компоненты среды, в которой был продуцирован полипептид, например, полученные из рекомбинантных трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые обычно мешают диагностическому или терапевтическому использованию полипептида, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Конструктор антитела может, например, составлять по меньшей мере приблизительно 5 мас.%, или по меньшей мере приблизительно 50 мас.% от общего количества белка в данном образце. Следует понимать, что выделенный белок может составлять от 5 до 99,9 мас.% от общего содержания белка, в зависимости от обстоятельств. Полипептид можно получить в значительно более высокой концентрации путем применения индуцибельного промотора или промотора, обеспечивающего высокую эффективность экспрессии, так что его получают в повышенной концентрации. Данное определение включает продукцию конструктора антитела в самых разнообразных организмах и/или клетках-хозяевах, известных в данной области техники. В предпочтительных вариантах реализации конструктор антитела очищают (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с помощью секвенатора с вращающимся стаканом, или (2) до гомогенности, определяемой при электрофорезе в ДСН-ПААГ при невозстанавливающих или восстанавливающих условиях с помощью окрашивания Кумасси синим или, предпочтительно, серебром. В то же время обычно выделенный конструктор антитела получают с использованием по меньшей мере одного этапа очистки.

Термин "связывающий домен" характеризует применительно к настоящему изобретению домен, который (специфически) связывается с/взаимодействует с/распознает заданный эпитоп-мишень или заданный сайт-мишень на молекулах-мишенях (антигенах), в данном случае: EGFRVIII и CD3, соответственно. Структура и функция первого связывающего домена (распознающего EGFRVIII), и, предпочтительно, также структура и функция второго связывающего домена (распознающего CD3) основана(ы) на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной или целой молекулы иммуноглобулина. В соответствии с настоящим изобретением, первый связывающий домен характеризуется наличием по меньшей мере трех CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VL-области) и/или трех CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VH-области). Второй связывающий домен также предпочтительно характеризуется минимальными структурными требованиями к антителу, которые позволяют ему связывать мишень. Конкретнее, второй связывающий домен содержит по меньшей мере три CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VL-области) и/или трех CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VH-области). Предполагается, что первый и/или второй связывающий домен получают или можно получить с помощью фагового дисплея или способов скрининга библиотек, а не путем пересадки последовательностей CDR уже существующего (моноклонального) антитела в каркас.

В соответствии с настоящим изобретением, связывающие домены находятся в виде одного или более полипептидов. Такие полипептиды могут включать белковые и небелковые фрагменты (например, химические линкеры или химические сшивающие агенты, например, глутаровый альдегид). Белки (в том числе их фрагменты, предпочтительно биологически активные фрагменты и пептиды, как правило, со-

держащие менее 30 аминокислот) включают две или более аминокислоты, соединенные друг с другом посредством ковалентной пептидной связи (что приводит к получению цепи аминокислот). Термин "полипептид" в настоящем документе описывает группу молекул, которые обычно состоят из более чем 30 аминокислот. Полипептиды могут далее образовывать мультимеры, например, димеры, тримеры и олигомеры более высоких порядков, т.е., состоящие из более чем одной молекулы полипептида. Молекулы полипептидов, образующие такие димеры, тримеры и т.д., могут быть идентичными или не идентичными. Соответствующие структуры таких мультимеров более высокого порядка, соответственно, называются гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и т.д. Пример гетеромультимера представляет собой молекулу антитела, которая, в своей природной форме, состоит из двух идентичных легких полипептидных цепей и двух идентичных тяжелых полипептидных цепей. Термины "пептид", "полипептид" и "белок" также относятся к пептидам/полипептидам/белкам, модифицированным посредством естественных механизмов, где модификацию осуществляют, например, путем посттрансляционной модификации, например, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования и т.п. "Пептид", "полипептид" или "белок", упоминаемый в настоящем документе, также может быть химически модифицирован, например, пэгиллирован. Такие модификации хорошо известны в данной области техники и описаны ниже в данном документе.

Предпочтительно, связывающий домен, связывающийся с EGFRvIII, и/или связывающий домен, связывающийся с CD3, являе(ю)тся связывающими доменами человека. Антитела и конструкторы антитела, содержащие по меньшей мере один связывающий домен человека, позволяют избежать некоторых проблем, связанных с антителами или конструкторами антител, содержащими вариabельные и/или константные области нечеловеческого происхождения, например, грызуна (например, мыши, крысы, хомяка или кролика). Наличие таких белков, происходящих из организма грызунов, может приводить к быстрому выведению антител или конструкторов антител, или может привести к возникновению иммунного ответа пациента против антитела или конструктора антитела. Чтобы избежать применения антител или конструкторов антител, происходящих из организма грызунов, можно получить антитела/конструкторы антител человека, или полностью человеческие антитела/конструкторы антител за счет введения функции антитела человека в организм грызуна, в результате чего организм грызуна продуцирует полностью человеческие антитела.

Возможность клонировать и реконструировать локусы человека размером в миллионы пар оснований в YAC и вводить их в эмбриональные последовательности мыши обеспечивает мощный подход к выявлению функциональных компонентов очень крупных или грубо картированных локусов, а также получению полезных моделей заболеваний человека. Кроме того, использование такой технологии для замещения локусов мыши эквивалентными локусами человека может обеспечить уникальный взгляд на экспрессию и регуляцию продуктов генов человека в процессе развития, их связь с другими системами, и их участие в индукции и прогрессировании заболевания.

Важным вариантом практического применения такой стратегии является "гуманизация" гуморальной иммунной системы мыши. Введение локусов иммуноглобулинов человека (Ig) локусов в организмы мышей с инактивированными эндогенными генами Ig обеспечивает возможность изучения механизмов, лежащих в основе запрограммированной экспрессии и сборки антител, а также их роли в развитии В-клеток. Кроме того, такая стратегия может обеспечить идеальный источник для продукции полностью человеческих моноклональных антител (mAb) - важного этапа на пути к реализации перспективных терапевтических средств на основе антител для лечения заболеваний человека. Ожидается, что полностью человеческие антитела или конструкторы антител позволят минимизировать иммуногенные и аллергические реакции, свойственные для mAb мыши или mAb, модифицированных последовательностями мыши и, таким образом, увеличить эффективность и безопасность вводимых антител/конструкторов антител. Можно ожидать, что применение полностью человеческих антител или конструкторов антител обеспечивает существенные преимущества при лечении хронических и рецидивирующих заболеваний человека, например, воспалительных, аутоиммунных заболеваний и рака, которые требуют повторного введения соединений.

Один из подходов к этой задаче заключался в конструировании линий мышей, дефектных по продукции антител и несущих крупные фрагменты локусов Ig человека; ожидалось, что такие мыши должны продуцировать широкий репертуар антител человека в отсутствие антител мыши. Крупные фрагменты Ig человека должны сохранять широкое разнообразие вариabельных генов, а также надлежащую регуляцию продукции и экспрессии антител. За счет использования механизмов диверсификации и селекции антител, характерных для мыши, и отсутствия иммунологической толерантности к белкам человека, воспроизводимый в этих линиях мышей репертуар антител человека должен был обеспечить получение антител с высокой аффинностью против любого рассматриваемого антигена, в том числе антигенов человека. С помощью гибридной технологии легко продуцировать и отбирать антиген-специфические mAb человека с желательной специфичностью. Данная общая стратегия была продемонстрирована в связи с получением первых линий мыши XenoMouse (см. Green et al. Nature Genetics 7: 13-21 (1994)). Линии XenoMouse были сконструированы с использованием искусственного хромосом дрожжей (YAC), содержащих фрагменты локусов тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человека эмбриональной конфигурации раз-

мером 245 и 190 т. п. о., соответственно, содержащие основные последовательности вариабельной и константной областей. YAC, содержащие Ig человека, оказались совместимы с системами реаранжировки и экспрессии антител мыши и могли замещать инактивированные гены Ig мыши. Это было продемонстрировано за счет их способности стимулировать развитие В-клеток, продуцировать репертуар полностью человеческих антител, характерных для взрослого человека, и генерировать антиген-специфические мАт человека. Эти результаты также указывали, что введение более крупных фрагментов локусов Ig человека, содержащих большее количество V-генов, дополнительных регуляторных элементов и константных областей Ig человека, может позволять воспроизводить по существу полный репертуар, характерный для гуморального ответа человека на инфекцию и иммунизацию. Работа Green et al. была недавно продолжена путем введения более чем приблизительно 80% репертуара антител человека за счет внедрения фрагментов YAC с локусами тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человека эмбриональной конфигурации размером несколько миллионов пар оснований, соответственно. См. Mendez et al. *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997) и заявку на патент США серийный № 08/759620.

Получение мышей XenoMouse дополнительно обсуждается и описывается в заявках на патент США серийный № 07/4 66008, серийный № 07/610515, серийный № 07/919297, серийный № 07/922649, серийный № 08/031801, серийный № 08/112848, серийный № 08/234145, серийный № 08/376279, серийный № 08/430938, серийный № 08/464584, серийный № 08/464582, серийный № 08/463191, серийный № 08/462837, серийный № 08/486853, серийный № 08/486857, серийный № 08/486859, серийный № 08/462513, серийный № 08/724752, и серийный № 08/759620; и патентах США № 6162963; 6150584; 6114598; 6075181, и 5939598 и патентах Японии № 3068180 B2, 3068506 B2 и 3068507 B2. См. также Mendez et al. *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997) и Green and Jakobovits J. *Exp. Med.* 188: 483-495 (1998), EP 0463151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 и WO 03/47336.

В альтернативном подходе другие авторы, в том числе GenPharm International, Inc., использовали "мини-локусный" подход. В мини-локусном подходе экзогенный локус Ig имитируют путем включения фрагментов (отдельных генов) локуса Ig. Так, один или более VH-генов, один или более из DH-генов, один или более из JH-генов, константную мю-область и вторую константную область (предпочтительно константную гамма-область) объединяют в составе конструкта для внедрения в организм животного. Этот подход описан, например, в патенте США № 5545807 Surani et al. и патентах США № 5545806; 5625825; 5625126; 5633425; 5661016; 5770429; 5789650; 5814318; 5877397; 5874299; и 6255458, авторами каждого из которых являются Lonberg и Kay, патентах США № 5591669 и 6023010, авторами которых являются Krimpenfort и Berns, патентах США № 5612205; 5721367; и 5789215, авторами которых являются Berns et al., и патенте США № 5643763, авторами которого являются Choi и Dunn, и заявки GenPharm International U. S. на патент США серийный № 07/574748, серийный № 07/575962, серийный № 07/810279, серийный № 07/853408, серийный № 07/904068, серийный № 07/990860, серийный № 08/053131, серийный № 08/096762, серийный № 08/155301, серийный № 08/161739, серийный № 08/165699, серийный № 08/209741. См. также EP 0 546 073 B1, WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 и WO 98/24884 и патент США № 5981175. Кроме того, см. статьи Taylor et al. (1992), Chen et al. (1993), Tuaille et al. (1993), Choi et al. (1993), Lonberg et al. (1994), Taylor et al. (1994) и Tuaille et al. (1995), Fishwild et al. (1996).

Kirin также продемонстрировал получение антител человека в организмах мышей, в которые внедряли крупные фрагменты хромосом или целые хромосомы путем слияния микроклеток. См. заявки на европейский патент США № 773288 и 843961. Xenex Biosciences разрабатывает технологию для потенциального получения антител человека. В данной технологии ТКИН-мышей восстанавливают с помощью лимфатических клеток человека, например, В- и/или Т-клеток. Затем мышей иммунизируют антигеном, после чего они могут генерировать иммунный ответ против антигена. См. патенты США № 5476996; 5698767; и 5958765.

Реакции антител человека против антител мыши (НАМА) привели к получению в данной области химерных или иным образом гуманизированных антител. В то же время ожидается появление некоторых реакций за счет антител человека против химерных антител (НАСА), особенно при хроническом применении или применении многократных доз антитела. Таким образом, было бы желательно получить конструкты антител, содержащие связывающий домен человека против EGFRVIII и связывающий домен человека против CD3 в целях решения проблем и/или эффектов реакций НАМА или НАСА.

Термины "(специфически) связывается с", "(специфически) распознает", "(специфически) направлен против" и "(специфически) реагирует с" в соответствии с настоящим изобретением означают, что связывающий домен взаимодействует или специфически взаимодействует с заданным эпитопом или иным сайтом-мишенью на молекулах-мишенях (антигенах), в данном случае: EGFRVIII и CD3, соответственно.

Термин "эпитоп" относится к сайту антигена, с которым специфически связывается связывающий домен, например, антитело или иммуноглобулин, или производное, фрагмент или вариант антитела или иммуноглобулина. "Эпитоп" является антигенным и, таким образом, термин "эпитоп" в настоящем документе иногда также называют "антигенной структурой" или "антигенной детерминантой". Таким обра-

зом, связывающий домен является "сайтом взаимодействия с антигеном". Указанное связывание/взаимодействие также понимают под определением "специфическое распознавание".

Эпитопы могут быть образованы как соседними аминокислотами, так и не соседними аминокислотами, которые сближаются в результате свертывания белка в третичную структуру. "Линейный эпитоп" является эпитопом, где первичная аминокислотная последовательность содержит распознаваемый эпитоп. Линейный эпитоп обычно включает по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4, а чаще по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6, или по меньшей мере 7, например, от приблизительно 8 до приблизительно 10 аминокислот в уникальной последовательности.

"Конформационный эпитоп", в отличие от линейного эпитопа, является эпитопом, где первичная аминокислотная последовательность, содержащая эпитоп, не является единственным компонентом, определяющим распознаваемый эпитоп (например, эпитоп, где связывающий домен не обязательно распознает первичную аминокислотную последовательность). Как правило, конформационный эпитоп содержит большее количество аминокислот по сравнению с линейным эпитопом. При распознавании конформационных эпитопов связывающий домен распознает трехмерную структуру антигена, предпочтительно пептида или белка или их фрагмента (в контексте настоящего изобретения, антигенная структура для одного из связывающих доменов содержится в составе белка EGFRVIII). Например, при фолдинге молекулы белка с образованием трехмерной структуры некоторые аминокислоты и/или полипептидный каркас, образующий конформационный эпитоп, сближаются, что позволяет антителу распознать эпитоп. Способы определения конформации эпитопов включают рентгеноструктурный анализ, двумерную ядерную магнитно-резонансную (2D-ЯМР) спектроскопию и сайт-специфическое мечение спиновой меткой и электронную парамагнитно-резонансную (ЭПР) спектроскопию, но не ограничиваются ими.

Способы картирования эпитопов описываются следующим образом: При замене/замещении области (последовательности смежных аминокислот) в белке EGFRVIII человека на его соответствующую область антигена EGFRVIII вида животного, не являющегося человеком и приматом (например, EGFRVIII мыши, но допускается применение и антигенов других видов животных, например, курицы, крысы, хомяка, кролика), ожидается снижение эффективности связывания связывающего домена, если связывающий домен не обладает перекрестной реакционной способностью по отношению к используемому EGFRVIII вида животного, не являющегося человеком и приматом. Указанное снижение предпочтительно составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40 или 50%; более предпочтительно по меньшей мере 60, 70, или 80%, и наиболее предпочтительно 90, 95 или даже 100% по сравнению со связыванием с соответствующей областью в белке EGFRVIII человека, причем связывание с соответствующей областью в белке EGFRVIII человека принимают за 100%.

Дополнительный способ определения вклада конкретных остатков антигена-мишени в распознавание конструктором антитела или связывающим доменом является сканирование аланином (см., например, Morrison KL & Weiss GA. *Cur Opin Chem Biol.* 2001 Jun; 5(3) : 302-7), при котором каждый анализируемый остаток заменяют остатком аланина, например, посредством сайт-специфического мутагенеза. Аланин используют из-за его небольшой, химически инертной метильной функциональной группы, которая, тем не менее, имитирует эталонные вторичные структуры, которыми обладают многие другие аминокислоты. Иногда можно использовать крупные аминокислоты, например, валин, лейцин - в тех случаях, когда желательна сохранение размера мутировавших остатков.

Сканирование аланином является хорошо отработанной технологией, которая используется в течение длительного времени.

Взаимодействие между связывающим доменом и эпитопом или областью, содержащей эпитоп, подразумевает, что связывающий домен обладает измеримой аффинностью по отношению к эпитопу/области, содержащей эпитоп, в составе определенного белка или антигена (в данном случае: EGFRVIII и CD3, соответственно) и, как правило, не обладает значительной реакционной способностью по отношению к белкам или антигенам, отличающимся от EGFRVIII или CD3. "Измеримая аффинность" включает связывание с аффинностью приблизительно  $10^{-6}$  М (KD) или более сильное связывание. Предпочтительно, связывание считается специфическим, если аффинность связывания составляет от приблизительно  $10^{-12}$  до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-12}$  до  $10^{-9}$  М, от  $10^{-12}$  до  $10^{-10}$  М, от  $10^{-11}$  до  $10^{-8}$  М, предпочтительно от приблизительно  $10^{-11}$  до  $10^{-9}$  М. Специфичность реакции или связывания связывающего домена с мишенью можно легко проверить, в числе прочего, сравнивая реакцию указанного связывающего домена с белком-мишенью или антигеном с реакцией указанного связывающего домена с белками или антигенами, не являющимися EGFRVIII или CD3.

Предпочтительно, связывающий домен согласно настоящему изобретению не связывается в значительной степени или по существу не связывается с белками или антигенами, кроме EGFRVIII или CD3 (т.е. первый связывающий домен не способен связывать белки, кроме EGFRVIII, а второй связывающий домен не способен связывать белки, кроме CD3).

Термин "не связывается в значительной степени/по существу не связывается" или "не способен связываться" означает, что связывающий домен согласно настоящему изобретению не связывает белки или антигены, кроме EGFRVIII или CD3, т.е. не обладает реакционной способностью по отношению к белкам или антигенам, кроме EGFRVIII или CD3, составляющей более 30%, предпочтительно не более 20%, бо-

лее предпочтительно не более 10%, особенно предпочтительно не более 9, 8, 7, 6 или 5%, причем связывание с EGFRVIII или CD3, соответственно, принимают за 100%.

Считается, что специфическое связывание осуществляется конкретными мотивами в составе аминокислотной последовательности связывающего домена и антигена. Таким образом, связывание достигается за счет их первичной, вторичной и/или третичной структуры, а также в результате вторичной модификации указанных структур. Специфическое взаимодействие сайта взаимодействия с антигеном со специфическим антигеном может привести к простому связыванию указанного сайта с антигеном. Кроме того, специфическое взаимодействие сайта взаимодействия с антигеном со специфическим антигеном может, в качестве альтернативы или дополнения, привести к иницированию сигнала, например, за счет индукции изменения конформации антигена, олигомеризации антигена и т.д.

Эпитоп биспецифического конструктора антитела согласно настоящему изобретению расположен в области специфического соединения в составе EGFRvIII между аминокислотными остатками 5 и 274 EGFR, являющегося результатом мутации EGFR по направлению к сплайс-мутации EGFRvIII. Эта мутация удаляет остатки 2-273 зрелой последовательности EGFR, в то же время внедряя единственный остаток глицина (см. фиг. 1)

Кроме того, в одном варианте реализации изобретения является предпочтительным связывание второго связывающего домена с CD3-эпсилон человека и CD3-эпсилон *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* или *Saimiri sciureus*.

Термин "вариабельный" относится к фрагментам антитела или доменов иммуноглобулина, характеризующимся изменчивостью последовательности и участвующим в определении специфичности и аффинности связывания конкретного антитела (т.е. "вариабельному(ым) домену(ам)"). Соединение вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) друг с другом образует единичный сайт связывания с антигеном.

Изменчивость неравномерно распределена на протяжении вариабельных доменов антител; она сосредоточена в поддоменах каждой из вариабельных областей тяжелой и легкой цепи. Эти поддомены называются "гипервариабельными областями" или "областями, определяющими комплементарность" (CDR). Более консервативные (т.е. не гипервариабельные) фрагменты вариабельных доменов называются "каркасными" областями (FRM или FR) и обеспечивают каркас для шести CDR в трехмерном пространстве с образованием антиген-связывающей поверхности. Каждый из вариабельных доменов природных легких и тяжелых цепей содержит четыре FRM-области (FR1, FR2, FR3 и FR4), преимущественно принимающих конфигурацию  $\beta$ -листа и соединенных тремя гипервариабельными областями, образующими петли, соединяющие структуры  $\beta$ -типа, а в некоторых случаях - являющиеся их частью. Гипервариабельные области каждой цепи удерживаются в непосредственной близости друг от друга посредством FRM и вместе с гипервариабельными областями другой цепи вносят вклад в образование антиген-связывающего сайта (см. Kabat et al., loc. cit.).

Термин "CDR" и его множественное число относится к области, определяющей комплементарность, три из которых составляют обязательную характеристику вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2 и CDR L3), а три составляют обязательную характеристику вариабельной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3). CDR содержат большую часть остатков, ответственных за специфические взаимодействия антитела с антигеном и, таким образом, вносящих вклад в функциональную активность молекул антитела: они являются основными факторами, определяющими специфичность по отношению к антигену.

Точное определение границ и длины CDR подпадает под действие различных систем классификации и нумерации. Таким образом, CDR можно определять согласно Kabat, Chothia, контактными остатками или любым другим вариантам определения границ, включая систему нумерации, описанную в настоящем документе. Несмотря на различные границы, каждая из этих систем характеризуется определенной степенью перекрытия при определении сути так называемых "гипервариабельных областей" в рамках вариабельных последовательностей. Поэтому определения CDR согласно этим системам могут отличаться по длине и границам областей по отношению к соседним каркасным областям. См., например, системы Kabat (подход, основанный на межвидовой изменчивости последовательностей), Chothia (подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело), и/или MacCallum (Rabat et al., loc. cit. ; Chothia et al., J. Mol. Biol, 1987, 196: 901-917; и MacCallum et al. , J. Mol. Biol, 1996, 262: 732). Еще один стандарт для описания характеристик сайта связывания антигена представляет собой определение AbM, используемое программным обеспечением для моделирования антител Oxford Molecular AbM. См., например, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Rontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). В тех случаях, когда эти две методики идентификации остатков определяют перекрывающиеся, но не идентичные области, их можно комбинировать для определения гибридного CDR. Однако нумерация в соответствии с так называемой системой Kabat является предпочтительной.

Как правило, CDR образуют петлевую структуру, которую можно классифицировать как каноническую структуру. Термин "каноническая структура" относится к конформации основной цепи, которую

принимают антиген-связывающие петли (CDR). Сравнительные структурные исследования позволили установить, что пять из шести антиген-связывающих петель обладают лишь ограниченным репертуаром доступных конформаций. Каждая каноническая структура может характеризоваться углами поворота полипептидного каркаса. Соответствующие петли в разных антителах, таким образом, могут характеризоваться очень сходными трехмерными структурами, несмотря на высокую изменчивость аминокислотной последовательности в большинстве фрагментов петли (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901; Chothia et al., *Nature*, 1989, 342: 877; Martin and Thornton, *J. Mol. Biol.*, 1996, 263: 800). Кроме того, существует взаимосвязь между структурой, которую принимает петля, и аминокислотными последовательностями, окружающими ее. Конформация конкретного канонического класса определяется длиной петли и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях в составе петли, а также в консервативном каркасе (т.е. за пределами петли). Таким образом, присвоение определенного канонического класса может основываться на наличии этих ключевых аминокислотных остатков.

Термин "каноническая структура" может также включать соображения относительно линейной последовательности антитела, например, согласно каталогу Kabat (Kabat et al., loc. cit.). Схема (система) нумерации Kabat представляет собой широко распространенный стандарт последовательной нумерации аминокислотных остатков варибельного домена антитела и предпочтительную схему, применяемую в настоящем изобретении, как уже упоминалось в настоящем документе. Для определения канонической структуры антитела также можно использовать дополнительные структурные факторы. Например, различия, не полностью отраженные в нумерации по Kabat, можно описать с помощью системы нумерации по Chothia et al. и/или выявить другими способами, например, кристаллографией и дву- и трехмерного компьютерного моделирования. Соответственно, последовательность данного антитела можно отнести к каноническому классу, что позволяет, среди прочего, определять соответствующие несущие последовательности (например, на основании желания включить целый ряд канонических структур в библиотеку). Нумерация аминокислотных последовательностей антитела по Kabat и структурные факторы, описанные в статье Chothia et al., loc. cit., и их влияние на интерпретацию канонических аспектов структуры антител описаны в литературе. Субъединичная структура и трехмерная конфигурация различных классов иммуноглобулинов хорошо известны в данной области техники. Обзор структуры антитела см. в руководстве *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988.

CDR3 легкой цепи и особенно CDR3 тяжелой цепи могут являться наиболее важными детерминантами связывания антигена в пределах варибельных областей легкой и тяжелой цепи. В некоторых конструктах антител CDR3 тяжелой цепи составляет основную площадь контакта между антигеном и антителом. Схемы отбора *in vitro*, в которых варьируется только CDR3, можно использовать для изменения связывающих свойств антитела или определения остатков, вносящих вклад в связывание антигена. Соответственно, CDR3 обычно является крупнейшим источником молекулярного разнообразия в пределах связывающего сайта антитела. Например, длина H3 в некоторых случаях может составлять всего два или более 26 аминокислотных остатков.

В классическом полноразмерном антителе или иммуноглобулине каждая легкая (L) цепь соединяется с тяжелой (H-) цепью посредством одной ковалентной дисульфидной связи, в то время как две H-цепи соединяются друг с другом посредством одной или более дисульфидных связей, в зависимости от изоформа H-цепи. CH-домен, наиболее проксимальный по отношению к VH, обычно обозначают как CH1. Константные ("C") домены непосредственно не участвуют в связывании антигена, но обладают различными эффекторными функциями, например, антитело-зависимой, клеточно-опосредованной цитотоксичностью и активацией комплемента. Fc-область антитела находится в пределах константных доменов тяжелой цепи и, например, может взаимодействовать с Fc-рецепторами клеточной поверхности.

Последовательность генов антитела после сборки и соматические мутации сильно варьируют; согласно оценкам, эти изменчивые гены кодируют  $10^{10}$  различных молекул антител (*Immunoglobulin Genes*, 2<sup>nd</sup> ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995). Соответственно, иммунная система обеспечивает репертуар иммуноглобулинов. Термин "репертуар" относится по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, полностью или частично происходящей по меньшей мере от одной последовательности, кодирующей по меньшей мере один иммуноглобулин. Последовательность(и) можно получать путем реаранжировки V-, D- и J-сегментов тяжелых цепей и V- и J-сегментов легких цепей *in vivo*. В качестве альтернативы, последовательность(и) можно получать из клетки, в ответ на которую происходит реаранжировка, например, при стимуляции *in vitro*. В качестве альтернативы, последовательность(и) можно частично или полностью получить посредством сплайсинга ДНК, нуклеотидного синтеза, мутагенеза и других способов, см., например, патент США 5565332. Репертуар может включать только одну последовательность или множество последовательностей, включая последовательности генетически разнообразной коллекции.

Термин "биспецифический" в настоящем документе относится к конструкту антитела, который является "по меньшей мере биспецифическим", т.е. содержащим по меньшей мере первый связывающий домен и второй связывающий домен, причем первый связывающий домен связывается с одним антигеном или мишенью (в данном случае: EGFRVIII), а второй связывающий домен связывается с другим антигеном или мишенью (в данном случае: CD3). Соответственно, конструкты антитела согласно настоя-

шему изобретению обладают специфичностью по отношению к по меньшей мере двум различным антигенам или мишеням. Термин "биспецифический конструктор антитела" согласно настоящему изобретению также включает полиспецифические конструкторы антител, например, триспецифические конструкторы антител, содержащие три связывающих домена, или конструкторы, обладающие более чем тремя (например, четыре, пять...) специфичностями.

Учитывая, что конструкторы антител согласно настоящему изобретению являются (по меньшей мере) биспецифическими, они не встречаются в природе и заметно отличаются от естественных продуктов. Соответственно, "биспецифический" конструктор антитела или иммуноглобулин является искусственным гибридным антителом или иммуноглобулином, содержащим по меньшей мере два отдельных сайта связывания с различной специфичностью. Биспецифические конструкторы антител можно получить с помощью различных способов, включая слияние гибридом или соединение Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990).

Указанные по меньшей мере два связывающих домена и переменные домены конструктора антитела согласно настоящему изобретению могут содержать или не содержать пептидные линкеры (спейсерные пептиды). Термин "пептидный линкер" включает в соответствии с настоящим изобретением аминокислотную последовательность, с помощью которой аминокислотные последовательности одного (вариабельного и/или связывающего) домена и другого (вариабельного и/или связывающего) домена конструктора антитела согласно настоящему изобретению связаны друг с другом. Важнейшей особенностью такого пептидного линкера является то, что он не характеризуется полимеризующей активностью. К подходящим пептидным линкерам относятся линкеры, описанные в патентах США 4751180 и 4935233 или WO 88/09344. Пептидные линкеры также можно использовать для присоединения других доменов или модулей или областей (например, продления периода полужизни доменов) конструктора антитела согласно настоящему изобретению.

При применении линкера длина и последовательность этого линкера предпочтительно достаточны для гарантии того, что каждый из первого и второго доменов могут независимо друг от друга сохранять свою различную специфичность связывания. Для пептидных линкеров, соединяющих по меньшей мере два связывающих домена (или два переменных домена) в конструкторе антитела согласно настоящему изобретению, предпочтительны пептидные линкеры, содержащие лишь небольшое количество аминокислотных остатков, например, 12 аминокислотных остатков или менее. Так, предпочтительны пептидные линкеры из 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислотных остатков. Исследуемый пептидный линкер длиной менее 5 аминокислот содержит 4, 3, 2 или одну аминокислоту, причем предпочтительны линкеры, богатые Gly. Особенно предпочтительной "единственной" аминокислотой в контексте указанного "пептидного линкера" является Gly. Соответственно, указанный пептидный линкер может состоять из одной аминокислоты Gly. Еще один предпочтительный вариант реализации пептидного линкера характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т.е. Gly<sub>4</sub>Ser (SEQ ID NO:1) или ее полимеры, т.е. (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>x</sub>, где x - целое число, равное 1 или более (например, 2 или 3). Предпочтительные линкеры представлены SEQ ID NO:1-9. Характеристики указанного пептидного линкера, которые включают отсутствие стимуляции вторичных структур, известны в данной области техники и описаны, например, в статьях Dall'Acqua et al. (*Biochem.* (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (*Mol Immunol* (1992) 29, 21-30) и Raag and Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Предпочтительны пептидные линкеры, не стимулирующие дальнейшего образования вторичных структур. Соединение указанных доменов друг с другом можно обеспечить, например, за счет генной инженерии, как описано в примерах. Способы получения гибридных и функционально связанных биспецифических одноцепочечных конструкторов и их экспрессия в клетках млекопитающих или бактериях хорошо известны в данной области техники (например, WO 99/54440 или Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).

Как описано выше в настоящем документе, в данном изобретении предложен предпочтительный вариант реализации, в котором конструктор антитела представлен в формате, выбранном из группы, состоящей из (scFv)<sub>2</sub>, однодоменном scFv-мАт, диател и олигомеров любого из этих форматов.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом реализации и описанием в прилагаемых примерах, конструктор антитела согласно настоящему изобретению представляет собой "биспецифический одноцепочечный конструктор антитела", более предпочтительно - биспецифический "одноцепочечный Fv" (scFv). Хотя два домена Fv-фрагмента - VL и VH - кодируются отдельными генами, их можно объединить с применением рекомбинантных способов, с помощью синтетического линкера, описанного ранее в настоящем документе и обеспечивающего их получение в виде единого белка, в котором VL- и VH-области спарены и образуют одновалентную молекулу; см., например, Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85: 5879-5883). Эти фрагменты антител получают с помощью общепринятых методик, известных специалистам в данной области техники; оценку функций фрагментов выполняют таким же образом, как и для целых или полноразмерных антител. Одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), соответственно, представляет собой гибридный белок, содержащий переменную область тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) иммуноглобулинов, как правило, связанные с коротким линкерным пептидом, содержащим от приблизительно десяти до приблизительно 25 аминокислот, предпочтительно от прибли-

зительно 15 до 20 аминокислот. Линкер обычно богат глицином (в целях гибкости), а также серином или треонином (в целях растворимости), и может соединять N-конец VH с C-концом VL или наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и внедрение линкера.

Биспецифические одноцепочечные молекулы известны в данной области техники и описаны в WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Loffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Описанные методики получения одноцепочечных антител (см., в числе прочего, патент США 4 94 677 8, Kontermann and Dübel (2010), loc. cit. и Little (2009), loc. cit.) можно адаптировать для продукции одноцепочечных конструкторов антител, специфически распознающих заданную(ые) мишень(и).

Двухвалентный (также называемые дивалентными) или биспецифические одноцепочечные переменные фрагменты (би-scFv, или ди-scFv в формате (scFv)<sub>2</sub> можно сконструировать путем связывания двух молекул scFv (например, с помощью линкеров, описанных выше). Если эти две молекулы scFv обладают одинаковой специфичностью связывания, полученную молекулу (scFv)<sub>2</sub> предпочтительно называют двухвалентной (т.е. несущей две валентности для одного и того же эпитопа-мишени). Если эти две молекулы scFv обладают различной специфичностью связывания, полученную молекулу (scFv)<sub>2</sub> предпочтительно называют биспецифической. Связывание можно осуществить путем продукции единой пептидной цепи с двумя VH-областями и двумя VL-областями с получением тандемных scFv (см., например, Kufer P. et al., (2004) Trends in Biotechnology 22(5): 238-244). Другая возможность заключается в создании молекул scFv с линкерными пептидами, которые являются слишком короткими для совместного фолдинга двух переменных областей (например, длиной приблизительно пять аминокислот), что стимулирует димеризацию scFv. Этот вид молекул известен под названием "диатела" (см., например, Hollinger, Philipp et al., (July 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (14): 6444-8.).

Согласно предпочтительному варианту реализации конструктора антитела в соответствии с настоящим изобретением переменные области тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) связывающего домена, связывающиеся с антигеном-мишенью (EGFRvIII или CD3), не соединены непосредственно через вышеописанный пептидный линкер, но связывающий домен сформирован за счет образования биспецифической молекулы, как описано для диатела. Таким образом, VH-цепь CD3-связывающего домена можно присоединить к VL EGFRvIII-связывающего домена посредством такого пептидного линкера, а VH-цепь EGFRvIII-связывающего домена присоединяют к VL CD3-связывающего домена посредством такого пептидного линкера.

Однодоменные антитела содержат лишь один (мономерный) переменный домен антитела, способный селективно связываться со специфическим антигеном, независимо от других V-областей или доменов. Первые однодоменные антитела были сконструированы из тяжелых цепей антител верблюдовых, и они называются V<sub>H</sub>H-фрагментами. У хрящевых рыб также есть антитела на основе тяжелой цепи (IgNAR), из которых можно получить однодоменные антитела, называемые V<sub>NAR</sub>-фрагментами. Альтернативный подход заключается в разделении димерных переменных доменов обычных иммуноглобулинов, например, человека или грызунов на мономеры, т.е. получение VH или VL в виде однодоменного Ат. Хотя большинство исследований однодоменных антител в настоящее время основаны на переменных доменах тяжелой цепи, показано, что нанотела, полученные из легких цепей, также специфически связываются с эпитопами-мишенями. Примеры однодоменных антител называются sdAb, нанотелами или антителами на основе одиночного переменного домена.

(Однодоменное мАт)<sub>2</sub>, соответственно, представляет собой конструктор моноклонального антитела, состоящий из (по меньшей мере) двух однодоменных моноклональных антител, которые по отдельности выбраны из группы, содержащей VH, VL, V<sub>H</sub>H и V<sub>NAR</sub>. Линкер предпочтительно находится в форме пептидного линкера. Аналогичным образом, "scFv-однодоменное моноклональное антитело" представляет собой конструктор моноклонального антитела, состоящий из по меньшей мере одного однодоменного антитела, описанного выше, и одной молекулы scFv, описанной выше. Как и ранее, линкер предпочтительно находится в форме пептидного линкера.

Т-клетки или Т-лимфоциты представляют собой разновидность лимфоцитов (которые сами по себе представляют собой разновидность лейкоцитов), которые играют центральную роль в клеточно-опосредованном иммунитете. Существует несколько субпопуляций Т-клеток, каждая из которых обладает своей функцией. Т-клетки можно отличить от других лимфоцитов, например, В-клеток и НК-клеток, по наличию Т-клеточного рецептора (TCR) на поверхности клетки. TCR отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), и состоит из двух различных белковых цепей. У 95% Т-клеток TCR состоит из альфа- (α) и бета- (β)-цепей. При взаимодействии TCR с антигенным пептидом и ГКГС (комплексом пептид/ГКГС) Т-лимфоцит активируется за счет ряда биохимических явлений, опосредованных соответствующими ферментами, корецепторами, специализированными адаптерными молекулами и активированными или высвобожденными факторами транскрипции. Рецепторный комплекс CD3 представляет собой белковый комплекс и состоит из четырех це-

пей. У млекопитающих этот комплекс содержит CD3 $\gamma$  (гамма)-цепь, CD35 (дельта)-цепь и две CD3 $\epsilon$  (эпсилон)-цепи. Эти цепи ассоциированы с Т-клеточным рецептором (TCR) и так называемой С, (дзета)-цепью с образованием комплекса "Т-клеточный рецептор-CD3" и генерированием сигнала активации Т-лимфоцитов. CD3 $\gamma$  (гамма), CD35 (дельта) и CD3 $\epsilon$  (эпсилон)-цепи представляют собой белки надсемейства иммуноглобулинов, тесно связанные с клеточной поверхностью и содержащие единственный внеклеточный иммуноглобулиновый домен. Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат единственный консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или, кратко, ITAM, необходимый для сигнальной активности TCR. Молекула CD3-эпсилон представляет собой полипептид, который в организме человека кодируется геном CD3 $\epsilon$ , находящимся на 11 хромосоме. Наиболее предпочтительный эпитоп CD3-эпсилон расположен в области 1-27 аминокислотных остатков внеклеточного домена CD3-эпсилон человека.

Переадресованный лизис клеток-мишеней за счет рекрутинга Т-клеток с помощью полиспецифического, по меньшей мере биспецифического конструктора антитела включает образование цитолитических синапсов и доставку перфорина и гранзимов. Активированные Т-клетки способны к последовательному лизису клеток-мишеней и не зависят от механизмов ускользания от иммунного ответа, препятствующих процессингу и представлению антигенного пептида, или клональной дифференцировки Т-клеток; см., например, WO 2007/042261.

Цитотоксичность, опосредованную биспецифическими конструкторами антител EGFRvIIIxCD3, можно измерить различными способами. См. пример 1. Эффекторные клетки могут представлять собой, например, стимулированные обогащенный CD8-положительные Т-клетки (человека) или нестимулированные мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) (человека). Если клетки-мишени происходят из организма макака или экспрессируют или трансфицированы EGFRvIII макака, эффекторные клетки также должны происходить из организма макака, например, линии Т-клеток макака, например, 4119LnPx. Клетки-мишени должны экспрессировать (по меньшей мере внеклеточный домен) EGFRvIII, например, EGFRvIII человека или макака. Клетки-мишени могут представлять собой линию клеток (например, CHO), стабильно или временно трансфицированных EGFRvIII, например, EGFRvIII человека или макака. В качестве альтернативы, клетки-мишени могут представлять собой линию EGFRvIII-положительных клеток, экспрессирующих этот антиген естественным образом, например, линию клеток глиобластомы человека U87 или DK-MG. Ожидается, что значения EC<sub>50</sub>, как правило, должны быть ниже при использовании линий клеток-мишеней, экспрессирующих повышенные уровни EGFRvIII на поверхности клеток. Соотношение эффекторных клеток и мишеней (Е:Т) обычно составляет приблизительно 10:1, но может меняться. Цитотоксическую активность биспецифических конструкторов антител EGFRvIIIxCD3 можно измерить в анализе высвобождения 51-хрома (время инкубации приблизительно 18 ч) или в анализе цитотоксичности на основе FACS (время инкубации приблизительно 48 ч). Кроме того, возможны модификации времени инкубации при анализе (цитотоксической реакции). Другие способы измерения цитотоксичности хорошо известны специалистам в данной области техники и включают анализы МТТ или МТS, анализы на основе АТФ, в том числе биолюминесцентный анализ, анализ сульфородамина В (SRB), анализ WST, клоногенный анализ и технологию ECIS.

Цитотоксическую активность, опосредованную биспецифическими конструкторами антител EGFRvIIIxCD3 согласно настоящему изобретению, предпочтительно измеряют в анализе цитотоксичности на основе клеток. Ее также можно измерять в анализе высвобождения 51-хрома. Она представлена значением EC<sub>50</sub>, соответствующим полумаксимальной эффективной концентрации (концентрации конструктора антитела, индуцирующей цитотоксический ответ, величина которого находится посередине между исходным уровнем и максимумом). Предпочтительно, значение EC<sub>50</sub> биспецифических конструкторов антител EGFRvIIIxCD3 составляет  $\leq 5000$  пМ или  $\leq 4000$  пМ, более предпочтительно  $\leq 3000$  пМ или  $\leq 2000$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 1000$  пМ или  $\leq 500$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 400$  пМ или  $\leq 300$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 200$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 100$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 50$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 20$  пМ или  $\leq 10$  пМ и наиболее предпочтительно  $\leq 5$  пМ.

Приведенные выше значения EC<sub>50</sub> можно измерять с помощью различных анализов. Специалисту известно, что можно ожидать снижения значения EC<sub>50</sub> при использовании стимулированных/обогащенных CD8+ Т-клеток в качестве эффекторных клеток по сравнению с нестимулированными МПК. Кроме того, можно ожидать снижения значения EC<sub>50</sub>, если клетки-мишени экспрессируют большое количество антигена-мишени по сравнению с низкой интенсивностью экспрессии мишени. Например, при использовании стимулированных/обогащенных CD8+ Т-клеток человека в качестве эффекторных клеток (и клеток, трансфицированных EGFRvIII, например, клеток CHO, или линии EGFRvIII-положительных клеток глиобластомы человека U87 или DK-MG в качестве клеток-мишеней), значение EC<sub>50</sub> биспецифического конструктора антитела EGFRvIIIxCD3 предпочтительно составляет  $\leq 1000$  пМ, более предпочтительно  $\leq 500$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 250$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 100$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 50$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 10$  пМ, и наиболее предпочтительно  $\leq 5$  пМ. При использовании МПК человека в качестве эффекторных клеток значение EC<sub>50</sub> биспецифического конструктора антитела EGFRvIIIxCD3 предпочтительно составляет  $\leq 5000$  пМ или  $\leq 4000$  пМ (в частности, если клетки-мишени

представляют собой EGFRVIII-положительные клетки линии глиобластомы человека U87 или DK-MG), более предпочтительно  $\leq 2000$  пМ (в частности, если клетки-мишени представляют собой клетки, трансфицированные EGFRVIII, например, клетки CHO), более предпочтительно  $\leq 1000$  пМ или  $\leq 500$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 200$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 150$  пМ, еще предпочтительнее  $< 100$  пМ и наиболее предпочтительно  $\leq 50$  пМ или менее. При использовании линии Т-клеток макака, например, LnPx4119, в качестве эффекторных клеток, и линии клеток, трансфицированных EGFRvIII макака, например, клеток CHO, в качестве линии клеток-мишеней, значение  $EC_{50}$  биспецифического конструктора антитела EGFRvIIIxCD3 предпочтительно составляет  $\leq 2000$  пМ или  $\leq 1500$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 1000$  пМ или  $\leq 500$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 300$  пМ или  $\leq 250$  пМ, еще предпочтительнее  $\leq 100$  пМ, и наиболее предпочтительно  $\leq 50$  пМ.

Предпочтительно, биспецифические конструкторы антител EGFRVIIIxCD3 согласно настоящему изобретению не индуцируют/опосредуют лизис или по существу не индуцируют/опосредуют лизис EGFRVIII-отрицательных клеток, например, клеток CHO. Термин "не индуцируют лизис", "по существу не индуцируют лизис", "не опосредуют лизис" или "по существу не опосредуют лизис" означает, что конструктор антитела согласно настоящему изобретению не индуцирует или не опосредует лизис более чем 30%, желательно не более чем 20%, более предпочтительно не более 10%, особенно предпочтительно не более чем 9, 8, 7, 6 или 5% EGFRVIII-отрицательных клеток, причем лизис EGFRVIII-положительных клеток линии глиобластомы человека U87 или DK-MG (см. выше) принимают за 100%. Это обычно используют для концентраций конструктора антитела до 500 нМ. Специалисту известно, как измерять лизис клеток простыми средствами. Кроме того, в настоящем описании приведены конкретные инструкции по измерению лизиса клеток.

Различия в цитотоксической активности мономерной и димерной изоформ отдельных биспецифических конструкторов антител EGFRVIIIxCD3 называют "разрывом эффективности". Этот разрыв эффективности можно, например, вычислить как отношение значениями  $EC_{50}$  мономерной и димерной форм молекулы, см. пример 1.8. Разрывы эффективности биспецифических конструкторов антител EGFRVIIIxCD3 согласно настоящему изобретению предпочтительно составляют  $\leq 5$ , более предпочтительно  $\leq 4$ , еще предпочтительнее  $\leq 3$ , еще предпочтительнее  $\leq 2$ , еще предпочтительнее  $\leq 1$  и наиболее предпочтительно  $\leq 0,3$ .

Первый или второй (или любой другой) связывающий домен конструктора антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно обладают перекрестной видовой специфичностью по отношению к членам отряда приматов. CD3-связывающие домены с перекрестной видовой специфичностью описаны, например, в заявке WO 2008/119567. Согласно одному варианту реализации, первый или второй связывающий домен, помимо связывания с EGFRVIII человека и CD3 человека, соответственно, должен также связываться с EGFRVIII/CD3 приматов, включая (но не ограничиваясь) широконосых обезьян (например, *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* или *Saimiri sciureus*), мартышковых (например, павианов и макаков), гиббонов, орангутангов и представителей подсемейства *homininae*, не являющихся человеком. Предполагается, что первый связывающий домен конструктора антитела согласно настоящему изобретению, связывающий EGFRVIII человека на поверхности клетки-мишени, также связывается по меньшей мере с EGFRVIII макака, и/или второй связывающий домен, связывающий CD3 человека на поверхности Т-клеток, также связывается по меньшей мере с CD3 макака. Предпочтительным макаком является *Macaca fascicularis*. Кроме того, допускается использование *Macaca mulatta* (резуса).

В одном аспекте настоящего изобретения первый связывающий домен связывается с EGFRVIII человека и, кроме того, с EGFRVIII макака, например, EGFRVIII *Macaca fascicularis*, и более предпочтительно, с EGFRVIII макака, экспрессируемым на поверхности клеток макака. Предпочтительный EGFRVIII *Macaca fascicularis* представлен в SEQ ID NO:234. Аффинность первого связывающего домена по отношению к EGFRVIII макака предпочтительно составляет  $\leq 15$  нМ, более предпочтительно  $\leq 10$  нМ, еще предпочтительнее  $\leq 5$  нМ, еще предпочтительнее  $\leq 1$  нМ, еще предпочтительнее  $\leq 0,5$  нМ, еще предпочтительнее  $\leq 0,1$  нМ, и наиболее предпочтительно  $\leq 0,05$  нМ или даже  $\leq 0,01$  нМ.

Предпочтительно разрыв аффинности конструкторов антител согласно настоящему изобретению при связывании EGFRVIII макака по сравнению с EGFRVIII человека [та EGFRVIII: hu EGFRVIII] (согласно, например, анализу *BiaCore* или Скэтчарда) составляет  $< 100$ , предпочтительно  $< 20$ , более предпочтительно  $< 15$ , еще предпочтительнее  $< 10$ , еще предпочтительнее  $< 8$ , еще предпочтительнее  $< 6$  и наиболее предпочтительно  $< 2$ . Предпочтительные диапазоны разрыва аффинности конструкторов антитела согласно настоящему изобретению при связывании EGFRVIII макака по сравнению с EGFRVIII человека составляют от 0,1 до 20, более предпочтительно от 0,2 до 10, еще предпочтительнее от 0,3 до 6, еще предпочтительнее от 0,5 до 3 или от 0,5 до 2,5 и наиболее предпочтительно от 0,5 до 2 или от 0,6 до 2.

В одном варианте реализации конструктора антитела согласно настоящему изобретению второй связывающий домен связывается с CD3-эпсилон человека и CD3-эпсилон *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* или *Saimiri sciureus*. Предпочтительно, второй связывающий домен связывается с внеклеточным эпитопом этих CD3-эпсилон цепей. Кроме того, допускается связывание второго связывающего домена с внеклеточным эпитопом CD3-эпсилон цепей человека и *Macaca*. Наиболее предпочтительный эпитоп CD3-

эпсилон расположен в области 1-27 аминокислотных остатков внеклеточного домена CD3-эпсилон человека. Конкретнее, данный эпитоп содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность Gln-Asp-Gly-Asn-Glu. *Callithrix jacchus* и *Saguinus oedipus* являются широконосими обезьянами, принадлежащими к семейству Callitrichidae, в то время как *Saimiri sciureus* является широконосой обезьяной, принадлежащей к семейству Cebidae.

Для конструктора антитела согласно настоящему изобретению особенно предпочтительно, чтобы второй связывающий домен, связывающийся с CD3 человека на поверхности Т-клеток, содержал VL-область, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из:

(a) CDR-L1, показанного в SEQ ID NO:27 из заявки WO 2008/119567, CDR-L2, показанного в SEQ ID NO:28 из заявки WO 2008/119567 и CDR-L3, показанного в SEQ ID NO:29 из заявки WO 2008/119567;

(b) CDR-L1, показанного в SEQ ID NO:117 из заявки WO 2008/119567, CDR-L2, показанного в SEQ ID NO:118 из заявки WO 2008/119567 и CDR-L3, показанного в SEQ ID NO:119 из заявки WO 2008/119567; и

(c) CDR-L1, показанного в SEQ ID NO:153 из заявки WO 2008/119567, CDR-L2, показанного в SEQ ID NO:154 из заявки WO 2008/119567 и CDR-L3, показанного в SEQ ID NO:155 из заявки WO 2008/119567.

В альтернативном предпочтительном варианте реализации конструктора антитела согласно настоящему изобретению второй связывающий домен, связывающийся с CD3 человека на поверхности Т-клеток, содержит VH-область, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, выбранные из:

(a) CDR-H1, показанного в SEQ ID NO:12 из заявки WO 2008/119567, CDR-H2, показанного в SEQ ID NO:13 из заявки WO 2008/119567 и CDR-H3, показанного в SEQ ID NO:14 из заявки WO 2008/119567;

(b) CDR-H1, показанного в SEQ ID NO:30 из заявки WO 2008/119567, CDR-H2, показанного в SEQ ID NO:31 из заявки WO 2008/119567 и CDR-H3, показанного в SEQ ID NO:32 из заявки WO 2008/119567;

(c) CDR-H1, показанного в SEQ ID NO:48 из заявки WO 2008/119567, CDR-H2, показанного в SEQ ID NO:49 из заявки WO 2008/119567 и CDR-H3, показанного в SEQ ID NO:50 из заявки WO 2008/119567;

(d) CDR-H1, показанного в SEQ ID NO:66 из заявки WO 2008/119567, CDR-H2, показанного в SEQ ID NO:67 из заявки WO 2008/119567 и CDR-H3, показанного в SEQ ID NO:68 из заявки WO 2008/119567;

(e) CDR-H1, показанного в SEQ ID NO:84 из заявки WO 2008/119567, CDR-H2, показанного в SEQ ID NO:85 из заявки WO 2008/119567 и CDR-H3, показанного в SEQ ID NO:86 из заявки WO 2008/119567;

(f) CDR-H1, показанного в SEQ ID NO:102 из заявки WO 2008/119567, CDR-H2, показанного в SEQ ID NO:103 из заявки WO 2008/119567 и CDR-H3, показанного в SEQ ID NO:104 из заявки WO 2008/119567;

(g) CDR-H1, показанного в SEQ ID NO:120 из заявки WO 2008/119567, CDR-H2, показанного в SEQ ID NO:121 из заявки WO 2008/119567 и CDR-H3, показанного в SEQ ID NO:122 из заявки WO 2008/119567;

(h) CDR-H1, показанного в SEQ ID NO:138 из заявки WO 2008/119567, CDR-H2, показанного в SEQ ID NO:139 из заявки WO 2008/119567 и CDR-H3, показанный в SEQ ID NO:140 из заявки WO 2008/119567;

(i) CDR-H1, показанного в SEQ ID NO:156 из заявки WO 2008/119567, CDR-H2, показанного в SEQ ID NO:157 из заявки WO 2008/119567 и CDR-H3, показанного в SEQ ID NO:158 из заявки WO 2008/119567; и

(j) CDR-H1, показанного в SEQ ID NO:174 из заявки WO 2008/119567, CDR-H2, показанного в SEQ ID NO:175 из заявки WO 2008/119567 и CDR-H3, показанного в SEQ ID NO:176 из заявки WO 2008/119567.

Для конструктора антитела согласно настоящему изобретению, кроме того, предпочтительно, чтобы второй связывающий домен, связывающийся с CD3 человека на поверхности Т-клеток, содержал VL-область, выбранную из группы, состоящей из VL-области, показанной в SEQ ID NO:18; SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:99 и SEQ ID NO:102 (см. также SEQ ID NO:35, 39, 125, 129, 161 или 165 из заявки WO 2008/119567).

В альтернативном случае предпочтительно, чтобы второй связывающий домен, связывающийся с CD3 человека на поверхности Т-клеток, содержал VH-область, выбранную из группы, состоящей из VH-области, показанной в SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:98 и SEQ ID NO:101 (см. также SEQ ID NO:15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 или 181 из заявки WO 2008/119567).

В более предпочтительном случае конструктор антитела согласно настоящему изобретению характеризуется тем, что второй связывающий домен, связывающийся с CD3 человека на поверхности Т-клеток, содержит VL-область и VH-область, выбранные из группы, состоящей из:

(a) VL-области, показанной в SEQ ID NO:17 или 21 из заявки WO 2008/119567, и VH-области, показанной в SEQ ID NO:15 или 19 из заявки WO 2008/119567;

(b) VL-область согласно SEQ ID NO:35 или 39 из заявки WO 2008/119567, и VH-области, показан-

ной в SEQ ID NO:33 или 37 из заявки WO 2008/119567;

(c) VL-области, показанной в SEQ ID NO:53 или 57 из заявки WO 2008/119567, и VH-области, показанной в SEQ ID NO:51 или 55 из заявки WO 2008/119567;

(d) VL- области, показанной в SEQ ID NO:71 или 75 из заявки WO 2008/119567, и VH-области, показанной в SEQ ID NO:69 или 73 из заявки WO 2008/119567;

(e) VL- области, показанной в SEQ ID NO:89 или 93 из заявки WO 2008/119567, и VH-области, показанной в SEQ ID NO:87 или 91 из заявки WO 2008/119567;

(f) VL- области, показанной в SEQ ID NO:107 или 111 из заявки WO 2008/119567, и VH-области, показанной в SEQ ID NO:105 или 109 из заявки WO 2 008/119567;

(g) VL- области, показанной в SEQ ID NO:125 или 129 из заявки WO 2008/119567, и VH-области, показанной в SEQ ID NO:123 или 127 из заявки WO 2008/119567;

(h) VL- области, показанной в SEQ ID NO:143 или 147 из заявки WO 2008/119567, и VH-области, показанной в SEQ ID NO:141 или 145 из заявки WO 2 008/119567;

(i) VL- области, показанной в SEQ ID NO:161 или 165 из заявки WO 2008/119567, и VH-области, показанной в SEQ ID NO:158 из заявки WO 2008/119567; и

(j) VL- области, показанной в SEQ ID NO:179 или 183 из заявки WO 2008/119567, и VH-области, показанной в SEQ ID NO:177 или 181 из заявки WO 2008/119567.

В связи с конструктором антитела согласно настоящему изобретению, кроме того, предпочтительно, чтобы второй связывающий домен, связывающийся с CD3 человека на поверхности Т-клеток, содержал VL-область, показанную в SEQ ID NO:102, и VH-область, показанную в SEQ ID NO:101.

В соответствии с предпочтительным вариантом реализации конструктора антитела согласно настоящему изобретению, связывающие домены и, в частности, второй связывающий домен (связывающий CD3 человека на поверхности Т-клеток) представлены в следующем формате: Пары VH- и VL-областей представлены в формате одноцепочечного антитела (scFv). VH- и VL-области расположены в порядке VH-VL или VL-VH. Предпочтительно, чтобы VH-область располагалась с N-стороны от линкерной последовательности, а VL-область располагалась с C-стороны от линкерной последовательности.

Предпочтительный вариант реализации вышеописанного конструктора антитела согласно настоящему изобретению характеризуется тем, что второй связывающий домен, связывающийся с CD3 человека на поверхности Т-клеток, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:100 и SEQ ID NO:103 (см. также SEQ ID NO:23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 или 187 из заявки WO 2008/119567).

Кроме того, допускается, что конструктор антитела согласно настоящему изобретению обладает, в дополнение к функции связывания с молекулами-мишенями EGFRVIII и CD3, дополнительной функцией. В этом формате конструктор антитела представляет собой трифункциональный или мультифункциональный конструктор антитела за счет адресного воздействия на клетки-мишени посредством связывания с EGFRVIII, опосредования цитотоксической активности Т-клеток за счет связывания CD3 и наличия дополнительной функции, например, полнофункционального константного Fc-домена, опосредующего антитело-зависимую клеточную цитотоксичность посредством рекрутинга эффекторных клеток, например, NK-клеток, метки (флуоресцентной и т.д.), терапевтического агента, например, токсина или радионуклида, и/или средства для увеличения периода полужизни в сыворотке и т.д.

Примеры средств для увеличения периода полужизни конструкторов антител согласно настоящему изобретению в сыворотке включают пептиды, белки или домены белков, объединенные в составе кибридного белка или иным образом присоединенные к конструкторам антител. Группа пептидов, белков или доменов белков включает пептиды, связывающиеся с другими белками с предпочтительным фармакокинетическим профилем в организме человека, например, сывороточным альбумином (см. WO 2009/127691). Альтернативная концепция таких пептидов, увеличивающих период полужизни, включает пептиды, связывающиеся с неонатальным Fc-рецептором (FcRn, см. WO 2007/098420), которые также можно использовать в конструкторах согласно настоящему изобретению. Концепция присоединения крупных доменов белков или полноразмерных белков включает, например, присоединение человеческого сывороточного альбумина, вариантов или мутантов человеческого сывороточного альбумина (см. WO 2011/051489, WO 2012/059486, WO 2012/150319, WO 2013/135896, WO 2014/072481 WO 2013/075066) или их доменов, а также присоединение константной области иммуноглобулинов (Fc-доменов) и ее вариантов. Такие варианты Fc-доменов можно оптимизировать/модифицировать с целью получения желательного сопряжения димеров или мультимеров, устранения связывания с Fc-рецептором (например, Fcγ-рецептором) или для других целей. Дополнительная концепция, используемая в данной области техники для увеличения периода полужизни небольших белковых соединений в организме человека, представляет собой ПЭГилирование этих соединений, например, конструкторов антител согласно настоящему изобретению.

В предпочтительном варианте реализации конструктора антитела согласно настоящему изобретению описывается следующим образом:

(a) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:



SEQ ID NO:1-9; и

полипептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID

NO:37, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:100 и SEQ ID NO:103; и

полипептид с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:144; и

полипептид с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:145;

(g) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:159; и

полипептид с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:146; и

полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:100 и SEQ ID NO:103; и

полипептид с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:147;

(h) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:159;

полипептид с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:148; и

полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:100 и SEQ ID NO:103; и

полипептид с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:149; или

(i) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:159;

пептидный линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-9; и

полипептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:100 и SEQ ID NO:103; и

полипептид с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO:150;

(j) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:159;

пептидный линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-9; и

полипептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:100 и SEQ ID NO:103;

пептидный линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 4, 5, 6, 8 и 9; и

третий домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:181-188.

Как описано выше, несколько предпочтительных конструкторов антител согласно настоящему изобретению модифицировали путем объединения с другой молекулой, например, альбумином или вариантами альбумина, специалисту должно быть известно, что если эти гибридные конструкторы характеризуются определенными свойствами, в частности, аффинностью к мишени или цитотоксической активностью, то можно ожидать наличия близких (или лучших) свойств у аналогичных гибридных конструкторов или немодифицированных биспецифических конструкторов антител.

Например, если биспецифический конструктор антитела, объединенный с альбумином, обладает измеримой или желательной цитотоксической активностью или аффинностью к мишени, то можно ожидать, что у конструктора без альбумина должна наблюдаться такая же/аналогичная или даже более высокая цитотоксическая активность/аффинность к мишени.

Согласно еще одному предпочтительному варианту реализации, биспецифический конструктор антитела согласно настоящему изобретению содержит (в дополнение к двум связывающим доменам) третий домен, содержащий два полипептидных мономера, каждый из которых содержит шарнир, CH2- и CH3-домен, причем два указанных полипептида (или полипептидных мономера) объединены друг с другом посредством пептидного линкера. Предпочтительно, указанный третий домен содержит от N-конца к C-концу: шарнир-CH2-CH3-линкер-шарнир-CH2-CH3. Предпочтительные аминокислотные последовательности указанного третьего домена представлены в SEQ ID NO:181-188. Каждый из двух указанных полипептидных мономеров предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:173-180, или последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную этим последовательностям. В еще одном предпочтительном варианте реализации первый и второй

связывающие домены биспецифического конструктора антитела согласно настоящему изобретению объединены с третьим доменом посредством пептидного линкера, например, выбранного из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

В соответствии с настоящим изобретением, "шарнир" представляет собой шарнирную область IgG. Эту область можно определить по аналогии с помощью нумерации Kabat, см. положения 223-243 по Kabat. В соответствии с вышеизложенным, минимальное требование к "шарниру" представляет собой аминокислотные остатки, соответствующие последовательности IgG<sub>1</sub> от D231 до P243 согласно нумерации Kabat. Термины CH2 и CH3 относятся к константным областям 2 и 3 тяжелой цепи иммуноглобулина. Эти области также легко определить по аналогии с помощью нумерации Kabat, см. положения 244-360 по Kabat для CH2 и положения 361-478 по Kabat для CH3. Следует понимать, что между иммуноглобулинами существует некоторая изменчивость в отношении Fc-области IgG<sub>1</sub>, Fc-области IgG<sub>2</sub>, Fc-области IgG<sub>3</sub>, Fc-области IgG<sub>4</sub>, Fc-области IgM, Fc-области IgA, Fc-области IgD и Fc-области IgE (см., например, Padlan, *Molecular Immunology*, 31(3), 169-217 (1993)). Термин "Fc-мономер" относится к последним двум константным областям тяжелой цепи IgA, IgD и IgG и последним трем константным областям тяжелой цепи IgE и IgM. Fc-мономер также может содержать гибкий шарнир с N-стороны от этих доменов. Для IgA и IgM Fc-мономер может содержать J-цепь. Для IgG Fc-фрагмент содержит иммуноглобулиновые домены CH2 и CH3 и шарнир между первыми двумя доменами и CH2. Хотя границы Fc-фрагмента иммуноглобулина могут меняться, например, для IgG человека определение Fc-фрагмента тяжелой цепи, содержащего функциональный шарнир, CH2- и CH3-домены может включать, например, остатки от D231 (шарнирный домен) до P476 (C-конец CH3-домена), или от D231 до L476, соответственно, для IgG<sub>4</sub>, при использовании нумерации по Kabat.

Соответственно, конструктор антитела согласно настоящему изобретению может содержать, от N-конца к C-концу:

- (a) первый связывающий домен;
- (b) пептидный линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-9;
- (c) второй связывающий домен;
- (d) пептидный линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 4, 5, 6, 8 и 9;
- (e) первый полипептидный мономер третьего домена (содержащий шарнир, CH2- и CH3-домен);
- (f) пептидный линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:192, 193, 194 и 195; и
- (g) второй полипептидный мономер третьего домена (содержащий шарнир, CH2- и CH3-домен).

Кроме того, предпочтительный конструктор антитела согласно настоящему изобретению содержит от N-конца к C-концу:

- первый связывающий домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:159;
- пептидный линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-9;
- второй связывающий домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:100 и SEQ ID NO:103 (см. также SEQ ID NO:23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 или 187 из заявки WO 2008/119567);
- пептидный линкер с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, 2, 4, 5, 6, 8 и 9; и
- третий домен с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:181-188.

Соответственно, в предпочтительном варианте реализации конструктор антитела согласно настоящему изобретению содержит или состоит из полипептида, показанного в SEQ ID NO:189 или 190.

В одном варианте реализации конструктор антитела согласно настоящему изобретению содержит или состоит из полипептида, показанного в SEQ ID NO:160.

Ковалентные модификации конструкторов антитела также входят в область настоящего изобретения и, как правило, но не всегда, выполняются после трансляции. Например, другие виды ковалентных модификаций конструктора антитела вносят в молекулу путем взаимодействия специфических аминокислотных остатков конструктора антитела с органическим модифицирующим агентом, способным реагировать с выбранными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками.

Цистеинильные остатки наиболее часто подвергаются взаимодействию с  $\alpha$ -галоацетатами (и соответствующими аминами), например, хлоруксусной кислотой или хлорацетамидом, получая карбоксиметильные или карбоксиамидометильные производные.

Цистеинильные остатки также модифицируют реакцией с бромтрифторацетоном,  $\alpha$ -бром- $\beta$ -(5-

имидозоил) пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлорртутьбензоатом, 2-хлорртуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-оксадиазолом.

Гистидиловые остатки модифицируют реакцией с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, так как этот агент является относительно специфичным к боковой цепи гистидина. Кроме того, можно использовать пара-бромфенацилбромид; реакцию предпочтительно осуществляют в 0,1 М какодилате натрия при pH 6,0. Лизинильные и N-концевые остатки взаимодействуют с янтарным или другими ангидридами карбоновых кислот. Модификация с применением указанных агентов меняет заряд лизинильных остатков на противоположный. Другие подходящие реагенты для модификации альфа-аминосодержащих остатков включают имидоэфиры, например, метилпиколинимидат, пиридоксальфосфат, пиридоксаль, хлорборгидрид, тринитробензолсульфовую кислоту, 0-метилизочевину, 2,4-пентандион, и реакцию с глиоксалатом, катализируемую трансаминазой.

Аргинильные остатки модифицируют посредством взаимодействия с одним или несколькими щелочными реагентами, включая фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Для модификации остатков аргинина необходимо, чтобы реакция осуществлялась в щелочных условиях из-за высокого рКа функциональной группы гуанидина. Кроме того, указанные реагенты могут взаимодействовать с группами лизина, а также с epsilon-аминогруппой аргинина.

Можно осуществить специфическую модификацию остатков тирозина, причем особый интерес представляет внедрение спектральных меток в остатки тирозина путем реакции с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометаном. Чаще всего для образования O-ацетилированных разновидностей и 3-нитропроизводных тирозина используют N-ацетилимидазол и тетранитрометан, соответственно. Тирозильные остатки иодируют с

применением  $^{125}\text{I}$  или  $^{131}\text{I}$  с целью получения меченых белков для использования в радиоиммуноанализе, для чего подходит вышеописанный способ с применением хлорамина T.

Карбоксильные боковые группы (аспартила или глутамила) селективно модифицируют за счет взаимодействия с карбодиимидами ( $\text{R}'\text{-N}=\text{C}=\text{N--R}'$ ), где R и R' необязательно представляют собой различные алкильные группы, например, 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азонил-4,4-диметилпентил)карбодиимид. Кроме того, аспартильные и глутамильные остатки преобразовывают в аспарагинильные и глутаминильные остатком путем взаимодействия с ионами аммония.

Модификация бифункциональными агентами пригодна для перекрестного связывания конструкторов антитела согласно настоящему изобретению с водонерастворимым веществом носителя или поверхностью для использования в различных способах. Распространенные перекрестно связывающие агенты включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, эфиры N-гидроксисукцинимиды, например, эфиры с 4-азидсалициловой кислотой, гомобифункциональные имидоэфиры, включая дисукцинимидильные эфиры, например, 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионат) и бифункциональные малеимида, например, бис-N-малеимид-1,8-октан. Такие модификаторы, как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропиоимидат, позволяют получить фотоактивируемые промежуточные соединения, способные образовывать перекрестные связи в присутствии света. В альтернативном варианте для иммобилизации белка применяют водонерастворимые носители, например, активируемые бромцианом углеводы и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США № 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537; и 4330440.

Глутаминильные и аспарагинильные остатки часто дезамидируют до соответствующих глутамильных и аспартильных остатков, соответственно. В альтернативном варианте эти остатки дезамидируют в умеренно кислых условиях. Любая форма этих остатков входит в рамки настоящего изобретения.

Другие модификации включают гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильных или треонильных остатков, метилирование альфа-аминогрупп лизина, аргинина и боковых цепей гистидина (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации конструкторов антител, входящий в рамки настоящего изобретения, включает модификацию картины гликозилирования белка. Как известно в данной области техники, профили гликозилирования могут зависеть как от последовательности белка (например, присутствия или отсутствия конкретных аминокислотных остатков гликозилирования, обсуждаемых ниже), так и от клетки-хозяина или организма-хозяина, в которых продуцируется белок. Конкретные системы экспрессии рассматриваются ниже.

Гликозилирование полипептидов, как правило, бывает N-связанным или O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводной группы к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X является любой аминокислотой, за исключением пролина, представляют последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного компонента к боковой цепи аспарагина. Соответственно, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в составе полипептида создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из

углеводов - N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы - к гидроксиаминокислоте, чаще всего - серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксиллизин.

Добавление сайта гликозилирования в конструктор антитела удобно осуществлять путем модификации аминокислотной последовательности, таким образом, чтобы она содержала одну или более из вышеописанных трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Модификацию также можно осуществить путем добавления или замены одного или более остатков серина или треонина в исходной последовательности (для сайтов O-связанного гликозилирования). Для простоты аминокислотную последовательность конструктора антитела предпочтительно модифицируют на уровне ДНК, в частности, мутируя ДНК, кодирующую полипептид, по предварительно выбранным основаниям так, чтобы полученные кодоны транслировались в желательные аминокислоты.

Другим способом повышения количества углеводных групп в конструкторе антитела является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к белку. Эти процедуры обеспечивают преимущество, так как они не требуют продукции белка в клетке-хозяине, которая обладает способностью осуществлять N- или O-связанное гликозилирование. В зависимости от используемого способа присоединения, углевод(ы) можно присоединять к (a) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, например, цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, например, серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, например, фенилаланину, тирозину или триптофану, или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO 87/05330 и статье Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., стр. 259-306.

Удаление углеводных групп, присутствующих на исходном конструкторе антитела, можно выполнить с применением химических или ферментативных средств. Для химического дегликозилирования необходимо подвергнуть белок действию соединения трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Эта обработка приводит к отщеплению большинства или всех углеводов, кроме связующего углевода (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), при этом полипептид остается интактным. Химическое дегликозилирование описано в Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 и в статье Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118: 131. Ферментативного отщепления углеводных остатков от полипептидов можно достичь за счет использования ряда эндо- и экзогликозидаз, как описано в статье Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138: 350. Гликозилирование в потенциальных сайтах гликозилирования можно предотвратить, используя соединение туникамицин, как описано в статье Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 3105. Туникамицин блокирует образование связей белок-N-гликозид.

В настоящем документе также рассмотрено применение и других модификаций конструктора антитела. Например, еще один тип ковалентной модификации конструктора антитела включает присоединение к конструктору антитела различных небелковых полимеров, включая различные полиолы, например, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, полиоксиалкилены, или сополимеров полиэтиленгликоля и пролипропиленгликоля, но не ограничиваясь ими, способом, приведенным в патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Кроме того, как известно в данной области техники, аминокислотные замены можно внести в различные положения в пределах конструктора антитела, например, с целью облегчения добавления полимеров, например, ПЭГ.

В некоторых вариантах реализации изобретения ковалентная модификация конструкторов антител согласно настоящему изобретению включает добавление одной или более меток. Группу, используемую в качестве метки, можно присоединить к конструктору антитела при помощи спейсерных последовательностей различной длины для снижения потенциального стерического несоответствия. В данной области техники известны различные способы мечения белков, которые можно применять для осуществления настоящего изобретения. Термин "метка" или "группа, используемая в качестве метки" означает любую обнаружимую метку. В общем случае метки делятся на различные классы в зависимости от анализа, используемого для их обнаружения - следующие примеры включают:

a) изотопные метки, которые могут представлять собой радиоактивные или тяжелые изотопы, например, радиоизотопы и радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ );

b) магнитные метки (например, магнитные частицы);

c) группы, обладающие окислительно-восстановительной активностью;

d) оптические красители (включая хромофоры, люминофоры и флуорофоры, но не ограничиваясь ими), например, флуоресцентные группы (например, FITS, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов), хемилюминесцентные группы и флуорофоры, которые могут быть как "низкомолекулярными" флуорофорами, так и белковыми флуорофорами,

e) ферментативные группы (например, пероксидаза хрена,  $\beta$ -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза);

f) биотинилированные группы;

g) предопределенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновых молний, сайты связывания вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки и т.д.), но не ограничиваются ими.

Под термином "флуоресцентная метка" подразумевают любую молекулу, которую можно обнаружить за счет присущих ей флуоресцентных свойств. Подходящие флуоресцентные метки включают флу-

оресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, красители Lucifer Yellow, Cascade BlueJ, Texas Red, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon green, красители Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow и R-фикоэритрин (ФЭ) (Molecular Probes, Юджин, штат Орегон, США), FITC, родамин и Texas Red (Pierce, Рокфорд, штат Иллинойс, США), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Питсбург, штат Пенсильвания, США), но не ограничиваются ими. Подходящие оптические красители, включая флуорофоры, описаны в Molecular Probes Handbook, Richard P. Haugland.

Подходящие белковые флуоресцентные метки также включают зеленый флуоресцентный белок, включая ЗФБ Renilla, Ptilosarcus или Aequorea (Chalfie et al., 1994, Science 263: 802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., учетный номер в Genbank U55762), голубой флуоресцентный белок (ГФБ, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Монреаль, Квебек, Канада Н3Н 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24: 462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6: 178-182), усиленный желтый флуоресцентный белок (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), люциферазу (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150: 5408-5417),  $\beta$ -галактозидазу (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2603-2607) и Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, патенты США № 5292658; 5418155; 5683888; 5741668; 5777079; 5804387; 5874304; 5876995; 5925558), но не ограничиваются ими.

Домены лейциновых молний представляют собой пептиды, стимулирующие олигомеризацию белков, в которых они присутствуют. Лейциновые молнии были первоначально обнаружены в составе нескольких ДНК-связывающих белков (Landschulz et al., 1988, Science 240: 1759), и с тех пор обнаружены во множестве различных белков. Среди известных лейциновых молний присутствуют природные пептиды и их димеризующиеся или тримеризующиеся производные. Примеры доменов лейциновых молний, пригодные для получения растворимых олигомерных белков, описаны в заявке РСТ WO 94/10308; кроме того, лейциновая молния, полученная из белка D сурфактанта легких (SPD), описана в статье Норре et al., 1994, FEBS Letters 344: 191. Использование модифицированной лейциновой молнии, обеспечивающее стабильную тримеризацию гетерологичного белка, присоединенного к ней, описано в статье Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6: 267-78. В одном подходе рекомбинантные гибридные белки, содержащие фрагмент антитела против EGFRvIII или его производное, объединенный с пептидом лейциновой молнии, экспрессируют в подходящих клетках-хозяевах, и растворимые олигомерные фрагменты антител против EGFRvIII или образованные производные выделяют из супернатанта культуры.

Конструкт антитела согласно настоящему изобретению может также содержать дополнительные домены, например, используемые для выделения молекулы или связанные с адаптированным фармакокинетическим профилем молекулы. Домены, используемые для выделения конструкта антитела, можно выбрать из пептидных мотивов или вторично вводимых фрагментов, которые можно захватывать в соответствии со способом выделения, например, на выделительной колонке. Неограничивающие варианты реализации таких дополнительных доменов включают пептидные мотивы, известные как Мус-метку, НАТ-метку, НА-метку, ТАР-метку, GST-метку, хитин-связывающий домен (CBD-метку), мальтоза-связывающий белок (МВР-метку), Flag-метку, Strep-метку и его варианты (например, StrepII-метку) и His-метку. Все описанные в настоящем документе конструкты антител, характеризующиеся идентифицированными CDR, предпочтительно содержат домен His-метки, который обычно представляет собой повтор предпочтительно пяти и более предпочтительно - шести последовательных остатков His (гексагистидин) в аминокислотной последовательности молекулы. His-метку может быть расположена, например, на N- или C-конце конструкта антитела, и предпочтительно располагается на C-конце. В наиболее предпочтительном случае гексагистидиновую метку (НННННН) (SEQ ID NO:10) присоединен пептидной связью к C-концу конструкта антитела в соответствии с настоящим изобретением.

Первый связывающий домен конструкта антитела согласно настоящему изобретению связывается с EGFRvIII человека на поверхности клетки-мишени. Предпочтительная аминокислотная последовательность EGFRvIII человека представлена в последовательностях NO:231, 232 и 233. Соответственно, первый связывающий домен в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно связывается с EGFRvIII при его экспрессии естественно экспрессирующими клетками или линиями клеток и/или клетками или линиями клеток, трансформированных или (стабильно/временно) трансфицированных EGFRvIII. В предпочтительном варианте реализации первый связывающий домен также связывается с EGFRvIII при использовании EGFRvIII в качестве молекулы-"мишени" или "лиганда" в анализе связывания *in vitro*, например, ВIАcore или анализе Скэтчарда. "Клетка-мишень" может представлять собой любую прокариотическую или эукариотическую клетку, экспрессирующую EGFRvIII на своей поверхности; предпочтительно клетка-мишень представляет собой клетку, являющуюся частью организма человека или животного, например, клетку рака яичников, клетку рака поджелудочной железы, клетку мезотелиомы, клетку рака легких, клетку рака желудка и клетку трижды негативного рака молочной железы.

Аффинность первого связывающего домена по отношению к EGFRvIII человека предпочтительно составляет  $\leq 20$  нМ, более предпочтительно  $\leq 10$  нМ, еще предпочтительнее  $\leq 5$  нМ, еще предпочтительнее

$\leq 2$  нМ, еще предпочтительнее  $\leq 1$  нМ, еще предпочтительнее  $\leq 0,6$  нМ, еще предпочтительнее  $\leq 0,5$  нМ, и наиболее предпочтительно  $\leq 0,4$  нМ. Аффинность можно измерить, например, в ходе анализа ВІАcore или анализа Скэтчарда, например, как описано в примерах. Другие способы определения аффинности также хорошо известны специалистам в данной области; см., например, прилагаемые примеры.

Кроме того, рассмотрена модификация аминокислотных последовательностей конструкторов антител, описанных в настоящем документе. Например, может быть желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств конструктора антитела. Варианты аминокислотных последовательностей конструктора антитела получают путем внесения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую конструктор антитела, или путем пептидного синтеза. Все описанные ниже модификации аминокислотной последовательности должны приводить к получению конструктора антитела, сохраняющего желательную биологическую активность (связывание с EGFRvIII и CD3) немодифицированной исходной молекулы.

Термин "аминокислота" или "аминокислотный остаток" обычно относится к аминокислоте, соответствующей определению, принятому в данной области техники, например, аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из: аланина (Ala или A); аргинина (Arg или R); аспарагина (Asn или N); аспарагиновой кислоты (Asp или D); цистеина (Cys или C); глутамина (Gln или Q); глутаминовой кислоты (Glu или E); глицина (Gly или G); гистидина (His или H); изолейцина (Ile или I); лейцина (Leu или L); лизина (Lys или K); метионина (Met или M); фенилаланина (Phe или F); пролина (Pro или P); серина (Ser или S); треонина (Thr или T); триптофана (Trp или W); тирозина (Tyr или Y); и валина (Val или V), хотя при желании можно использовать модифицированные, синтетические или редкие аминокислоты. В общем случае аминокислоты можно классифицировать по наличию неполярной боковой цепи (например, Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); отрицательно заряженной боковой цепи (например, Asp, Glu); положительно заряженной боковой цепи (например, Arg, His, Lys); или незаряженной полярной боковой цепи (например, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp и Tyr).

Модификации аминокислот включают, например, делеции и/или инсерции и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях конструкторов антител. Для получения конечного конструктора можно внести любую комбинацию делеций, инсерций и замен при условии, что конечный конструктор обладает желательными характеристиками. Аминокислотные замены могут изменять посттрансляционные процессы конструкторов антител, например изменять количество или положение сайтов гликозилирования.

Например, в каждый CDR можно внести инсерцию или делецию 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот (конечно, в зависимости от его длины), а в каждый FR можно внести инсерцию или делецию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 25 аминокислот. Предпочтительно инсерции в аминокислотную последовательность включают N- и/или C-концевые гибриды длиной от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также инсерции одного или множества аминокислотных остатков внутри последовательности. Инсерционный вариант конструктора антитела согласно настоящему изобретению включает присоединение к N- или C-концу конструктора антитела фермента или полипептида, увеличивающего период полужизни конструктора антитела в сыворотке.

Сайты, представляющие наибольший интерес для заместительного мутагенеза, включают CDR тяжелой и/или легкой цепи, в частности, гипервариабельные области, однако также рассматриваются модификации FR тяжелой и/или легкой цепи. Замены предпочтительно являются консервативными заменами, описанными в настоящем документе. Предпочтительно, в CDR можно заменить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, а в каркасных областях (FR) можно заменить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 25 аминокислот в зависимости от длины CDR или FR. Например, если последовательность CDR охватывает 6 аминокислот, допускается замена одной, двух или трех из этих аминокислот. Аналогичным образом, если последовательность CDR охватывает 15 аминокислот, допускается замена одной, двух, трех, четырех, пяти или шести из этих аминокислот.

Подходящий способ для идентификации определенных остатков или областей конструкторов антител, которые являются предпочтительными положениями для мутагенеза, называется "аланин-сканирующим мутагенезом" и описан в статье Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989). Согласно этому способу идентифицируют остаток или группу остатков-мишеней в пределах конструктора антитела (например, заряженные остатки, например, arg, asp, his, lys и glu) и заменяют его нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (наиболее предпочтительно, аланином или полиаланином) с целью влияния на взаимодействие аминокислот с эпитопом.

Затем уточняют аминокислотные положения, демонстрирующие функциональную чувствительность к заменам, путем введения дальнейших или других вариантов в сайты замен. Таким образом, при заранее определенном сайте или области внедрения вариации аминокислотной последовательности сама природа мутации не должна быть predetermined. Например, для анализа или оптимизации производительности мутации в данном сайте можно выполнить сканирование аланином или случайный мутагенез кодона или области-мишени и скрининг оптимальной активности экспрессированных вариантов конструктора антитела. Хорошо известны способы внесения мутаций замены в заранее определенных сайтах

известной последовательности ДНК, например, мутагенез с помощью праймера M13 и ПЦР-мутагенеза. Скрининг мутантов осуществляют с помощью анализов активности связывания антигена, например, связывания EGFRVIII или CD3.

В общем случае, при замене аминокислот в одном или более или всех CDR тяжелой или легкой цепи предпочтительно, чтобы полученная "замещенная" последовательность была по меньшей мере на 60 и 65%, более предпочтительно на 70 или 75%, еще предпочтительнее на 80 или 85% и особенно предпочтительно на 90 или 95% идентична "исходной" последовательности CDR. Это означает, что степень идентичности CDR "замещенной" последовательности зависит от ее длины. Например, CDR, содержащая 5 аминокислот, предпочтительно на 80% идентична своей замещенной последовательности для замены по меньшей мере одной аминокислоты. Соответственно, CDR конструктора антитела могут характеризоваться различной степенью идентичности своим замещенным последовательностям, например, для CDRL1 она может составлять 80%, в то время как для CDRL3-90%.

Предпочтительные замены (или замещения) представляют собой консервативные замены. В то же время допускается любая замена (включая неконсервативную замену или одну или более из "типичных замен", перечисленных ниже в таблице 1) при условии, что конструктор антитела сохраняет свою способность к связыванию с EGFRVIII посредством первого связывающего домена и с CD3 или CD3-эпсилон посредством второго связывающего домена, и/или его CDR характеризуются идентичностью своей замещенной последовательности (по меньшей мере на 60 и 65%, более предпочтительно на 70 или 75%, еще предпочтительнее на 80 или 85% и особенно предпочтительно - на 90 или 95% идентичны "исходной" последовательности CDR).

Консервативные замены приведены в табл.1 под заголовком "предпочтительные замены". Если такая замена приводит к изменению биологической активности, то можно внести более значительные изменения, обозначенные как "типичные замены" в табл.1, или описанные ниже по отношению к классам аминокислот, и выполнить скрининг продуктов на предмет желательной характеристики.

Таблица 1. Аминокислотные замены

Исходный	Типичные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys, gln, asn	lys
Asn (N)	gln, his, asp, lys, arg	gln
Asp (D)	glu, asn	glu
Cys (C)	ser, ala	ser
Gln (Q)	asn, glu	asn
Glu (E)	asp, gln	asp
Gly (G)	Ala	ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe	leu
Leu (L)	норлейцин, ile, val, met, ala	ile
Lys (K)	arg, gln, asn	arg
Met (M)	leu, phe, ile	leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr, phe	tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala	leu

Существенные модификации биологических свойств конструктора антитела согласно настоящему изобретению осуществляют путем выбора замен, значительно отличающихся по действию на (а) структуру полипептидного каркаса в области замены, например, конформацию листа или спирали, (b) заряд или гидрофобность молекулы в сайте-мишени или (с) размер боковой цепи. Остатки естественного происхождения подразделяются на группы в зависимости от общих свойств боковых цепей: (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile; (2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr; (3) кислые: asp, glu; (4) основные: asn, gin, his, lys, arg; (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: gly, pro; и (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замены приводят к замене представителя одного из этих классов на представителя другого класса. Остатки цистеина, не вовлеченные в поддержание должной конформации конструктора антитела, также можно заменить, как правило, серином, для усиления устойчивости молекулы к окис-

лению и предотвращения нежелательного перекрестного сшивания. И наоборот, в антитело можно добавить цистеиновую(ые) связь(и) для улучшения его стабильности (в частности, когда антитело представляет собой фрагмент антитела, например, Fv-фрагмент).

В случае аминокислотных последовательностей идентичность и/или сходство последовательностей определяют, применяя стандартные способы, известные в данной области техники, включая алгоритм локальной идентичности последовательностей согласно Smith and Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, алгоритм выравнивания идентичности последовательности согласно Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443, метод поиска сходства согласно Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444, компьютеризированные реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программ Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, штат Висконсин, США), программу последовательности Best Fit, описанную Devereux et al., 1984, *Nucl. Acid Res.* 12: 387-395, предпочтительно используемую с установленными по умолчанию параметрами или методом осмотра, но не ограничиваясь этим. Предпочтительно процент идентичности рассчитывают при помощи FastDB на основе следующих параметров: штраф за несопадение 1; штраф за разрыв 1; штраф за размер разрыва 0,33; и штраф за соединение 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis, Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Примером подходящего алгоритма является PILEUP. PILEUP выполняет множественное выравнивание последовательностей из группы родственных последовательностей с применением прогрессивного попарного выравнивания. Также существует возможность построения дерева, показывающего кластеризующиеся взаимосвязи, используемые для создания выравнивания. PILEUP использует упрощение прогрессивного способа выравнивания Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35: 351-360; данный способ аналогичен способу, описанному в статье Higgins and Sharp, 1989, *CABIOS* 5: 151-153. Применяемые параметры PILEUP включают вес разрыва по умолчанию 3,00, вес длины разрыва по умолчанию 0,10 и взвешенные концевые разрывы.

Другим примером подходящего алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в: Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410; Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402; и Karin et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5873-5787. Особенно подходящей программой BLAST является программа WU-BLAST-2, полученная на основании статьи Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology* 266: 460-480. WU-BLAST-2 использует несколько параметров поиска, большинство из которых настроены по умолчанию. Регулируемые параметры настроены на следующие значения: длина перекрытия=1, доля перекрытия=0,125, пороговая длина сегмента (T) = $\Pi$ . Параметры HSP S и HSP S2 являются динамическими величинами и устанавливаются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, в которой проводится поиск представляющей интерес последовательности; при этом данные величины можно корректировать для повышения чувствительности.

Дополнительным применяемым алгоритмом является gapped BLAST, описанный в статье Altschul et al., 1993, *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402. Gapped BLAST использует матрицу весовых оценок замен BLOSUM-62; пороговый параметр T установлен на 9; способ двух совпадений для запуска продолжений без разрывов, затраты на длину разрыва к стоимости  $10+k$ ; параметр  $X_u$  установлен на 16, а  $X_g$  - на 40 на этапе поиска по базе данных и на 67 на выходном этапе алгоритмов. Выравнивание с разрывами запускается при оценке, соответствующей приблизительно 22 битам.

В общем случае гомология, сходство или идентичность аминокислотной последовательности между отдельными вариантами CDR составляет по меньшей мере 60% по отношению к проиллюстрированным в данном документе последовательностям и, как правило, они предпочтительно характеризуются возрастающей гомологией или идентичностью, составляющей по меньшей мере 65 или 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75% или 80%, еще предпочтительнее - по меньшей мере 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% и по существу 100%. Аналогично, "процентная (%) идентичность нуклеотидной последовательности" по отношению к нуклеотидной последовательности связывающих белков, описанных в настоящем документе, представляет собой процентную долю нуклеотидных остатков в кандидатной последовательности,

которые идентичны нуклеотидным остаткам в кодирующей последовательности конструкта антитела. В конкретном способе используют модуль BLASTN WU-BLAST-2 с установленными по умолчанию параметрами, с длиной перекрытия и долей перекрытия, установленными на 1 и 0,125, соответственно.

В общем случае гомология, сходство или идентичность нуклеотидной последовательности между нуклеотидными

последовательностями, кодирующими отдельные варианты CDR, и нуклеотидными последовательностями, описанными в настоящем документе, составляет по меньшей мере 60%, и в более типичном случае они предпочтительно характеризуются возрастающей гомологией или идентичностью, составляющей по меньшей мере 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% и, по существу, 100%. Таким образом, "вариантная CDR" представляет собой область с указанной гомологией, сходством или идентичностью исходной CDR согласно настоящему изобретению и об-

ладает биологической функцией, включающей по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или 99% специфичность и/или активность по сравнению с исходной CDR, но не ограничивающейся этим.

В одном варианте реализации процентная идентичность конструкторов антител согласно настоящему изобретению эмбриональным последовательностям человека составляет  $\geq 70\%$  или  $\geq 75\%$ , более предпочтительно  $\geq 80\%$  или  $\geq 85\%$ , еще предпочтительнее  $\geq 90\%$  и наиболее предпочтительно  $\geq 91\%$ ,  $\geq 92\%$ ,  $\geq 93\%$ ,  $\geq 94\%$ ,  $\geq 95\%$  или даже  $\geq 96\%$ . Идентичность по отношению к продуктам эмбриональных генов антител человека считается важной особенностью для снижения риска возникновения у пациента иммунного ответа против терапевтических белков во время лечения. Hwang & Foote ("Immunogenicity of engineered antibodies"; Methods 36 (2005) 3-10) демонстрируют, что уменьшение фрагментов нечеловеческого происхождения в составе конструкторов терапевтических антител приводит к снижению риска индукции синтеза антител против лекарственного вещества у пациентов во время лечения. При сравнении исчерпывающего количества терапевтических антител, подвергавшихся клинической оценке, и соответствующих данных об иммуногенности показана тенденция к снижению иммуногенности белка при гуманизации V-областей антител (в среднем у 5,1% пациентов) по сравнению с антителами, несущими немодифицированные V-области нечеловеческого происхождения (в среднем у 23,59% пациентов). Поэтому для терапевтических белков на основе V-областей в виде конструкторов антител желательна повышенная степень идентичности по отношению к последовательностям человека. Для цели определения идентичности по отношению к эмбриональной последовательности V-области VL можно выровнять с аминокислотными последовательностями V-сегментов и J-сегментов эмбриональной последовательности человека (<http://vbase.mrc-sre.cam.ac.uk/>) с применением программного обеспечения Vector NTI и рассчитать процентную идентичность аминокислотной последовательности путем деления идентичных аминокислотных остатков на общее количество аминокислотных остатков в VL. Аналогичную процедуру можно выполнить для VH-сегментов (<http://vbase.mrc-sre.cam.ac.uk/>), за исключением CDR3 VH из-за ее высокой изменчивости и отсутствия существующих партнеров по выравниванию среди эмбриональных последовательностей CDR3 VH человека. Затем для увеличения идентичности последовательности по отношению к эмбриональным генам антител человека можно использовать рекомбинантные методики.

В дополнительном варианте реализации биспецифические конструкторы антител согласно настоящему изобретению характеризуются высоким выходом мономеров при стандартных условиях исследований, например, при стандартном двухэтапном процессе очистки. Предпочтительно выход мономеров конструкторов антител согласно настоящему изобретению составляет  $> 0,25$  мг/л супернатанта, более предпочтительно  $> 0,5$  мг/л, еще предпочтительнее  $> 1$  мг/л и наиболее предпочтительно  $> 3$  мг/л супернатанта.

Аналогичным образом можно определить выход димерных изоформ конструкторов антител и, соответственно, процентную долю мономера (т.е. мономер: (мономер+димер)) конструкторов антител.

Продуктивность мономерных и димерных конструкторов антител и рассчитанную процентную долю мономеров можно, например, получить на этапе ЭХ-очистки культуры супернатанта при стандартизованном исследовательском производстве в роллер-флаконах. В одном варианте реализации процентная доля мономерных конструкторов антител составляет  $\geq 80\%$ , более предпочтительно  $\geq 85\%$ , еще предпочтительнее  $\geq 90\%$  и наиболее предпочтительно  $\geq 95\%$ .

В одном варианте реализации конструкторы антител обладают предпочтительной стабильностью в плазме (соотношение EC50 с плазмой к EC50 без плазмы), составляющей  $\leq 5$  или  $\leq 4$ , более предпочтительно  $\leq 3,5$  или  $\leq 3$ , еще предпочтительнее  $\leq 2,5$  или  $\leq 2$ , и наиболее предпочтительно  $\leq 1,5$  или  $\leq 1$ . Стабильность конструктора антитела в плазме можно проверить путем инкубации конструктора в плазме человека при 37°C в течение 24 часов с последующим определением EC50 в анализе цитотоксичности с высвобождением 51-хрома. Эффекторные клетки при анализе цитотоксичности могут представлять собой стимулированные обогащенные CD8-положительные Т-клетки человека. Клетки-мишени могут представлять собой, например, клетки CHO, трансфицированные EGFRVIII человека. Можно выбрать соотношение эффекторных клеток и мишеней (E: T), равное 10: 1. Объединенную плазму человека для этой цели получают из крови здоровых доноров, собранной шприцами, покрытыми ЭДТА. Клеточные компоненты удаляют путем центрифугирования, а верхнюю фазу плазмы собирают и впоследствии объединяют. В качестве контроля конструкторы антител разбавляют непосредственно перед анализом цитотоксичности средой RPMI-1640. Стабильность в плазме рассчитывают как соотношение EC<sub>50</sub> (после инкубации с плазмой) к EC50 (контроля). См. пример 7.

Кроме того, предпочтительна низкая степень конверсии мономерных конструкторов антител согласно настоящему изобретению в димерную форму. Конверсию можно измерять в различных условиях и анализировать с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии. См. пример 5. Например, инкубирование мономерных изоформ конструкторов антител можно выполнять в течение 7 дней при 37°C и концентрации 250 мкг/мл в инкубаторе. В этих условиях предпочтительна процентная доля димерных конструкторов антител согласно настоящему изобретению, составляющая  $\leq 2,5\%$ , более предпочтительно  $\leq 2\%$ , еще предпочтительнее  $\leq 1,5\%$ , еще предпочтительнее  $\leq 1\%$ , еще предпочтительнее  $\leq 0,5\%$  и наиболее предпочтительно  $\leq 0,25\%$ . Хотя биспецифический конструктор антитела на основе EvIII-2 демонстрирует

частоту конверсии димера, равную 1,56%, биспецифический конструктор антитела на основе EvIII-1 согласно настоящему изобретению демонстрирует частоту конверсии на верхней границе наиболее предпочтительного предела для этой характеристики.

Кроме того, предпочтительны биспецифические конструкторы антител согласно настоящему изобретению с очень низкой конверсией димера после ряда циклов замораживания/размораживания. Например, мономерный конструктор антитела доводят до концентрации 250 мкг/мл, например, в буфере обычного состава, и подвергают трем циклам замораживания/размораживания (замораживанию при  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин с последующим размораживанием в течение 30 минут при комнатной температуре), а затем высокоэффективной ЭХ с целью определения процентной доли изначально мономерного конструктора антитела, преобразованного в димерный конструктор антитела. Предпочтительно процентная доля димерных биспецифических конструкторов антител составляет  $\leq 2,5$ , более предпочтительно  $\leq 2\%$ , еще предпочтительнее  $\leq 1,5\%$ , еще предпочтительнее  $\leq 1\%$  и наиболее предпочтительно  $\leq 0,5\%$ , например, после трех циклов замораживания/размораживания. Хотя биспецифический конструктор антитела на основе EvIII-2 не соответствует предпочтительному диапазону (2,53% димера), биспецифический конструктор антитела на основе EvIII-1 согласно настоящему изобретению демонстрирует частоту конверсии на верхней границе наиболее предпочтительного предела для этой характеристики (0,59% димера).

Биспецифические конструкторы антител согласно настоящему изобретению предпочтительно демонстрируют благоприятную термостабильность и температуру агрегации  $\geq 45^{\circ}\text{C}$  или  $\geq 50^{\circ}\text{C}$ , более предпочтительно  $\geq 51^{\circ}\text{C}$ ,  $\geq 52^{\circ}\text{C}$ ,  $\geq 53^{\circ}\text{C}$  или  $\geq 54^{\circ}\text{C}$ , еще предпочтительнее  $\geq 56^{\circ}\text{C}$  или  $\geq 57^{\circ}\text{C}$  и наиболее предпочтительно  $\geq 58^{\circ}\text{C}$  или  $\geq 59^{\circ}\text{C}$ . Параметр термостабильности можно определить в виде температуры агрегации антитела следующим образом: Раствор антител в концентрации 250 мкг/мл переносят в одноразовую кювету и помещают в устройство динамического светорассеяния (DLS). Образец нагревают от  $40^{\circ}\text{C}$  до  $70^{\circ}\text{C}$  со скоростью нагревания  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  при постоянном измерении радиуса. Увеличение радиуса указывает на плавление белка; агрегацию используют для расчета температуры агрегации антитела. См. пример 6.

В качестве альтернативы, можно определить кривые температуры плавления с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) для определения внутренней биофизической стабильности конструкторов антител. Эти эксперименты выполняют с применением устройства MicroCal LLC (Нортгемптон, штат Массачусетс, США) VP-DSC. Поглощение энергии образцом, содержащим конструктор антитела, регистрируют от  $20^{\circ}\text{C}$  до  $90^{\circ}\text{C}$  и сравнивают с образцом, содержащим только буферный состав. Конструкторы антител доводят до конечной концентрации 250 мкг/мл, например, в буфере для ЭХ. Для регистрации соответствующей кривой плавления поэтапно увеличивают общую температуру образца. Регистрируют поглощение энергии образцом и эталонным буферным составом при каждой температуре T. Различие поглощения энергии Ср (ккал/моль/ $^{\circ}\text{C}$ ) образцом и эталонным раствором наносят на график зависимости от температуры. Температуру плавления определяют как температуру первого максимума поглощения энергии.

Кроме того, ожидается, что биспецифические конструкторы антител EGFRVIIIxCD3 согласно настоящему изобретению должны характеризоваться мутностью (измеренной по OD340 после концентрирования очищенного мономерного конструктора антитела до 2,5 мг/мл и инкубации в течение ночи), равной  $\leq 0,2$ , предпочтительно  $\leq 0,15$ , предпочтительно  $\leq 0,12$ , еще предпочтительнее  $\leq 0,1$  или даже  $\geq 0,09$  и наиболее предпочтительно  $\leq 0,08$  или  $\geq 0,07$ . См. пример 7. Хотя биспецифический конструктор антитела EvIII-2 демонстрирует довольно высокую мутность (измеренную по OD340 после концентрирования очищенного мономерного конструктора антитела до 2,5 мг/мл и инкубации в течение ночи), равную почти 3, только биспецифический конструктор антитела на основе EvIII-1 полностью соответствует желательному спектру белковых соединений, пригодному для фармацевтического состава; см. табл.3 в примере 7.

В дополнительном варианте реализации конструктор антитела согласно настоящему изобретению стабилен при кислых значениях pH: чем лучше конструктор антитела переносит нефизиологические значения pH, например, pH 5,5 (значение pH, необходимое для запуска, например, катионообменной хроматографии), тем выше восстановление этого конструктора антитела при элюировании с ионообменной колонки по сравнению к общим количеством загруженного белка. Восстановление конструктора антитела с ионообменной (например, катионообменной) колонки при pH 5,5 предпочтительно составляет  $\geq 30\%$ , более предпочтительно  $\geq 40\%$ , более предпочтительно  $\geq 50\%$ , еще предпочтительнее  $\geq 60\%$ , еще предпочтительнее  $\geq 70\%$ , еще предпочтительнее  $\geq 80\%$ , еще предпочтительнее  $\geq 90\%$ , еще предпочтительнее  $\geq 95\%$  и наиболее предпочтительно  $\geq 99\%$ .

Кроме того, предполагается, что биспецифические конструкторы антител согласно настоящему изобретению обладают терапевтической эффективностью или противоопухолевой активностью. Это можно, например, оценить в исследовании, описанном в следующем примере с моделью ксенотрансплантата поздней стадии опухоли человека: в 1 день исследования  $5 \times 10^6$  EGFRVIII-положительных клеток линии рака человека (например, клеток линии глиобластомы человека U87 или DK-MG) подкожно вводят в правую спинно-боковую часть тела самок NOD/ТКИН мышей. По достижении среднего объема опухоли приблизительно  $100 \text{ мм}^3$  в брюшную полость мышей путем инъекции трансплантируют приблизительно

$2 \times 10^7$  стимулированных *in vitro* CD3-положительных Т-клеток человека. Мыши контрольной группы 1 (среда-носитель) не получают эффекторных клеток и используются как контроль без трансплантации для сравнения с контрольной группой 2 (среда-носитель, получение эффекторных клеток) для мониторинга отдельного воздействия Т-клеток на рост опухоли. Лечение антителами начинали по достижении среднего объема опухоли приблизительно  $200 \text{ мм}^3$ . Средний размер опухоли в каждой экспериментальной группе в день начала лечения не должен статистически отличаться от любой другой группы (дисперсионный анализ). Мыши получали биспецифический конструктор антитела EGFRVIIIxCD3 в дозе 0,5 мг/кг/день путем внутривенного болюсного введения в течение приблизительно 15-20 дней. В процессе исследования опухоли измеряли штангенциркулем и регистрировали ход лечения посредством сравнения объема опухолей (TV) между группами. Ингибирование роста опухоли T/C [%] определяют путем расчета TV по формуле:  $T/C\% = 100 \times (\text{медианный TV в анализируемой группе}) / (\text{медианный TV в контрольной группе } 2)$ .

Специалистам известно, как изменять или адаптировать определенные параметры данного исследования, например, количество вводимых опухолевых клеток, область инъекции, количество трансплантированных Т-клеток человека, вводимое количество биспецифического конструктора антитела и график эксперимента и при этом получить значимый и воспроизводимый результат. Предпочтительно, ингибирование роста опухоли T/C [%] составляет  $\leq 70$  или  $\leq 60$ , более предпочтительно  $\leq 50$  или щц 40, еще предпочтительнее  $\leq 30$  или  $\leq 20$  и наиболее предпочтительно  $\leq 10$  или  $\leq 5$  или даже  $\leq 2,5$ .

В настоящем изобретении также предложена молекула полинуклеотида/нуклеиновой кислоты, кодирующая конструктор антитела согласно настоящему изобретению.

Полинуклеотид представляет собой биополимер, состоящий из 13 или более нуклеотидных мономеров, ковалентно связанных в виде цепи. ДНК (например, кДНК) и РНК (мРНК) являются примерами полинуклеотидов с различной биологической функцией. Нуклеотиды являются органическими молекулами, используемыми в качестве мономеров или субъединиц молекул нуклеиновых кислот, например, ДНК или РНК. Молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотид может быть двухцепочечной или одноцепочечной, линейной или кольцевой. Она предпочтительно содержится в составе вектора, который предпочтительно находится в клетке-хозяине. Указанная клетка-хозяин, например, после трансформации или трансфекции вектором или полинуклеотидом согласно настоящему изобретению, может экспрессировать конструктор антитела. Для этой цели полинуклеотид или молекулу нуклеиновой кислоты функционально связывают с контрольными последовательностями.

Генетический код - это набор правил, по которым информация, закодированная в генетическом материале (нуклеиновых кислотах) переводится в белки. Биологическое декодирование в живых клетках выполняют рибосомы, которые связывают аминокислоты в порядке, указанном в мРНК, с применением молекул тРНК для переноса аминокислот и считывания трех нуклеотидов мРНК за раз. Код определяет, как последовательности этих нуклеотидных триплетов, называемых кодонами, указывают, какую аминокислоту добавить следующей во время синтеза белка. За некоторыми исключениями, трехнуклеотидный кодон в нуклеотидной последовательности обозначает одну аминокислоту. Поскольку подавляющее большинство генов закодированы строго одинаковым кодом, этот код часто называют каноническим или стандартным генетическим кодом. Хотя генетический код определяет последовательность белка для данной кодирующей области, другие области генома могут влиять на место и время продукции этих белков.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий полинуклеотид/молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

Вектор представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, используемую в качестве носителя для введения (чужеродного) генетического материала в клетку. Термин "вектор" включает плазмиды, вирусы, космиды и искусственные хромосомы, но не ограничивается ими. В общем случае сконструированные векторы

содержат сайт инициации репликации, полилинкер и маркер селекции. Как правило, сам вектор представляет собой нуклеотидную последовательность, обычно последовательность ДНК, содержащую вставленный фрагмент (трансген) и более крупную последовательность, которая служит "каркасом" вектора.

Современные векторы могут содержать дополнительные функции, помимо собственно трансгена и каркаса: промотор, генетический маркер, маркер устойчивости к антибиотикам, репортерный ген, последовательность, обеспечивающую адресное воздействие, маркер для очистки белка. Векторы, называемые экспрессирующими векторами (экспрессирующими конструктами) специально предназначены для экспрессии трансгена в клетке-мишени и, как правило, содержат управляющие последовательности.

Термин "управляющие последовательности" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме хозяина. Контрольные последовательности, которые пригодны для введения в прокариоты, к примеру, включают промотор, в некоторых случаях операторную последовательность и участок связывания рибосом. Известно, что в эукариотических клетках используются промоторы, сигналы полиаденилирования и

энхансеры.

Нуклеиновая кислота "функционально связана", если она находится в функциональной взаимосвязи с другой нуклеотидной последовательностью. Например, ДНК предпоследовательности или секреторного лидера функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется как белок-предшественник, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы облегчить трансляцию. В целом, "функционально связанный" означает, что последовательности ДНК, будучи связанными, являются непрерывными и, в случае наличия секреторного лидера, непрерывными и в фазе считывания. Тем не менее, энхансеры не должны быть непрерывными.

Связывание сопровождается лигированием по подходящим участкам рестрикции. Если такие сайты отсутствуют, используют синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры в соответствии с обычной практикой.

"Трансфекция" - процесс преднамеренного введения молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов (в том числе векторов) в клетки-мишени. Этот термин главным образом используется для невирусных способов в эукариотических клетках. Трансдукцию часто используют для описания передачи молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов, опосредованной вирусами. Трансфекция клеток животных обычно включает открытие временных пор или "дыр" в клеточной мембране, обеспечивающих поглощение материала. Трансфекцию можно выполнить с помощью фосфата кальция, электропорации, сдвливания клеток или смешивания катионного липида с материалом для продукции липосом, которые сливаются с клеточной мембраной и вводят свой груз внутрь клетки.

Термин "трансформация" используется для описания невирусного переноса молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов (включая векторы) в клетки бактерий, а также в эукариотические клетки неживотного происхождения, в том числе в клетки растений. Соответственно, трансформация представляет собой генетическую модификацию бактериальной или эукариотической клетки неживотного происхождения в результате непосредственного поглощения внешнего генетического материала (молекул нуклеиновой кислоты) через клеточную мембрану из окружения клеток и его последующего внедрения. Трансформацию можно выполнить искусственным путем. Для трансформации клетки или бактерии должны находиться в компетентном состоянии, которое может возникать как временная реакция на условия окружающей среды, например, голодание и плотность клеток.

Кроме того, в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная полинуклеотидом/молекулой нуклеиновой кислоты или вектором согласно настоящему изобретению.

В настоящем документе подразумевается, что термины "клетка-хозяин" или "клетка-реципиент" включают любую отдельную клетку или культуру клеток, которые могут быть или являться реципиентами векторов, экзогенных молекул нуклеиновой кислоты и полинуклеотидов, кодирующих конструкт антитела согласно настоящему изобретению; и/или реципиентами самого конструкта антитела. Введение соответствующего материала в клетку выполняют посредством трансформации, трансфекции и т. п. Термин "клетка-хозяин" также включает потомство или потенциальное потомство одиночной клетки. Поскольку в последующих поколениях возможны некоторые модификации из-за естественной, случайной или преднамеренной мутации или воздействия окружающей среды, такое потомство может быть фактически не идентично (по морфологии или геномной ДНК или общей ДНК хромосомного набора) исходной клетке, но по-прежнему должно входить в рамки данного термина, используемого в настоящем документе. Подходящие клетки-хозяева включают клетки прокариот и эукариот и также включают бактерии, дрожжевые клетки, клетки грибов, клетки растений и клетки животных, например, клетки насекомых и клетки млекопитающих, например, мыши, крысы, макака или человека, но не ограничиваются ими.

Конструкт антитела согласно настоящему изобретению можно продуцировать в бактериях. После экспрессии конструкт антитела согласно настоящему изобретению можно выделить из клеточной массы *E. coli* в растворимую фракцию и очистить, например, с помощью аффинной и/или эксклюзионной хроматографии. Конечную очистку можно выполнить аналогично способу очистки антитела, экспрессируемого, например, в клетках СНО.

Кроме прокариот, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих конструкт антитела согласно настоящему изобретению, являются эукариотические микроорганизмы, например, мицелиальные грибы или дрожжи. *Saccharomyces cerevisiae*, или пекарские дрожжи, является наиболее широко используемым микроорганизмом-хозяином среди низших эукариот. В то же время для целей настоящего документа можно использовать общедоступные организмы, относящиеся к ряду других родов, видов и штаммов, например, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluveromyces*, например, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilorum* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomycetes*, на-

пример, *Schwanniomycetes occidentalis*; и мицелиальные грибы, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* и *Aspergillus*, например, *A. nidulans* и *A. niger*.

Пригодные для экспрессии гликозилированного конструктора антитела согласно настоящему изобретению клетки-хозяева также можно получить из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Выявлены многочисленные штаммы и варианты бакуловирусов и соответствующие восприимчивые к ним клетки-хозяева таких насекомых, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница совки), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая муха) и *Bombyx mori*. Общедоступен ряд вирусных штаммов для трансфекции, например, варианта L-1 *Autographa californica* NPV и штамма Bm-5 *Bombyx mori* NPV; такие вирусы можно использовать в качестве вируса согласно настоящему изобретению, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Кроме того, в качестве хозяев можно использовать культуры клеток растений - хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, помидора, *Arabidopsis* и табака. Клонированные и экспрессирующие векторы, пригодные для продукции белков в культуре растительных клеток, известны специалистам в данной области техники. См., например, Hiatt et al. , *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsaenko et al. (1995) *The Plant J* 8: 745-750 и Fecker et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986.

В то же время наибольший интерес вызывают клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (тканевой культуре) стало повседневной процедурой. Примерами подходящих линий клеток млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); эмбриональная линия почки человека (293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, которые описаны в Graham et al. , *J. Gen Virol.* 36: 59 (1977)); клетки почек детеныша хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомяка/-БНГК (CHO, Urlaub et al. , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); клетки сертоли мыши (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251, 1980); клетки почек обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почек собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, 1413 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL5 1); TRI-клетки (Mather et al. , *Annals N. Y Acad. Sci.* (1982) 383: 44-68); клетки MRC 5; клетки FS4; и линию гепатомы человека (Hep G2).

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ получения конструктора антитела согласно настоящему изобретению, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина согласно настоящему изобретению в условиях, обеспечивающих экспрессию конструктора антитела согласно настоящему изобретению и выделение продуцированного конструктора антитела из культуры.

В настоящем документе термин "культивирование" относится к поддержанию, дифференцировке, росту, пролиферации и/или размножению клеток *in vitro* при соответствующих условиях в среде. Термин "экспрессия" включает любой этап, вовлеченный в продукцию конструктора антитела согласно настоящему изобретению, в том числе транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционную модификацию и секрецию, но не ограничивается ими.

При использовании рекомбинантных методик конструктор антитела можно продуцировать внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или напрямую секретировать в среду. Если конструктор антитела продуцируют внутриклеточно, на первом этапе удаляют обломки частиц, клетки-хозяева или лизированные фрагменты, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. В статье Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) описана процедура выделения антител, секретлируемых в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, массу клеток размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), ЭДТА и фенилметилсульфонилхлорида (PMSF) в течение приблизительно 30 мин. Остатки клеток можно удалить с помощью центрифугирования. Если антитело секретруется в среду, надосадочную жидкость из таких систем экспрессии обычно сначала концентрируют с помощью доступных для приобретения фильтров для концентрирования белка, например, установок ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Для ингибирования протеолиза на любом из предыдущих этапов можно включать ингибитор протеаз, например, PMSF, а для предотвращения роста случайных контаминантов можно добавлять антибиотики.

Конструктор антитела согласно настоящему изобретению, полученный из клеток-хозяев, можно очистить с помощью, например, хроматографии на гидроксипатите, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии. Кроме того, в зависимости от антитела, подлежащего очистке, доступны другие методики очистки белка, например, фракционирование на ионообменной колонке, преципитация с этанолом, обращенно-фазная ВЭЖХ, хроматография на гепарин-SEPHAROSE™, хроматография на анионно-или катионообменной смоле (например, на колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, электрофорез в ДСН-ПААГ и преципитация с сульфатом аммония. Если конструктор антитела согласно настоящему изобретению содержит СНЗ-домен, для очистки можно использовать смолу Vakerbond ABX (J. T. Vaker, Филлипсбург, штат Нью-Джерси, США).

Аффинная хроматография является предпочтительной методикой очистки. Матрикс, к которому присоединяют аффинный лиганд, чаще всего представляет собой агарозу, однако также доступны и другие матриксы. Механически устойчивые матриксы, например, стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол дает возможность достижения более высоких скоростей потока и более короткого времени обработки, чем при использовании агарозы.

Кроме того, в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая конструктор антитела согласно настоящему изобретению или конструктор антитела, продуцированный в соответствии со способом согласно настоящему изобретению. Предпочтительная фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению характеризуется однородностью конструктора антитела, равной  $\geq 80\%$ , более предпочтительно  $\geq 81$ ,  $\geq 82$ ,  $\geq 83$ ,  $\geq 84$  или  $\geq 85\%$ , еще предпочтительнее  $\geq 86$ ,  $\geq 87$ ,  $\geq 88$ ,  $\geq 89$  или  $\geq 90\%$ , еще предпочтительнее  $\geq 91$ ,  $\geq 92$ ,  $\geq 93$ ,  $\geq 94$ , или  $\geq 95\%$  и наиболее предпочтительно  $\geq 96$ ,  $\geq 97$ ,  $\geq 98$  или  $\geq 99\%$ .

В настоящем документе термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, пригодной для введения пациенту, предпочтительно пациенту-человеку. Особенно предпочтительная фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит один или множество конструктор(ов) антитела согласно настоящему изобретению, предпочтительно в терапевтически эффективном количестве. Предпочтительно фармацевтическая композиция, кроме того, содержит подходящий состав одного или более (фармацевтически эффективных) носителей, стабилизаторов, вспомогательных веществ, разбавителей, солиubilизаторов, ПАВ, эмульгаторов, консервантов и/или адьювантов. Приемлемые компоненты композиции предпочтительно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением включают жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции, но не ограничиваются ими.

Композиции согласно настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый носитель. В общем случае, используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает всевозможные водные и неводные растворы, стерильные растворы, растворители, буферы, например, физиологические растворы с фосфатным буфером (PBS), воду, суспензии, эмульсии, например, эмульсии "масло/вода", различные виды увлажнителей, липосомы, дисперсионные среды и покрытия, совместные с фармацевтическим введением, в частности, с парентеральным введением. Применение таких сред и агентов в фармацевтической композиции хорошо известно в данной области техники, и композиции, содержащие такие агенты, можно составить общепринятыми способами.

В некоторых вариантах реализации предложены фармацевтические композиции, содержащие конструкторы антител согласно настоящему изобретению и, кроме того, одно или более из вспомогательных веществ, например, иллюстративно описанных в данном разделе и в других разделах настоящего документа. Вспомогательные вещества можно применять в настоящем изобретении в различных целях, например, для коррекции физических, химических или биологических свойств составов, например, регулирования вязкости, и или в способах согласно настоящему изобретению для повышения эффективности и/или для стабилизации таких составов и способов против деградации и порчи из-за, например, стрессовых условий во время производства, доставки, хранения, предварительной подготовки перед применением, введения и после этого.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция может содержать материалы состава с целью изменения, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции (см. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18<sup>th</sup> Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company). В таких вариантах реализации подходящие материалы состава могут включать:

аминокислоты, например, глицин, аланин, глутамин, аспарагин, треонин, пролин, 2-фенилаланин, а также заряженные аминокислоты, предпочтительно лизин, ацетат лизина, аргинин, глутамат и/или гистидин противомикробные средства, например, антибактериальные и противогрибковые агенты антиоксиданты, например, аскорбиновую кислоту, метионин, сульфит натрия или гидросульфит натрия;

буферы, буферные системы и буферные агенты, применяемые для поддержания pH композиции в области физиологических значений или немного ниже, обычно в диапазоне pH от приблизительно 5 до приблизительно 8 или 9; примеры буферных агентов представляют собой борат, бикарбонат, трис-HCl, цитрат, фосфат или другие органические кислоты, сукцинат, фосфат, гистидин и ацетат; например, трис-буфер с pH приблизительно 7,0-8,5, или ацетатный буфер с pH приблизительно 4,0-5,5;

неводные растворители, например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, например, оливковое масло, и пригодные для инъекций органические сложные эфиры, например, этилолеат;

водные носители, включая воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая физиологический раствор и буферные среды;

биоразлагаемые полимеры, например, полиэфиры;

наполнители, например, маннит или глицин;

хелатирующие агенты, например, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА);  
 изотонические агенты и замедлители всасывания;  
 комплексообразователи, например, кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин и гидроксипропил-бета-циклодекстрин;  
 наполнители;  
 моносахариды; дисахариды; и другие углеводы (например, глюкозу, маннозу или декстрины); углеводы могут представлять собой восстанавливающие углеводы, предпочтительно трегалозу, сахарозу, октасульфат, сорбит или ксилит;  
 (низкомолекулярные) белки, полипептиды или белковые носители, например, человеческий или бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, предпочтительно человеческого происхождения;  
 красители и вкусоароматические добавки;  
 серусодержащие восстановители, например, глутатион, липоевую кислоту, тиогликолят натрия, тиоглицерин, [альфа]-монотиоглицерин и тиосульфат натрия разбавители;  
 эмульгаторы;  
 гидрофильные полимеры, например, поливинилпирролидон;  
 солеобразующие противоионы, например, натрия;  
 Консерванты, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и т. п.; примеры: хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенилэтиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода);  
 комплексы металлов, например, Zn-белковые комплексы;  
 растворители и совместные растворители (например, глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль);  
 углеводы и сахароспирты, например, трегалозу, сахарозу, октасульфат, маннит, сорбит или ксилит, стахиозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, рибозу, миоинозитоу, галактозу, лактит, рибит, миоинозит, галактит, глицерин, циклические полиолы (например, инозит), полиэтиленгликоль; и полигидрированные сахароспирты;  
 суспендирующие агенты;  
 ПАВ или увлажнители, например, плуроники, ПЭГ, эфиры сорбитана, полисорбаты, например, полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапол; ПАВ могут представлять собой детергенты, предпочтительно с молекулярной массой >1,2 кДа, и/или полиэфир, предпочтительно с молекулярной массой >3 кДа; неограничивающие примеры предпочтительных детергентов представляют собой твин 20, твин 40, твин 60, твин 80 и твин 85; неограничивающие примеры предпочтительных полиэфиров представляют собой ПЭГ-3000, ПЭГ-3350, ПЭГ-4000 и ПЭГ-5000;  
 стабилизаторы, например сахарозу или сорбит;  
 усилители тоничности, например, галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит;  
 среды-носители для парентеральной доставки, включая раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла;  
 среды-носители для внутривенной доставки, включая жидкие и питательные добавки, электролитные добавки (например, на основе декстрозы Рингера), но не ограничиваются ими.  
 Для специалиста в данной области техники очевидно, что различные компоненты фармацевтической композиции (например, вышеперечисленные компоненты) могут оказывать различные эффекты, например, аминокислота может действовать как буферный агент, стабилизатор или антиоксидант; маннит может действовать как наполнитель и/или усилитель тоничности; хлорид натрия может действовать в качестве среды-носителя для доставки и/или усилитель тоничности; и т.д.  
 Кроме того, допускается, что композиция согласно настоящему изобретению может содержать, помимо полипептида согласно настоящему изобретению, описанного в настоящем документе, дополнительные биологически активные агенты в зависимости от назначения композиции. Такие агенты могут представлять собой лекарственные средства, действующие на желудочно-кишечную систему, лекарственные средства, действующие как цитостатики, лекарственные средства, предотвращающие гиперурикемию, лекарственные средства, подавляющие реакции иммунной системы (например, кортикостероиды), лекарственные средства, модулирующие воспалительный ответ, лекарственные средства, действующие на систему кровообращения и/или такие агенты, как цитокины, известные в данной области техники. Кроме того, допускается применение конструкторов антител согласно настоящему изобретению в качестве вспомогательного терапевтического средства, т.е. в комбинации с другим противораковым лекарственным средством.  
 В определенных вариантах реализации изобретения оптимальную фармацевтическую композицию определяет специалист в данной области техники в зависимости, например, от способа введения, формата доставки и необходимой дозировки. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra. В некоторых вариантах реализации такие композиции могут влиять на физическое состояние, ста-

бильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения конструктора антитела согласно настоящему изобретению *in vivo*. В определенных вариантах реализации основная среда или носитель в фармацевтической композиции может по природе быть водной или неводной. Например, подходящим базовым раствором или носителем может быть вода для инъекций, физиологический раствор или искусственная цереброспинальная жидкость, возможно, с добавлением других материалов, широко применяемых в композициях для парентерального введения. Нейтральный забуференный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином, представляют собой дополнительные типичные среды-носители. В определенных вариантах реализации изобретения композиции, содержащие конструктор антитела согласно настоящему изобретению, можно подготовить к хранению путем смешивания выбранной композиции, имеющей необходимую степень очистки, с необязательными агентами состава (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, *supra*) в форме лиофилизированной таблетки или водного раствора. Кроме того, в определенных вариантах реализации конструктор антитела согласно настоящему изобретению можно получить в виде лиофилизата, используя соответствующие вспомогательные вещества, например, сахарозу.

Если предусмотрено парентеральное введение, терапевтические композиции для применения в данном изобретении могут находиться в форме апиrogenного, парентерально приемлемого водного раствора, содержащего желательный конструктор антитела согласно настоящему изобретению в фармацевтически приемлемой среде-носителе. В особенности подходящей средой-носителем для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которую добавлен конструктор антитела согласно настоящему изобретению, в виде стерильного, изотонического раствора с надлежащим консервантом. В определенных вариантах реализации приготовление может включать смешивание желательной молекулы с таким агентом, как инъецируемые микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (например, полимолочной кислотой или полигликолевой кислотой), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или пролонгированное высвобождение продукта, который можно доставлять посредством депо-инъекции. В определенных вариантах реализации также можно использовать гиалуроновую кислоту, которая способствует продлению периода нахождения вещества в кровотоке. В определенных вариантах реализации можно использовать имплантируемые устройства для доставки лекарственных препаратов для введения желательного конструктора антитела.

Возможность изготовления дополнительных фармацевтических композиций, включая составы, содержащие конструктор антитела согласно настоящему изобретению с пролонгированной или контролируемой доставкой/высвобождением, очевидна для специалистов в данной области техники. Способы приготовления различных других средств с пролонгированной или контролируемой доставкой, например, липосомных носителей, биоразлагаемых микрочастиц или пористых гранул и депо-инъекций, также известны специалистам в данной области техники. См., например, международную заявку на патент № PCT/US93/00829, в которой описано контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут содержать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матрицы для пролонгированного высвобождения могут содержать полиэфиры, гидрогели, полилактиды (как описано в патенте США № 3773919 и публикации заявки на европейский патент № EP 058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 2: 547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 и Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12: 98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, *supra*) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (публикация заявки на европейский патент № EP 133988). Композиции с пролонгированным высвобождением также могут содержать липосомы, которые можно изготовить любым из нескольких известных в данной области техники способов. См., например, Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 3688-3692; публикации заявок на европейские патенты № EP 036676; EP 088046 и EP 143949.

Конструктор антитела можно включить в микрокапсулы, полученные, например, с помощью методик коацервации или межфазной полимеризации, например, микрокапсулы гидроксиметилцеллюлозы или желатина и полиметилметакрилата, соответственно, в коллоидные системы доставки лекарств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed., (1980).

Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo*, как правило, предоставлены в виде стерильных препаратов. Стерилизацию можно выполнять путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. Если композиция является лиофилизированной, стерилизацию этим способом можно проводить как до, так и после лиофилизации и восстановления. Композиции для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в растворе. Парентеральные композиции в общем случае помещают в емкость со стерильным входным отверстием, например, пакет для внутривенных растворов или флакон с пробкой, прокалываемой гиподермической иглой для инъекций.

Еще один аспект изобретения включает самобуферизирующиеся составы конструктора антитела согласно настоящему изобретению, которые можно использовать в качестве фармацевтической композиции,

как описано в международной патентной заявке WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599). Доступен ряд способов воздействия на материалы и способы для стабилизации и составления препаратов белка, которые можно применять в этой связи, например, Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" in: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), и Randolph et al., "Surfactant-protein interactions", Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002); в особенности см. разделы, посвященные вспомогательным веществам и способам получения самобуферизующихся составов белка в соответствии с настоящим изобретением, особенно в отношении к белковым фармацевтическим продуктам и способам для применения в ветеринарии и/или медицине.

Соли можно использовать в соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения, например, для регулирования ионной силы и/или изотоничности состава и/или для повышения растворимости и/или физической стабильности белка или других ингредиентов композиции в соответствии с настоящим изобретением. Как хорошо известно, ионы могут стабилизировать нативное состояние белков путем связывания с заряженными остатками на поверхности белка и экранирования заряженных и полярных групп в составе белка и снижения силы их электростатического взаимодействия, притяжения и отталкивания. Ионы также могут стабилизировать денатурированное состояние белка путем связывания, в частности, денатурированных пептидных связей (-CONH) белка. Кроме того, ионные взаимодействия с заряженными и полярными группами в составе белка также может ослабить межмолекулярные электростатические взаимодействия и, таким образом, предотвратить или снизить агрегацию и нерастворимость белка.

Разновидности ионов значительно отличаются по влиянию на белки. Разработан ряд классификаций ионов и их влияния на белки, которые можно использовать при составлении фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. Одним из примеров является ряд Гофмейстера, который распределяет ионные и полярные неионные растворенные вещества по их влиянию на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космотропными".

Дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропными". Космотропные вещества обычно используют в высоких концентрациях (например, >1-молярный сульфат аммония) для осаждения белков из раствора ("высаливания"). Хаотропные вещества обычно используют для денатурации и/или солубилизации белков ("всаливания"). Относительная эффективность ионов по отношению к "всаливанию" и "высаливанию" определяет их положение в ряду Гофмейстера.

Свободные аминокислоты можно использовать в составах конструктора антитела согласно настоящему изобретению в соответствии с различными вариантами реализации изобретения в качестве наполнителей, стабилизаторов и антиоксидантов, а также для других стандартных вариантов применения. Для стабилизации белков в составе можно применять лизин, пролин, серин и аланин. Глицин применяют при лиофилизации, чтобы гарантировать правильную структуру и свойства таблетки. Аргинин можно применять для подавления агрегации белка как в жидких, так и в лиофилизованных составах. Метионин применяют в качестве антиоксиданта.

Полиолы включают углеводы, например, маннит, сахарозу и сорбит и многоатомные спирты, например, глицерин и пропиленгликоль, а также, в целях данного изобретения, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и родственные ему вещества. Полиолы являются космотропными. Их применяют в качестве стабилизирующих агентов как в жидких, так и в лиофилизованных составах для защиты белков от физического и химического разложения. Также полиолы применяют для корректировки тоничности составов. Среди полиолов, которые можно применять в избранных вариантах реализации настоящего изобретения, находится маннит, обычно используемый для обеспечения структурной стабильности твердого остатка в лиофилизованных составах. Он обеспечивает структурную стабильность твердого остатка. В общем случае его применяют вместе с лиопротектором, например, сахарозой. Сорбит и сахароза относятся к предпочтительным агентам для регуляции тоничности и используются в качестве стабилизаторов для защиты от стрессовых условия замораживания-размораживания во время транспортировки или получения нефасованного продукта во время производства. Восстанавливающие сахара (содержащие свободные альдегидные или кетонные группы), например, глюкоза и лактоза, могут гликировать поверхностные остатки лизина и аргинина. Поэтому они обычно не относятся к предпочтительным полиолам, применяемым в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, углеводы, образующие такие реакционноспособные соединения, например, сахароза, которая гидролизует до фруктозы и глюкозы в кислых условиях, и, соответственно, приводит к гликированию, также не относятся к предпочтительным полиолам для данного изобретения в этом отношении. ПЭГ применяют для стабилизации белков и в качестве криопротектора, и в этом отношении его можно использовать в данном изобретении.

Варианты реализации составов конструктора антитела согласно настоящему изобретению также содержат ПАВ. Молекулы белков могут быть подвержены адсорбции на поверхности и денатурации и последующей агрегации на границах раздела воздух-жидкость, твердое тело-жидкость и жидкость-жидкость. Эти эффекты в общем случае обратно пропорциональны концентрации белка. Эти вредные

взаимодействия в общем случае обратно пропорциональны концентрации белка и, как правило, усугубляются при физическом встряхивании, например, во время транспортировки и работы с продуктом. ПАВ обычно используют для предотвращения, минимизации или снижения поверхностной адсорбции. Подходящие ПАВ согласно настоящему изобретению включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие эфиры жирных кислот, сорбитанполиэтоксилаты и полоксамер 188. Также ПАВ традиционно используют для контроля конформационной стабильности белков. Использование ПАВ в этом отношении является белок-специфическим, поскольку любое заданное ПАВ обычно стабилизирует некоторые белки и дестабилизирует другие.

Полисорбаты подвержены окислительному разложению и часто при поставке содержат достаточное количество пероксидов, вызывающих окисление боковых цепей остатков в составе белков, особенно метионина. Соответственно, полисорбаты следует использовать с осторожностью и при использовании применять в минимальной эффективной концентрации. В этом отношении полисорбаты подтверждают общее правило, что вспомогательные вещества следует применять в минимальных эффективных концентрациях.

Варианты реализации составов конструктора антитела согласно настоящему изобретению также содержат один или более из антиоксидантов. Вредоносное окисление белков в фармацевтических составах можно до некоторой степени предотвратить путем поддержания надлежащего уровня атмосферного кислорода и температуры и избегания воздействия света. Кроме того, для предотвращения окислительного разложения белков можно использовать антиоксидантные вспомогательные вещества. К антиоксидантам, которые можно применять в этом отношении, относятся восстановители, акцепторы кислорода/свободных радикалов и хелатирующие агенты. Антиоксиданты для использования в составах терапевтических белков в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно являются водорастворимыми и поддерживают свою активность на протяжении всего срока хранения продукта. Предпочтительным антиоксидантом в соответствии с настоящим изобретением в этом отношении является ЭДТА. Антиоксиданты могут повреждать белки. Например, восстановители, например, в частности, глутатион, могут нарушать внутримолекулярные дисульфидные связи. Таким образом, антиоксиданты для применения в настоящем изобретении выбирают, в числе прочего, с целью устранения или достаточного снижения возможности повреждения белков в составе за их счет.

Составы в соответствии с настоящим изобретением могут содержать ионы металлов, являющихся кофакторами белков и необходимых для образования координационных комплексов белков, например, ионы цинка, необходимые для образования некоторых суспензий инсулина. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, в ходе которых происходит разложение белка. Однако ионы металлов также могут катализировать физические и химические процессы, в ходе которых происходит разложение белка. Ионы магния (10-120 мМ) можно применять для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты в изоаспарагиновую кислоту. Ионы  $\text{Ca}^{+2}$  (до 100 мМ) могут повышать стабильность дезоксирибонуклеазы человека.  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  и  $\text{Zn}^{+2}$ , напротив, могут дестабилизировать рекомбинантную ДНКазу человека. Аналогичным образом,  $\text{Ca}^{+2}$  и  $\text{Sr}^{+2}$  могут стабилизировать фактор VIII,  $\text{Mn}^{+2}$  и  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  и  $\text{Fe}^{+2}$  могут дестабилизировать его, а ионы  $\text{Al}^{+3}$  могут усилить его агрегацию.

Варианты реализации составов конструктора антитела согласно настоящему изобретению также содержат один или более из консервантов. Консерванты необходимы при разработке многодозовых парентеральных составов, для которых предусмотрено более одного извлечения из одного и того же контейнера. Их основной функцией является ингибирование роста микроорганизмов и гарантия стерильности продукта на протяжении срока годности или применения лекарственного продукта. Традиционно применяемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты на протяжении длительного времени используются с низкомолекулярными соединениями для парентерального применения, разработка белковых растворов, содержащих консерванты, может быть связана с проблемами. Консерванты почти всегда оказывают дестабилизирующее влияние (приводят к агрегации) на белки, и это является основным фактором, ограничивающим их применение в многодозовых составах белков. На сегодняшний день большинство белковых лекарственных средств составляют для однократного применения. Однако при возможности применения многодозовых составов они имеют дополнительное преимущество, обеспечивая удобство для пациента и повышая конкурентоспособность на рынке. Хорошим примером является гормон роста человека (hGH), для которого разработка состава с консервантом привела к коммерциализации более удобных многодозовых ручек-шприцов. В настоящее время на рынке доступны по меньшей мере четыре таких устройства в виде ручек-шприцов, содержащих составы hGH с консервантом. Norditropin (жидкий состав, Novo Nordisk), Nutropin AQ (жидкий состав, Genentech) и Genotropin (лиофилизированный состав в двухкамерном картридже, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как Somatropе (Eli Lilly) содержит м-крезол. При составлении и разработке лекарственных форм с консервантами необходимо рассмотреть ряд аспектов.

Необходимо оптимизировать эффективную концентрацию консерванта в лекарственном средстве. Для этого требуется тестирование данного консерванта в лекарственной форме в диапазонах концентраций, обеспечивающих противомикробную эффективность без ущерба для стабильности белка.

Как и следовало ожидать, разработка жидких составов, содержащих консерванты, является более

сложной, чем разработка лиофилизированных составов. Лиофилизированные продукты можно лиофилизировать без консерванта и восстановить с применением разбавителя, содержащего консервант, во время использования. Это сокращает время контакта консерванта с белком, значительно снижая риски, связанные со стабильностью. Для жидких составов эффективность и стабильность консерванта должны поддерживаться в течение всего срока хранения продукта (приблизительно 18-24 месяцев). Важно отметить, что должна быть продемонстрирована эффективность консерванта в окончательном составе, содержащем активный препарат и все вспомогательные компоненты.

Конструкты антител, описанные в настоящем документе, также можно получить в виде иммунолипосом. "Липосома" представляет собой небольшую везикулу, состоящую из липидов различных типов, фосфолипидов и/или поверхностно-активных веществ, пригодных для доставки лекарственного средства в организм млекопитающего. Компоненты липосомы упорядочены в виде бислойной структуры, аналогичной липидной конструкции биологических мембран. Липосомы, содержащие конструкт антитела, получают с помощью способов, известных в данной области техники, например, описанных в статьях Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); патентах США № 4485045 и 4544545; и WO 97/38731. Липосомы с повышенным временем циркуляции описаны в патенте США № 5013556. Особенно подходящие липосомы можно получать при помощи способа обращенно-фазового выпаривания с применением композиции липидов, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и производные фосфатидилэтаноламина и ПЭГ (ПЭГ-PE). Липосомы продавливают через фильтры с определенным размером пор, получая липосомы желательного диаметра. Fab'-фрагменты конструкта антител согласно настоящему изобретению можно конъюгировать с липосомами, как описано в Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) посредством реакции обмена дисульфидных связей. Химиотерапевтический агент предпочтительно содержится внутри липосомы. Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

После приготовления фармацевтическую композицию можно хранить в стерильном флаконе в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердой формы, кристалла или в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить как в готовой к применению форме, так и в форме (например, лиофилизированной), которую восстанавливают перед введением.

Биологическую активность фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, можно определить, например, с помощью анализов цитотоксичности, описанных далее в примерах, в заявке WO 99/54440 или Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). Термины "эффективность" или "эффективность in vivo" в настоящем документе относятся к реакции на лечение с применением фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению при использовании, например, стандартизованных критериев реакции NCI. Успех или эффективность in vivo терапии с применением фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению относится к эффективности композиции при использовании по назначению, т.е. способность композиции вызывать желательный эффект, т.е. уничтожение патологических клеток, например, опухолевых клеток.

Эффективность in vivo можно отслеживать с помощью установленных стандартных способов для соответствующих нозологических единиц, включая анализ количества лейкоцитов, лейкограмму, сортировку клеток с активацией флуоресценции, анализ аспиратов костного мозга, но не ограничиваясь ими. Кроме того, можно применять различные специфические по отношению к конкретному заболеванию параметры клинического биохимического анализа и другие установленные стандартные способы. Кроме того, можно применять компьютерную томографию, рентгеноскопию, ЯМР-томографию (например, для оценки реакции на основе критериев Национального института рака США [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. 1999 Apr; 17(4): 1244]), позитронно-эмиссионную томографию, анализ количества лейкоцитов, лейкограмму, сортировку клеток с активацией флуоресценции, анализ аспиратов костного мозга, биопсию/гистологические исследования лимфатических узлов и различные специфические по отношению к лимфомам параметры клинического биохимического анализа (например, лактатдегидрогеназу) и другие установленные стандартные способы.

Еще одной крупной проблемой при разработке лекарственных средств, например, фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, является прогнозируемая модуляция фармакокинетических свойств. С этой целью можно установить фармакокинетический профиль лекарства-кандидата, т.е. профиль фармакокинетических параметров, влияющих на способность конкретного лекарственного вещества лечить данное состояние. Фармакокинетические параметры лекарственного вещества, влияющие на способность лекарственного вещества лечить определенное заболевание, включают: период полужизни, объем распределения, пресистемный метаболизм в печени и степень связывания в сыворотке крови, но не ограничиваются ими. На эффективность данного лекарственного агента может влиять каждый из вышеупомянутых параметров.

"Период полужизни" означает время, когда 50% введенного лекарственного вещества выводится за счет биологических процессов, например, метаболизма, выделения и т.д. Под термином "пресистемный

метаболизм в печени" понимают возможность метаболизма лекарственного вещества при первом контакте с печенью, т.е. во время его первого прохождения через печень. "Объем распределения" означает степень удержания лекарственного вещества в различных частях тела, например, во внутриклеточном и внеклеточном пространстве, тканях и органах и т.д. и распространение лекарственного вещества в этих частях тела. "Степень связывания в сыворотке крови" означает склонность препарата взаимодействовать и связываться с белками сыворотки крови, например, альбумином, что приводит к снижению или потере биологической активности лекарственного вещества.

Фармакокинетические параметры также включают биодоступность, время задержки ( $T_{lag}$ ),  $T_{max}$ , скорость поглощения, время начала действия и/или  $C_{max}$  при определенном введенном количестве лекарственного вещества. "Биодоступность" означает количество лекарственного вещества в компартменте крови. "Время задержки" означает время задержки между введением лекарственного вещества и его обнаружением и возможностью измерения в крови или плазме. " $T_{max}$ " представляет собой время, после которого достигается максимальная концентрация препарата в крови, а " $C_{max}$ " представляет собой концентрацию в крови, максимально получаемую для данного лекарственного вещества. Все параметры влияют на время достижения концентрации лекарственного вещества в крови или тканях, необходимой для его биологического действия. Фармакокинетические параметры биспецифических конструкторов антител, обладающих межвидовой перекрестной специфичностью, которую можно определить в доклинических исследованиях на приматах, не являющихся шимпанзе, как описано выше, также указаны, например в публикации Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12).

В одном варианте реализации предложен конструктор антитела согласно настоящему изобретению или конструктор антитела, продуцированный согласно способу, описанному в настоящем изобретении, для применения при профилактике, лечении или облегчении состояния при опухолевом или раковом заболевании или метастатическом раковом заболевании.

В предпочтительном варианте реализации изобретения указанное опухолевое или раковое заболевание является плотной опухолью.

Составы, описанные в настоящем документе, можно применять в качестве фармацевтических композиций при лечении, облегчении состояния и/или профилактике патологического медицинского состояния, описанного в настоящем документе, у пациента, нуждающегося в этом. Термин "лечение" относится как к терапевтическому воздействию, так и к профилактическим или превентивным мерам. Термин "лечение" включает применение или введение состава в организм, отдельную ткань или клетку пациента, страдающего заболеванием/расстройством, симптомом заболевания/расстройства или предрасположенного к заболеванию/расстройству, с целью лечения, излечения, смягчения, ослабления, изменения, устранения, облегчения, улучшения или влияния на заболевание, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию.

Термин "облегчение" в настоящем документе относится к любому улучшению болезненного состояния пациента с опухолью или раком или метастатическим раком, как указано ниже в настоящем документе, за счет введения конструктора антитела согласно настоящему изобретению в организм субъекта, нуждающегося в этом. Таким улучшением может также считаться замедление или остановка прогрессирования опухоли или рака или метастатического рака у пациента. Термин "профилактика" в настоящем документе означает предотвращение возникновения или повторного возникновения опухоли или рака или метастатического рака у пациента, как указано ниже в настоящем документе, за счет введения конструктора антитела согласно настоящему изобретению в организм субъекта, нуждающегося в этом.

Термин "заболевание" относится к любому состоянию, при котором возможен благоприятный эффект от лечения с применением конструктора антитела или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе. Этот термин включает хронические и острые расстройства или заболевания, включая патологические состояния млекопитающих, являющиеся предрасполагающими факторами для рассматриваемого заболевания.

"Новообразование" представляет собой аномальный рост тканей, обычно, но не всегда образующих очаговое образование.

При формировании очагового образования его часто называют "опухолью". Новообразования или опухоли могут быть доброкачественными, потенциально злокачественными (предраковыми) или злокачественными. Злокачественные новообразования обычно называют раком. Они обычно внедряются в окружающие ткани и уничтожают их и могут образовывать метастазы, т.е. распространяются в другие части, ткани или органы организма. Соответственно, термин "метастатический рак" охватывает метастазы в другие ткани или органы, помимо исходной опухоли. Лимфомы и лейкозы представляют собой лимфоидные новообразования. Для целей настоящего изобретения они также входят в состав определения терминов "опухоль" и "рак".

В предпочтительном варианте реализации изобретения опухолевое или раковое заболевание является плотной опухолью, а метастатическое раковое заболевание может возникнуть в результате любого из вышеуказанных заболеваний.

Предпочтительные опухолевые или раковые заболевания в связи с настоящим изобретением выбирают из группы, состоящей из глиобластомы, астроцитомы, медуллобластом, карцином молочной желе-

зы, немелкоклеточных карцином легких, карцином яичника, карцином предстательной железы, карцином центральной нервной системы. Более предпочтительно, опухолевое или раковое заболевание представляет собой мультиформную глиобластому (GBM) или анапластическую астроцитому. Метастатическое раковое заболевание может возникнуть в результате любого из вышеназванных заболеваний.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения или облегчения опухолевого или ракового заболевания или метастатического ракового заболевания, включающий этап субъекту, нуждающемуся в этом, конструкта антитела согласно настоящему изобретению или конструкта антитела, продуцированного согласно способу, описанному в настоящем изобретении.

Термин "субъект, нуждающийся в этом" или "нуждающийся в лечении" включает лиц, уже страдающих расстройством, а также лиц, у кого расстройство следует предотвратить. Термин "субъект" или "пациент" включает человека и других субъектов-млекопитающих, которые получают профилактическое или терапевтическое лечение.

Конструкт антитела согласно настоящему изобретению, в числе прочего, обычно рассчитан на конкретные пути и способы введения, конкретные дозировки и частоту введения, для конкретного лечения конкретных заболеваний, с определенными диапазонами биодоступности и сохранения в организме. Материалы композиции предпочтительно используют в концентрациях, приемлемых для области введения.

Таким образом, можно разработать составы и композиции в соответствии с настоящим изобретением для доставки посредством любого подходящего пути введения. В контексте настоящего изобретения пути введения включают наружный путь (например, кожный, ингаляционный, назальный, глазной, ушной, вагинальный, через слизистые оболочки);

энтеральные пути (например, пероральный, через желудочно-кишечный тракт, сублингвальный, сублабиальный, буккальный, ректальный); и

парентеральные пути (например, внутривенный, внутриартериальный, внутрикостный, внутримышечный, внутримозговой, интрацеребровентрикулярный, эпидуральный, интратекальный, подкожный, внутрибрюшинный, экстраамниотический, внутрисуставный, внутрисердечный, подкожный, внутриочаговый, внутриматочный, внутрипузырный, интравитреальный, трансдермальный, интраназальный, трансмукозальный, интрасиновиальный, внутрипросветный), но не ограничиваются ими.

Фармацевтические композиции и конструкт антитела согласно настоящему изобретению в особенности пригодны для парентерального введения, например, подкожной или внутривенной доставки, например, инъекции, например, болюсной инъекции, или путем вливания, например, непрерывного вливания.

Фармацевтические композиции можно вводить, используя медицинское устройство. Примеры медицинских устройств для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США № 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851; и 5399163.

В частности, в настоящем изобретении предложено непрерывное введение подходящей композиции. В качестве неограничивающего примера, непрерывное или по существу непрерывное, т.е. постоянное введение можно реализовать с помощью небольшой системы-насоса, носимой пациентом для регулирования притока терапевтического агента в организм пациента. Фармацевтическую композицию, содержащую конструкт антитела согласно настоящему изобретению, можно вводить с помощью указанных систем-насосов. Такие системы-насосы известны в данной области техники и обычно основаны на периодической замене картриджей, содержащих вливаемый терапевтический агент. При замене картриджей в такой системе-насосе возможен временный перерыв в остальных отношениях непрерывного потока терапевтического агента в организм пациента. В таком случае фазу введения перед заменой картриджа и фазу введения после замены картриджа по-прежнему следует рассматривать в контексте фармацевтических средств и способов согласно настоящему изобретению, совместно составляющих одно "непрерывное введение" такого терапевтического агента.

Постоянное или непрерывное введение конструктов антител согласно настоящему изобретению может быть внутривенным или подкожным за счет устройства доставки жидкости или небольшой системы-насоса, включающей механизм для приведения в движение жидкости из резервуара и механизм запуска для приведения приводного механизма в действие. Системы-насосы для подкожного введения могут содержать иглу или канюлю для проникновения через кожу пациента и доставки подходящей композиции в организм пациента. Указанные системы-насосы можно непосредственно зафиксировать или прикрепить к коже пациента независимо от вены, артерии или кровеносного сосуда, обеспечивая прямой контакт между системой-насосом и кожей пациента. Систему-насос можно прикрепить к коже пациента на срок от 24 ч до нескольких дней. Система-насос может быть небольшого размера с резервуаром для малых объемов. В качестве неограничивающего примера, объем резервуара для подходящей вводимой фармацевтической композиции может составлять от 0,1 до 50 мл.

Непрерывное введение также может быть трансдермальным за счет пластыря, носимого на коже и заменяемого через регулярные промежутки времени. Специалистам в данной области техники известно о пластырных системах для доставки лекарственного средства, пригодных для этой цели. Следует отметить, что трансдермальное введение особенно подходит для непрерывного введения, поскольку замену

первого закончившегося пластыря можно выполнить одновременно с размещением нового, второго пластыря, например, на поверхность кожи непосредственно возле первого закончившегося пластыря и непосредственно перед удалением первого закончившегося пластыря. Проблем с прерыванием потока или отказом источника питания не возникает.

В случае лиофилизированной фармацевтической композиции, лиофилизированный материал сначала восстанавливают в соответствующей жидкости перед введением. Лиофилизированный материал можно восстановить, например, в бактериостатической воде для инъекций (BWFI), физиологическом растворе, физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS) или том же составе, в котором белок находился до лиофилизации.

Композиции согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту в подходящей дозе, которую можно определить, например, в исследовании с увеличением дозы путем введения возрастающих доз конструктора антитела согласно настоящему изобретению, обладающего межвидовой перекрестной специфичностью, описанного в настоящем документе, приматам, не являющимся шимпанзе, например, макакам. Как указано выше, конструктор антитела согласно настоящему изобретению, обладающий межвидовой перекрестной специфичностью, описанного в настоящем документе, можно с успехом использовать в идентичной форме в доклинических исследованиях на приматах, не являющихся шимпанзе, и в качестве лекарственного средства для людей. Схему приема может определить лечащий врач с учетом клинических факторов. Как известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая размеры пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение, подлежащее введению, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие одновременно вводимые препараты.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения желательного эффекта. Термин "терапевтически эффективная доза" определяется как количество, достаточное для лечения или по меньшей мере частичного замедления развития заболевания и его осложнений у пациента, уже страдающего этим заболеванием. Количества или дозы, эффективные для такого применения, зависят от состояния, подлежащего лечению (медицинского показания), доставленного конструктора антитела, терапевтического контекста и целей, тяжести заболевания, предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на терапевтический агент, пути введения, размера (массы тела, поверхности тела или размера органа) и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента, и общего состояния иммунной системы пациента. Правильную дозу можно корректировать в соответствии с решением лечащего врача таким образом, чтобы ее можно было вводить пациенту однократно или в виде ряда введений, и в целях получения оптимального терапевтического эффекта.

Типичная дозировка может соответствовать диапазону от приблизительно 0,1 мкг/кг до приблизительно 30 мг/кг или более в зависимости от вышеуказанных факторов. В конкретных вариантах реализации дозировка может соответствовать диапазону от 1,0 мкг/кг до приблизительно 20 мг/кг, в необязательно от 10 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от 100 мкг/кг до приблизительно 5 мг/кг.

Терапевтически эффективное количество конструктора антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или профилактике нарушений или инвалидности вследствие заболевания. Для лечения EGFRvIII-экспрессирующих опухолей терапевтически эффективное количество конструктора антитела согласно настоящему изобретению, например, конструктора антитела против EGFRvIII/против CD3, предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80% или по меньшей мере приблизительно на 90% по сравнению с пациентами, не получавшими лечения. Способность соединения ингибировать опухолевый рост можно оценить на животной модели, позволяющей прогнозировать эффективность по отношению к опухолям человека.

Фармацевтическую композицию можно вводить в качестве единственного терапевтического средства или, при необходимости, в комбинации с дополнительными терапевтическими средствами, например, противораковыми терапевтическими средствами, например, другими белковыми и небелковыми лекарственными средствами. Эти лекарственные средства можно вводить одновременно с композицией, содержащей конструктор антитела согласно настоящему изобретению, описанной в настоящем документе, или по отдельности, до или после введения указанного конструктора антитела в определенные интервалы времени и в определенных дозах.

Термин "эффективная и нетоксичная доза" в настоящем документе относится к переносимой дозе конструктора антитела согласно настоящему изобретению, которая является достаточно высокой, чтобы вызвать уничтожение патологических клеток, устранение опухоли, уменьшение размеров опухоли или стабилизацию заболевания без или по существу без серьезных токсических эффектов. Такие эффективные и нетоксичные дозы можно определить, например, в исследованиях с увеличением дозы, описанных в данной области техники; они должны быть ниже дозы, вызывающей тяжелые нежелательные побочные

явления (токсичность, ограничивающая дозу, DLT).

Термин "токсичность" в настоящем документе относится к токсическим эффектам лекарственного вещества, проявляющихся в виде нежелательных явлений или тяжелых нежелательных явлений. Эти побочные явления могут относиться к непереносимости лекарственного вещества в целом и/или местной непереносимости после введения. Токсичность также может включать тератогенные или канцерогенные эффекты лекарственного вещества.

Термин "безопасность", "безопасность in vivo" или "переносимость" в настоящем документе определяет введение лекарственного вещества без серьезных нежелательных явлений непосредственно после введения (местная переносимость) и в течение более длительного периода применения лекарственного вещества. "Безопасность", "безопасность in vivo" или "переносимость" можно оценивать, например, через регулярные промежутки времени во время лечения и периода последующего наблюдения. Измерения включают клиническую оценку, например, проявления симптомов со стороны органов, и скрининг аномальных лабораторных показателей. Можно выполнить клиническую оценку и записать/кодировать отклонения от нормальных показателей в соответствии со стандартами NCI-CTC и/или MedDRA. Проявления со стороны органов могут включать такие критерии, как аллергия/иммунология, кровь/ костный мозг, сердечная аритмия, свертывание и т.п., как указано, например, в терминологии распространенных критериев нежелательных явлений (Common Terminology Criteria for adverse events v3. 0, CTCAE). Проверяемые лабораторные показатели включают, например, гематологию, клиническую биохимию, профиль свертывания и анализ мочи и исследование других биологических жидкостей, например, сыворотки, плазмы, лимфоидной или спинномозговой жидкости, ликвора и т.п. Таким образом, безопасность можно оценивать, например, с помощью физикального обследования, методик визуализации (например, УЗИ, рентгеноскопии, КТ, магнитно-резонансной томографии (МРТ), других показателей, измеряемых с применением технических устройств (т.е. электрокардиограммы), жизненно важных показателей, измерения лабораторных параметров и регистрации нежелательных явлений. Например, нежелательные явления у приматов, не являющихся шимпанзе, при использовании вариантов применения и способов согласно настоящему изобретению можно исследовать с помощью гистопатологических и/или гистохимических способов.

Вышеуказанные термины также упоминаются, например, в руководстве Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived Pharmaceuticals S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; собрание организационного комитета ICH 16 июля 1997 г.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предложен набор, содержащий конструкт антитела согласно настоящему изобретению, конструкт антитела, полученный в соответствии со способом согласно настоящему изобретению, полинуклеотид согласно настоящему изобретению, вектор согласно настоящему изобретению и/или клетку-хозяина согласно настоящему изобретению.

В контексте настоящего изобретения термин "набор" означает два или более из компонентов, один из которых, соответствует конструкту антитела, фармацевтической композиции, вектору или клетке-хозяину согласно настоящему изобретению, совместно упакованные в контейнере, емкости или иным образом. Соответственно, набор можно описать как набор продуктов и/или принадлежностей, достаточный для достижения определенной цели, который можно продавать как единое целое.

Набор может содержать одну или более из емкостей (например, флаконов, ампул, контейнеров, шприцев, бутылок, пакетов) любой соответствующей формы, размера и из любого материала (предпочтительно водонепроницаемого, например, пластмассы или стекла), содержащую конструкт антитела или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению в соответствующей дозировке для введения (см. выше). Набор может дополнительно содержать инструкции по применению (например, в виде листовки или инструкции по эксплуатации), средство для введения конструкта антитела согласно настоящему изобретению, например, шприц, насос, инфузионную помпу и т. п., средство для восстановления конструкта антитела согласно настоящему изобретению и/или средство для разбавления конструкта антитела согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предложен набор для блока введения однократной дозы. Набор согласно настоящему изобретению может также содержать первую емкость, содержащую высушенный/лиофилизированный конструкт антитела, и вторую емкость, содержащую водный состав. В определенных вариантах реализации настоящего изобретения также предложены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью и шприцы с лиофилизатом).

На фигурах показаны:

фиг. 1 - схематическое представление EGFRvIII, представляющего собой опухоль-специфический мутант EGFR с делецией 267 аминокислот на N-конце, обнаруженный в глиобластоме;

фиг. 2 - сравнение последовательностей агента EvIII-2, связывающего мишень, и его производного EvIII-1 с ковалентно соединенными V-областями;

фиг. 3 - очистка EvIII-1 и EvIII-2 после стандартного пилотного производства;

фиг. 4 - мономер EvIII-1 и EvIII-2: Электрофорез в восстанавливающем ДСН-ПААГ;

фиг. 5 - перекрестная реакционная способность биспецифических конструктов антител EvIII-1 и

EvIII-2 согласно проточной цитометрии: связывание с EGFRvIII человека и макака и CD3;

фиг. 6 - связывание биспецифических конструкторов антител EvIII-1 и EvIII-2 с клетками, трансфицированными EGFRvIII, а также клетками линии глиобластомы человека U87;

фиг. 7 - цитотоксическая активность стимулированных CD8 Т-клеток человека против клеток CHO, трансфицированных EGFRvIII человека. Анализ 18-часового высвобождения <sup>51</sup>хрома. Эффекторные клетки: стимулированные обогащенные CD8 Т-клетки человека. Клетки-мишени: клетки CHO, трансфицированные EGFRvIII. Соотношение эффекторных клеток и мишеней (E: T): 10:1;

фиг. 8 - цитотоксическая активность стимулированных CD8 Т-клеток человека против клеток линии глиобластомы человека U87: (а) анализ 18-часового высвобождения <sup>51</sup>хрома. Эффекторные клетки: стимулированные обогащенные CD8 Т-клетки человека. Клетки-мишени: высокоположительные по отношению к vIII клетки U87. Соотношение эффекторных клеток и мишеней (E: T) : 10:1; (b) 18-часовой анализ на основе FACS. Эффекторные клетки: стимулированные обогащенные CD8 Т-клетки человека. Клетки-мишени: Высокоположительные по отношению к EGFRvIII человека клетки глиомы U87. Соотношение эффекторных клеток и мишеней (E: T) : 10:1;

фиг. 9 - цитотоксическая активность стимулированных CD8 Т-клеток человека против линии опухолевых клеток человека, экспрессирующих нативный антиген EGFRvIII: линия клеток глиобластомы DK-MG: анализ 18-часового высвобождения <sup>51</sup>хрома. Эффекторные клетки: стимулированные обогащенные CD8 Т-клетки человека. Клетки-мишени: клетки DK-MG. Соотношение эффекторных клеток и мишеней (E: T): 10:1;

фиг. 10 - цитотоксическая активность линии Т-клеток макака против клеток CHO, трансфицированных EGFRvIII человека: 48-часовой анализ цитотоксичности на основе FACS. Эффекторные клетки: CD3+ LpRx4119 макака. Клетки-мишени: клетки CHO, трансфицированные EGFRvIII макака. Соотношение эффекторных клеток и мишеней (E: T) : 10:1;

фиг. 11 - стабильность биспецифических конструкторов антител после инкубации в плазме человека в течение 24 ч: анализ 18-часового высвобождения <sup>51</sup>Cr. Эффекторные клетки: стимулированные обогащенные CD8 Т-клетки человека. Клетки-мишени: Клетки CHO, трансфицированные EGFRvIII человека. Соотношение эффекторных клеток и мишеней (E: T) : 10:1 конструкторы антител в соответствии с обозначениями;

фиг. 12 - однородность белка конструкторов антител EGFRvIII, проанализированная с помощью катионообменной хроматографии с высоким разрешением CIEХ;

фиг. 13 - гидрофобность поверхности биспецифических конструкторов антител, проверенная путем гидрофобной хроматографии НИС в проточном режиме;

фиг. 14 - преобразование мономеров в димеры после 7 дней инкубации в концентрации 250 мкг/мл при 37°C. Анализ с помощью ВЭЭХ;

фиг. 15 - преобразование мономеров в димеры после трех циклов замораживания/размораживания в концентрации 250 мкг/мл при 37°C. Анализ с помощью ВЭЭХ;

фиг. 16 - FACS-анализ связывания конструктора EvIII-1xCD3-scFc с клетками CHO, трансфицированными EGFR человека, а также линией CD3+Т-клеток человека HPBaLL. Красная линия представляет собой клетки, инкубированные с 2 мкг/мл очищенного мономерного белка, которые затем инкубировали с антителом мыши против I2C и PE-меченным обнаруживающим антителом козы против IgG мыши. Черная линия гистограммы отражает отрицательный контроль: клетки, инкубированные только с антителом против I2C, а также PE-меченным обнаруживающим антителом;

фиг. 17 - цитотоксическая активность, индуцированная конструктором EvIII-1xCD3-scFc и перенаправленная на CD56-обедненные нестимулированные МПК человека в качестве эффекторных клеток и клетки CHO, трансфицированные EGFR человека, в качестве клеток-мишеней (Пример 1.2).

### Примеры

Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение. Не следует считать, что эти примеры ограничивают рамки данного изобретения. Настоящее изобретение ограничено только формулой изобретения.

Пример 1. Цитотоксическая активность.

Эффективность биспецифических конструкторов антител EGFRvIIIxCD3 согласно настоящему изобретению при перенаправлении эффекторных Т-клеток против EGFRvIII-экспрессирующих клеток-мишеней анализировали в пяти анализах цитотоксичности *in vitro*.

Эффективность биспецифических конструкторов антител EGFRvIIIxCD3 при перенаправлении стимулированных CD8+ эффекторных Т-клеток человека против клеток CHO, трансфицированных EGFRvIII человека, измеряли: и в анализе 18-часового высвобождения <sup>51</sup>Cr (соотношение эффектормишени 10:1). Фиг. 7.

Эффективность биспецифических конструкторов антител EGFRvIIIxCD3 при перенаправлении стимулированных CD8+ эффекторных Т-клеток человека против EGFRvIII-положительных клеток линии глиобластомы человека U87 измеряли в анализе 18-часового высвобождения <sup>51</sup>Cr (соотношение эффекторы: мишени 10:1). Фиг. 8.

Эффективность биспецифических конструкторов антител EGFRvIIIxCD3 при перенаправлении Т-клеток в нестимулированных МПК человека (CD14<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup>) против клеток CHO, трансфицированных EGFRvIII человека, измеряли в отсутствие и в присутствии растворимого EGFRvIII в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS (соотношение эффекторы: мишени 10:1). Фиг. 6 и табл.6.

Эффективность биспецифических конструкторов антител EGFRvIIIxCD3 при перенаправлении Т-клеток в нестимулированных МПК человека (CD14<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup>) против EGFRvIII-положительных клеток линии глиобластомы человека U87 измеряли в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS. Фиг. 8.

Для подтверждения способности биспецифических конструкторов антител EGFRvIIIxCD3 с перекрестной реакционной способностью перенаправлять Т-клетки макака против клеток CHO, трансфицированных EGFRvIII макака, выполнили 48-часовой анализ цитотоксичности на основе FACS с применением линии Т-клеток макака LpRx4119 в качестве эффекторных Т-клеток (соотношение эффекторы: мишени 10:1). Фиг. 10.

Пример 1.1. Анализ высвобождения хрома с использованием стимулированных Т-клеток человека.

Стимулированные Т-клетки, обогащенные CD8<sup>+</sup> Т-клетками, получили следующим образом. Чашку Петри (диаметр 145 мм, Greiner bio-one GmbH, Kremsmunster) покрывали коммерчески доступным специфическим антителом против CD3 (ОКТ3, Orthoclone) в конечной концентрации 1 мкг/мл в течение 1 часа при 37°C. Несвязанный белок удаляли одноэтапной промывкой PBS. 3-5×10<sup>7</sup> МПК человека добавляли в заранее покрытую чашку Петри в 120 мл среды RPMI 1640 с стабилизированным глутамином/10% FCS/ИЛ-2, 20 ед/мл (Proleukin®, Chiron) и стимулировали в течение 2 дней. На третий день клетки собирали и однократно промывали RPMI 1640. ИЛ-2 добавляли до конечной концентрации 20 ед/мл, и клетки повторно культивировали в течение одного дня в той же культуральной среде, как описано выше. Цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты (ЦТЛ) обогащали путем уничтожения CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD56<sup>+</sup> НК-клеток с использованием гранул Dynal-Beads в соответствии с протоколом производителя.

Клетки-мишени CHO, трансфицированные EGFRvIII яванского макака или EGFRvIII человека, дважды промывали PBS и метили 11,1 МБк <sup>51</sup>Cr в конечном объеме 100 мкл среды RPMI с 50% FCS в течение 60 мин при 37°C. Впоследствии меченые клетки-мишени 3 раза промывали 5 мл RPMI, а затем использовали в анализе цитотоксичности. Анализ выполняли в 96-луночном планшете в общем объеме 200 мкл среды RPMI с добавками при отношении Е: Т 10:1. Использовали исходную концентрацию 0,01-1 мкг/мл очищенного биспецифического конструктора антитела и ее трехкратные разведения. Время инкубации для анализа составляло 18 ч. Цитотоксичность определяли как относительные значения высвобожденного хрома в супернатанте по сравнению с максимальным лизисом (добавление тритон-Х) и спонтанным лизисом (без клеток-эффекторов). Все измерения выполняли в четырех повторностях.

Измерение активности хрома в супернатанте выполняли в гамма-счетчике Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Кельн, Германия). Анализ результатов выполняли в Prism 5 for Windows (версии 5.0, GraphPad Software Inc., Сан-Диего, штат Калифорния, США). Значения EC50, рассчитанные с помощью программы анализа на основании сигмоидных кривых "доза-ответ", использовали для сравнения цитотоксической активности.

Пример 1.2. Эффективность перенаправления стимулированных эффекторных Т-клеток человека против клеток CHO, трансфицированных EGFRvIII человека.

Цитотоксическую активность биспецифических конструкторов антител EGFRvIIIxCD3 в соответствии с настоящим изобретением анализировали в анализе цитотоксичности на основе высвобождения 51-хрома (<sup>51</sup>Cr) с использованием клеток CHO, трансфицированных EGFRvIII человека, в качестве клеток-мишеней, и стимулированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток человека в качестве эффекторных клеток. Эксперимент выполнили согласно описанию в примере 1.1.

Биспецифические конструкторы антител EGFRvIIIxCD3 продемонстрировали очень высокую цитотоксическую активность по отношению к клеткам CHO, трансфицированных EGFRvIII человека, в диапазоне единиц пикомоль.

Пример 1.3. Эффективность перенаправления стимулированных эффекторных Т-клеток человека против EGFRvIII-положительных клеток линии глиобластомы человека DK-MG.

Цитотоксическую активность биспецифических конструкторов антител EGFRvIIIxCD3 анализировали в анализе цитотоксичности на основе высвобождения <sup>51</sup>-хрома (<sup>51</sup>Cr) с использованием EGFRvIII-положительных клеток линии глиобластомы человека DK-MG в качестве источника клеток-мишеней, и стимулированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток человека в качестве эффекторных клеток. Анализ выполнили согласно описанию в примере 1.1.

В соответствии с результатами анализа высвобождения 51-хрома при использовании стимулированных обогащенных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов человека в качестве эффекторных клеток и клеток CHO, трансфицированных EGFRvIII человека, в качестве клеток-мишеней, биспецифические конструкторы антител EGFRvIIIxCD3 согласно настоящему изобретению также демонстрировали мощную цитотоксическую активность по отношению к клеткам-мишеням, естественным образом экспрессирующим антиген; см. фиг. 9.

Пример 1.4. Анализ цитотоксичности на основе FACS с использованием нестимулированных МПК человека.

Выделение эффекторных клеток.

Мононуклеары периферической крови (МПК) человека получили центрифугированием в градиенте плотности Ficoll из фракции обогащенных лимфоцитов (лейкотромбоцитарного слоя) - побочного продукта при сборе крови для переливаний на донорных пунктах. Лейкотромбоцитарную фракцию предоставил местный донорный пункт, МПК получили в день сбора крови. После центрифугирования в градиенте плотности Ficoll и интенсивной промывки PBS по Дульбекко (Gibco) остаточные эритроциты удалили из МПК инкубированием в буфере для лизиса эритроцитов (155 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 10 мМ KHCO<sub>3</sub>, 100 мкМ ЭДТА). Тромбоциты удалили с супернатантом путем центрифугирования МПК при 100×g. Оставшиеся лимфоциты в основном включали В- и Т-лимфоциты, NK-клетки и моноциты. МПК хранили в культуре при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в среде RPMI (Gibco) с 10% FCS (Gibco).

Уничтожение CD14<sup>+</sup> и CD56<sup>+</sup> клеток.

Для уничтожения CD14<sup>+</sup> клеток использовать микрогранулы CD14 человека (Milteny Biotec, MACS, #130-050-201), для уничтожения NK-клеток - микрогранулы CD56 (MACS, #130-050-401). МПК подсчитывали и центрифугировали в течение 10 мин при комнатной температуре и 300×g. Супернатант выбрасывали, клеточный осадок ресуспендировали в MACS-буфере для выделения [80 мкл/10<sup>7</sup> клеток; PBS (Invitrogen, #20012-043), 0,5% (об/об) FBS (Gibco, #10270-106), 2 мМ ЭДТА (Sigma-Aldrich, #E-6511)]. Добавляли микрогранулы CD14 и микрогранулы CD56 (20 мкл/10<sup>7</sup> клеток) и инкубировали в течение 15 мин при 4-8°C. Клетки промывали MACS-буфером для выделения (1-2 мл/10<sup>7</sup> клеток). После центрифугирования (см. выше) супернатант выбрасывали, а клетки ресуспендировали в MACS-буфере для выделения (500 мкл/10<sup>8</sup> клеток). Затем выделяли CD14/CD56-отрицательные клетки с использованием колонки LS (Milteny Biotec, #130-042-401). МПК без CD14<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> клеток культивировали в полной среде RPMI, т.е. RPMI1640 (Biochrom AG, #FG1215) с добавлением 10% FBS (Biochrom AG, #S0115), 1× раствора неосновных аминокислот (Biochrom AG, #K0293), 10 мМ HEPES-буфера (Biochrom AG, #L1613), 1 мМ пирувата натрия (Biochrom AG, #L0473) и 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина (Biochrom AG, #A2213) при 37°C в инкубаторе до использования.

Мечение клеток-мишеней.

Для анализа лизиса клеток в проточно-цитометрической анализе использовали флуоресцентный мембранный краситель DiO<sub>18</sub> (DiO) (Molecular Probes, #V22886) для мечения клеток CHO, трансфицированных EGFRVIII человека или EGFRVIII макака и используемых в качестве клеток-мишеней и для различения их и эффекторных клеток. Вкратце, клетки собирали, однократно промывали PBS и доводили до концентрации 10<sup>6</sup> клеток/мл в PBS, содержащем 2% (об/об) FBS и мембранный краситель DiO (5 мкл/10<sup>6</sup> клеток). После инкубации в течение 3 минут при 37°C клетки дважды промывали полной средой RPMI и доводили количество клеток до 1,25×10<sup>5</sup> клеток/мл. Жизнеспособность клеток определяли с помощью 0,5% (об/об) изотонического раствора EosinG (Roth, #45380).

Анализ на основе проточной цитометрии.

Этот анализ был разработан для количественного определения лизиса клеток CHO, трансфицированных EGFRVIII яванского макака или человека в присутствии серийных разведений биспецифических конструкторов антител против EGFRVIII. Равные объемы клеток-мишеней, меченых DiO, и клеток-эффекторов (т.е. МПК без CD14<sup>+</sup> клеток) перемешивали, получая соотношение Е:Т клеток 10:1. 160 мкл этой суспензии переносили в каждую лунку 96-луночного планшета. Добавляли 40 мкл серийных разведений биспецифических конструкторов антител EGFRVIIIхCD3 и отрицательных контрольных биспецифических антител (биспецифических конструкторов антител на основе CD3, распознающих неродственный антиген-мишень) или полной среды RPMI в качестве дополнительного отрицательного контроля. Цитотоксическая реакция, опосредованная биспецифическим антителом, шла в течение 48 ч в увлажняемом инкубаторе с 7% CO<sub>2</sub>. Затем клетки переносили в новый 96-луночный планшет и отслеживали потерю целостности мембран клеток-мишеней путем добавления йодида пропидия (PI) в конечной концентрации 1 мкг/мл. PI является красителем, не проходящим через мембрану, который обычно отсутствует в жизнеспособных клетках, в то время как мертвые клетки захватывают его, что позволяет выявлять их за счет излучения флуоресценции.

Образцы измеряли проточной цитометрией на приборе FACSCanto II и анализировали с помощью программного обеспечения FACSDiva (Becton Dickinson). Клетки-мишени определяли как DiO-положительные клетки. PI-отрицательные клетки-мишени классифицировали как живые клетки-мишени. Процентную цитотоксичность рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Цитотоксичность}[\%]= \frac{n \text{ мертвых клеток-мишеней}}{n \text{ клеток-мишеней}} \times 100$$

n=количество событий.

С помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software, Сан-Диего) строили график зависимости процентной цитотоксичности наносили от концентрации биспецифического конструктора антитела. Кривые "доза-ответ" исследовали с использованием модели четырехпараметрической

логистической регрессии для оценки сигмовидных кривых "доза-ответ" с фиксированным коэффициентом угла наклона Хилла и рассчитали значения  $EC_{50}$ .

Пример 1.5. Эффективность перенаправления нестимулированных МПК человека против клеток CHO, трансфицированных EGFRVIII человека, в присутствии и при отсутствии растворимого EGFRVIII.

Цитотоксическую активность биспецифических конструкторов антител EGFRVIIIxCD3 анализировали в анализе цитотоксичности на основе FACS с использованием клеток CHO, трансфицированных EGFRVIII человека, в качестве клеток-мишеней, и нестимулированных МПК человека в качестве эффекторных клеток. Анализ выполнили согласно описанию в примере 1.4 выше.

В соответствии с ожиданиями, значения  $EC_{50}$  были, как правило, выше при анализах цитотоксичности с использованием нестимулированных МПК в качестве эффекторных клеток по сравнению с анализом цитотоксичности с использованием стимулированных CD8+ Т-клеток человека (см. пример 1.2).

Пример 1.6. Эффективность перенаправления нестимулированных МПК человека против EGFRVIII-положительных клеток линии глиобластомы человека U87 или DK-MG.

Цитотоксическую активность биспецифических конструкторов антител EGFRVIIIxCD3 дополнительно анализировали в анализе цитотоксичности на основе FACS с использованием EGFRVIII-положительных клеток линии глиобластомы человека U87 или DK-MG в качестве источника клеток-мишеней и нестимулированных МПК человека в качестве эффекторных клеток. Анализ выполнили согласно описанию в Примере 1.4 выше. Результаты показаны на фиг. 8 и 9.

Пример 1.7. Эффективность перенаправления Т-клеток макака против клеток CHO, экспрессирующих EGFRVIII макака.

Цитотоксическую активность биспецифических конструкторов антител EGFRVIIIxCD3 анализировали в анализе цитотоксичности на основе FACS с использованием клеток CHO, трансфицированных EGFRVIII макака (яванского макака), в качестве клеток-мишеней, и линии Т-клеток макака 4119LpRx (Knarre et al. Blood 95: 3256-61 (2000)) в качестве источника эффекторных клеток. Мечение клеток-мишеней (клеток CHO, трансфицированных EGFRVIII макака) и анализ цитотоксической активности на основе высвобождения  $^{51}Ct$  выполняли, как описано выше.

Результаты показаны на фиг. 10. Индуцированные Т-клетки макака из линии 4119LpRx эффективно уничтожали клетки CHO, трансфицированные EGFRVIII макака, за счет биспецифических конструкторов антитела EGFRVIIIxCD3 согласно настоящему изобретению.

Пример 1.8. Разрыв эффективности между мономерной и димерной изоформами биспецифических конструкторов антитела.

С целью определения различий в цитотоксической активности между мономерной и димерной изоформами отдельных биспецифических конструкторов антител EGFRVIIIxCD3 (называемых разрывом эффективности) выполнили 18-часовой анализ цитотоксической активности на основе высвобождения 51-хрома, как описано выше (пример 1.1), с использованием очищенных мономерного и димерного биспецифического конструктора антитела. Эффекторные клетки представляли собой стимулированные обогащенные CD8+ Т-клетки человека. Клетки-мишени представляли собой клетки CHO, трансфицированные EGFRVIII человека. Соотношение эффекторных клеток и мишеней (Е: Т) составляло 10:1. Разрыв эффективности рассчитывали как соотношение между значениями  $EC_{50}$ .

Пример 2. Стабильность после инкубации в плазме человека в течение 24 ч.

Очищенные биспецифические конструкторы антител инкубировали при соотношении 1:5 в объединенной плазме человека при 37°C в течение 96 ч при конечной концентрации 2-20 мкг/мл. После инкубации в плазме конструкторы антител сравнивали в анализе на основе высвобождения 51-хрома с использованием стимулированных обогащенных CD8+ Т-клеток человека и клеток CHO, трансфицированных EGFRVIII человека, в исходной концентрации 0,01-0,1 мкг/мл и при соотношении эффекторных клеток и мишеней (Е:Т) 10:1 (анализ, описанный в примере 1.1). Неинкубированные свежеразмороженные биспецифические конструкторы антител использовали в качестве контролей.

Результаты показаны на фиг. 11; конструктор антитела EvIII-2 характеризовался стабильностью в плазме ( $EC_{50}$  в плазме/ $EC_{50}$  контрольная), приблизительно равной 2. Как ни странно, биспецифический конструктор антитела согласно настоящему изобретению, по существу, не демонстрировал конверсии.

Пример 3. Однородность белка согласно катионообменной хроматографии с высоким разрешением.

Однородность белка конструкторов антител согласно настоящему изобретению анализировали с помощью катионообменной хроматографии с высоким разрешением CIEХ.

50 мкг мономерного конструктора антитела разбавляли 50 мл связывающего буфера А (20 мМ дигидрофосфата натрия, 30 мМ NaCl, 0,01% октаноата натрия, pH 5,5), и 40 мл этого раствора наносили на 1-мл колонку BioPro SP-F (YMC, Германия), присоединенную к устройству Akta Micro FPLC (GE Healthcare, Германия). После связывания образца выполняли этап промывки дополнительным связывающим буфером. Для элюирования белка использовали линейно возрастающий градиент соли с использованием буфера В (20 мМ дигидрофосфата натрия, 1000 мМ NaCl, 0,01% октаноата натрия, pH 5,5) до 50% буфера В в количестве 10 объемов колонки. Полный цикл анализа отслеживали по оптической плотности при длине волны 280, 254 и 210 нм. Анализ выполняли путем интегрирования пика сигнала при 280 нм, зарегистрированного в листе оценки программного обеспечения Akta Unicorn.

Результаты показаны на фиг. 12. Почти все протестированные конструкторы антител обладали очень благоприятной гомогенностью, составлявшей  $\geq 95\%$  (площадь под кривой (= ППК) основного пика).

Пример 4. Гидрофобность поверхности согласно измерениям НИС-бутил.

Гидрофобность поверхности биспецифических конструкторов антител согласно настоящему изобретению проверяли с помощью гидрофобной хроматографии НИС в проточном режиме.

50 мкг мономерного конструктора антитела разбавляли обычным буфером для состава до конечного объема 500 мкл (10 мМ лимонной кислоты, 75 мМ лизина-НСI, 4% трегалозы, рН 7,0) и наносили на 1-мл колонку FF с бутилсефарозой (GE Healthcare, Германия), присоединенную к системе Akta Purifier FPLC (GE Healthcare, Германия). Полный цикл анализа отслеживали по оптической плотности при длине волны 280, 254 и 210 нм. Анализ выполняли путем интегрирования пика сигнала при 280 нм, зарегистрированного в листе оценки программного обеспечения Akta Unicorn. Поведение при элюировании оценивали путем сравнения площади и скорости нарастания и спада сигнала белка, указывающей на силу взаимодействия гибрида ViTE-альбумин с матрицей.

Конструкторы антител характеризовались хорошим поведением при элюировании, которое в большинстве случаев было быстрым и полным; см. фиг. 13.

Пример 5. Преобразование мономеров в димеры после (i) трех циклов замораживания/размораживания и (ii) 7 дней в концентрации 250 мкг/мл.

Биспецифические мономерные конструкторы антител EGFRVIIIхCD3 подвергали различным стрессовым условиям с последующей высокоэффективной ЭХ с целью определения процентной доли исходно мономерного конструктора антитела, преобразованного в димерный конструктор антитела.

(i) 25 мкг мономерного конструктора антитела доводили до концентрации 250 мкг/мл обычным буфером для состава и затем замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин с последующим размораживанием в течение 30 мин при комнатной температуре. После трех циклов замораживания/размораживания определяли содержание димера посредством ВЭЭХ.

(ii) 25 мкг мономерного конструктора антитела доводили до концентрации 250 мкг/мл обычным буфером для состава с последующей инкубацией при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 7 дней. Содержание димера определяли посредством ВЭЭХ.

Колонку TSK Gel G3000 SWXL для ЭХ с высоким разрешением (Tosoh, Токио, Япония) присоединяли к Akta Purifier 10 FPLC (GE Lifesciences), оборудованному автоматическим пробоотборником A905. Буфер для уравнивания колонки и анализа состоял из 100 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -200 мМ  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , доведенного до рН 6,6. Раствора антитела (25 мкг белка) наносили на уравновешенную колонку и выполняли элюирование при скорости потока 0,75 мл/мин и максимальном давлении 7 МПа. Полный цикл анализа отслеживали по оптической плотности при длине волны 280, 254 и 210 нм. Анализ выполняли путем интегрирования пика сигнала при 210 нм, зарегистрированного в листе оценки программного обеспечения Akta Unicorn. Содержание димера рассчитывали путем деления площади пика димера на общую площадь пиков мономера и димера.

Результаты показаны на фиг. 14 и 15 ниже. Биспецифические конструкторы антител EVIII-1хCD3 согласно настоящему изобретению демонстрировали процентное содержание димера 0,59% после трех циклов замораживания/размораживания (фиг. 15) и процентное содержание димера 0,26% после 7 дней инкубации при  $37^{\circ}\text{C}$ , в то время как биспецифический конструктор антитела EvIII-1хCD3 демонстрировал более высокие значения 1,56% через 7 дней и 2,53% после трех циклов замораживания/размораживания.

Пример 6. Термостабильность.

Температуру агрегации антитела определяли следующим образом: 40 мкл раствора конструктора антитела в концентрации 250 мкг/мл переносили в одноразовую кювету и помещали в устройство динамического светорассеяния DynaPro Nanostar (Wyatt). Образец нагревали от  $40^{\circ}\text{C}$  до  $70^{\circ}\text{C}$  со скоростью нагревания  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  при постоянном измерении радиуса. Увеличение радиуса указывало на плавление белка; программное обеспечение, поставленное с устройством DLS, использовало агрегацию для расчета температуры агрегации конструктора антитела.

Таблица 2. Термостабильность биспецифических конструкторов антител согласно DLS (динамическому светорассеянию)

EGFRVIII HALB ViTE	Термостабильность DLS $T_A$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]
EvIII-1	51,6
EvIII-2	51,2

Пример 7. Мутность при концентрации антитела 2500 мкг/мл.

1 мл раствора очищенного конструктора антитела в концентрации 250 мкг/мл концентрировали путем центрифугирования до 2500 мкг/мл. Через 16 ч хранения при  $5^{\circ}\text{C}$  определяли мутность раствор антител путем измерения оптической плотности OD340 нм против обычного буфера состава.

Результаты представлены ниже в табл. 3. В то время как конструктор антитела EvIII-1 согласно настоящему изобретению обладал чрезвычайно благоприятной мутностью, равной  $\leq 0,03$ , конструктор антитела EvIII-2 демонстрировал значительную мутность, что указывало на менее благоприятные характери-

стики состава этой молекулы в фармацевтической композиции.

Таблица 3. Мутность конструкторов антител после концентрирования до 2,5 мг/мл в течение ночи

EGFRVIII HALB BiTE	Мутность через 16 ч при 2500 мкг/мл [OD340]
EvIII-1	0,029
EvIII-2	2,87

SEQ ID NO:	Описание	Источник	Последовательность
1.	Пептидный линкер	искусственная последовательность	GGGG
2.	Пептидный линкер	искусственная последовательность	GGGGS
3.	Пептидный линкер	искусственная последовательность	GGGGQ
4.	Пептидный линкер	искусственная последовательность	PGGGGS
5.	Пептидный линкер	искусственная последовательность	PGGDGS
6.	Пептидный линкер	искусственная последовательность	SGGGGS
7.	Пептидный линкер	искусственная последовательность	GGGGSGGGS
8.	Пептидный линкер	искусственная последовательность	GGGGSGGGGS
9.	Пептидный линкер	искусственная последовательность	GGGGSGGGSGGGGS
10.	Гексагистидин	искусственная последовательность	HHHHHH
11.	CDR-L1 F6A	искусственная последовательность	GSSTGAVTSGYYPN
12.	CDR-L2 F6A	искусственная последовательность	GTKFLAP
13.	CDR-L3 F6A	искусственная последовательность	ALWYSNRWV
14.	CDR-H1 F6A	искусственная последовательность	IYAMN
15.	CDR-H2 F6A	искусственная последовательность	RIRSKYNNYATYYADSVKS
16.	CDR-H3 F6A	искусственная последовательность	HGNFGNSYVSFFAY
17.	VH F6A	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNIIYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYICVRHGNFGNSYVSFFAYWGQGLTIVTS
18.	VL F6A	искусственная последовательность	QTVVTTQEPSTLTVSPGGTITLTCGSSGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
19.	VH-VL F6A	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNIIYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYICVRHGNFGNSYVSFFAYWGQGLTIVTS SGGGSGGGSGGGGSQTVVTTQEPSTLTVSPGGTITLTCGSSGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
			RLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
20.	CDR-L1 H2C	искусственная последовательность	GSSTGAVTSGYYPN
21.	CDR-L2 H2C	искусственная последовательность	GTKFLAP
22.	CDR-L3 H2C	искусственная последовательность	ALWYSNRWV
23.	CDR-H1 H2C	искусственная последовательность	KYAMN
24.	CDR-H2 H2C	искусственная последовательность	RIRSKYNNYATYYADSVKD
25.	CDR-H3 H2C	искусственная последовательность	HGNFGNSYISYWAY
26.	VH H2C	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNIIYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYICVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTIVTS
27.	VL H2C	искусственная последовательность	QTVVTTQEPSTLTVSPGGTITLTCGSSGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
28.	VH-VL H2C	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNIIYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYICVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTIVTS SGGGSGGGSGGGGSQTVVTTQEPSTLTVSPGGTITLTCGSSGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
29.	CDR-L1 H1E	искусственная последовательность	GSSTGAVTSGYYPN
30.	CDR-L2 H1E	искусственная последовательность	GTKFLAP
31.	CDR-L3 H1E	искусственная последовательность	ALWYSNRWV
32.	CDR-H1 H1E	искусственная последовательность	SYAMN
33.	CDR-H2 H1E	искусственная последовательность	RIRSKYNNYATYYADSVKG
34.	CDR-H3 H1E	искусственная последовательность	HGNFGNSYLSFWAY
35.	VH H1E	искусственная последовательность	EVQLVESGGLEQPGGSLKLSCAASGFTFNIIYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYICVRHGNFGNSYLSFWAYWGQGLTIVTS
36.	VL H1E	искусственная последовательность	QTVVTTQEPSTLTVSPGGTITLTCGSSGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL

37.	VH-VL H1E	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLEQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSFWAYWGQGLTIVTS SGGGSGGGGSGGGGSGTAVTQEPSTLTVSPGGTTLTCCSSTGAVTSGYYPNWWQKPGQAP RGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGDKLTV L
38.	CDR-L1 G4H	искусственная последовательность	GSSTGAVTSGYYPN
39.	CDR-L2 G4H	искусственная последовательность	GTKFLAP
40.	CDR-L3 G4H	искусственная последовательность	ALWYSNRWV
41.	CDR-H1 G4H	искусственная последовательность	RYAMN
42.	CDR-H2 G4H	искусственная последовательность	RIRSKYNNYATYYADSVKG
43.	CDR-H3 G4H	искусственная последовательность	HGNFGNSYLSYFAY
44.	VH G4H	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYFAYWGQGLTIVTS S
45.	VL G4E	искусственная последовательность	QTVVTQEPSTLTVSPGGTTLTCCSSTGAVTSGYYPNWWQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA RFGSLLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGDKLTVL
46.	VH-VL G4H	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYFAYWGQGLTIVTS SGGGSGGGGSGGGGSGTAVTQEPSTLTVSPGGTTLTCCSSTGAVTSGYYPNWWQKPGQAP RGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGDKLTV L
47.	CDR-L1 A2J	искусственная последовательность	RSSTGAVTSGYYPN
48.	CDR-L2 A2J	искусственная последовательность	ATDMRPS
49.	CDR-L3 A2J	искусственная последовательность	ALWYSNRWV
50.	CDR-H1 A2J	искусственная последовательность	VYAMN
51.	CDR-H2 A2J	искусственная последовательность	RIRSKYNNYATYYADSVKK
52.	CDR-H3 A2J	искусственная последовательность	HGNFGNSYLSWWAY
53.	VH A2J	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWWAYWGQGLTIVTS S
54.	VL A2J	искусственная последовательность	QTVVTQEPSTLTVSPGGTTLTCSRSTGAVTSGYYPNWWQKPGQAPRGLIGATDMRPSGTPA RFGSLLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGDKLTVL
55.	VH-VL A2J	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWWAYWGQGLTIVTS SGGGSGGGGSGGGGSGTAVTQEPSTLTVSPGGTTLTCSRSTGAVTSGYYPNWWQKPGQAP RGLIGATDMRPSGTPARFSGSLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGDKLTV L
56.	CDR-L1 E1L	искусственная последовательность	GSSTGAVTSGYYPN
57.	CDR-L2 E1L	искусственная последовательность	GTKFLAP
58.	CDR-L3 E1L	искусственная последовательность	ALWYSNRWV
59.	CDR-H1 E1L	искусственная последовательность	KYAMN
60.	CDR-H2 E1L	искусственная последовательность	RIRSKYNNYATYYADSVKS
61.	CDR-H3 E1L	искусственная последовательность	HGNFGNSYTSYYAY
62.	VH E1L	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYTSYYAYWGQGLTIVTS S
63.	VL E1L	искусственная последовательность	QTVVTQEPSTLTVSPGGTTLTCCSSTGAVTSGYYPNWWQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA RFGSLLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGDKLTVL
64.	VH-VL E1L	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKSRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYTSYYAYWGQGLTIVTS SGGGSGGGGSGGGGSGTAVTQEPSTLTVSPGGTTLTCCSSTGAVTSGYYPNWWQKPGQAP RGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGDKLTV L
65.	CDR-L1 E2M	искусственная последовательность	RSSTGAVTSGYYPN
66.	CDR-L2 E2M	искусственная последовательность	ATDMRPS
67.	CDR-L3 E2M	искусственная последовательность	ALWYSNRWV
68.	CDR-H1 E2M	искусственная последовательность	GYAMN
69.	CDR-H2 E2M	искусственная последовательность	RIRSKYNNYATYYADSVKE
70.	CDR-H3 E2M	искусственная последовательность	HRNFGNSYLSWFAY

71.	VH E2M	последовательность последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNQYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKERFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWYAWGQGT LVTVS S
72.	VL E2M	искусственная последовательность	QTVVTTQEP S L T V S P G G T V T L T C R S S T G A V T S G Y Y P N W V Q Q K P G Q A P R G L I G A T D M R P S G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E Y Y C A L W Y S N R W V F G G G T K L T V L
73.	VH-VL E2M	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNQYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKERFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWYAWGQGT LVTVS S G G G S G G G S G G G S Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C R S S T G A V T S G Y Y P N W V Q Q K P G Q A P R G L I G A T D M R P S G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E Y Y C A L W Y S N R W V F G G G T K L T V L
74.	CDR-L1 F70	искусственная последовательность	GSSTGAVTSGYYPN
75.	CDR-L2 F70	искусственная последовательность	GTKFLAP
76.	CDR-L3 F70	искусственная последовательность	ALWYSNRWV
77.	CDR-H1 F70	искусственная последовательность	VYAMN
78.	CDR-H2 F70	искусственная последовательность	RIRSKYNNYATYYADSVKK
79.	CDR-H3 F70	искусственная последовательность	HGNFGNSYISWWAY
80.	VH F70	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNQYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKERFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWYAWGQGT LVTVS S
81.	VL F70	искусственная последовательность	QTVVTTQEP S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T S G Y Y P N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E Y Y C A L W Y S N R W V F G G G T K L T V L
82.	VH-VL F70	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNQYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKERFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWYAWGQGT LVTVS S G G G S G G G S G G G S Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T S G Y Y P N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E Y Y C A L W Y S N R W V F G G G T K L T V L
83.	CDR-L1 F12Q	искусственная последовательность	GSSTGAVTSGNYPN
84.	CDR-L2 F12Q	искусственная последовательность	GTKFLAP
85.	CDR-L3 F12Q	искусственная последовательность	VLWYSNRWV
86.	CDR-H1 F12Q	искусственная последовательность	SYAMN
87.	CDR-H2 F12Q	искусственная последовательность	RIRSKYNNYATYYADSVKG
88.	CDR-H3 F12Q	искусственная последовательность	HGNFGNSYISWWAY
89.	VH F12Q	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNQYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWYAWGQGT LVTVS S
90.	VL F12Q	искусственная последовательность	QTVVTTQEP S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T S G N Y P N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N R W V F G G G T K L T V L
91.	VH-VL F12Q	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNQYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWYAWGQGT LVTVS S G G G S G G G S G G G S Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T S G N Y P N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N R W V F G G G T K L T V L
92.	CDR-L1 I2C	искусственная последовательность	GSSTGAVTSGNYPN
93.	CDR-L2 I2C	искусственная последовательность	GTKFLAP
94.	CDR-L3 I2C	искусственная последовательность	VLWYSNRWV
95.	CDR-H1 I2C	искусственная последовательность	KYAMN
96.	CDR-H2 I2C	искусственная последовательность	RIRSKYNNYATYYADSVKD
97.	CDR-H3 I2C	искусственная последовательность	HGNFGNSYISYWAY
98.	VH I2C	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNQYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWYAWGQGT LVTVS S
99.	VL I2C	искусственная последовательность	QTVVTTQEP S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T S G N Y P N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N R W V F G G G T K L T V L
100.	VH-VL I2C	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNQYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWYAWGQGT LVTVS S G G G S G G G S G G G S Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T S G N Y P N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N R W V F G G G T K L T V L
101.	VH F12q	искусственная последовательность	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNQYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWYAWGQGT LVTVS S
102.	VL F12q	искусственная последовательность	QTVVTTQEP S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T S G N Y P N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N R W V F G G G T K L T V L

103.	F12q	scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVVYCVRHGNGFNSYVSWWAYWGQGLTIVS SGGGSGGGSGGGGSQTVVVTQEPSTLTVSPGGTIVTLCGSGTGAVTSGNYSNWWQQKPGQAP RGLIGGTRKFLAPGTPARFSGSLLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYICVLYSNRWVFGGQKLTIV L
104.	HALB	человек	DAHKSEVAHRFKDGLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVLRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL DEGKASSAQRLKCAASLQKGFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSCLVDTLTKVHTTECCGH DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPESFALEVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDFFAAAFVEKC CKADDKETCFAEEGKLVAAASQAALGL
105.	HALB7	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDGLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVLRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL DEGKASSAQRLKCAASLQKGFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSCLVDTLTKVHTTECCGH DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPESFALEVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDFFAAAFVEKC CKADDKETCFAEEGKLVAAASQAALGL
106.	HALB098	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDGLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVLRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL DEGKASSAQRLKCAASLQKGFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSCLVDTLTKVHTTECCGH DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPESFALEVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDFFAAAFVEKC CKADDKETCFAEEGKLVAAASQAALGL
107.	HALB114	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDGLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVLRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL DEGKASSAQRLKCAASLQKGFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSCLVDTLTKVHTTECCGH DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPESFALEVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDFFAAAFVEKC CKADDKETCFAEEGKLVAAASQAALGL
			SKCKHPPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPESFALEVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDFFAAAFVEKC CKADDKETCFAEEGKLVAAASQAALGL
108.	HALB254	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDGLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVLRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL DEGKASSAQRLKCAASLQKGFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSCLVDTLTKVHTTECCGH DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPESFALEVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDFFAAAFVEKC CKADDKETCFAEEGKLVAAASQAALGL
109.	HALB253	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDGLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVLRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL DEGKASSAQRLKCAASLQKGFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSCLVDTLTKVHTTECCGH DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPESFALEVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDFFAAAFVEKC CKADDKETCFAEEGKLVAAASQAALGL
110.	HALB131	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDGLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVLRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL DEGKASSAQRLKCAASLQKGFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSCLVDTLTKVHTTECCGH DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPESFALEVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDFFAAAFVEKC CKADDKETCFAEEGKLVAAASQAALGL
111.	HALB135	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDGLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVLRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL DEGKASSAQRLKCAASLQKGFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSCLVDTLTKVHTTECCGH DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPESFALEVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDFFAAAFVEKC CKADDKETCFAEEGKLVAAASQAALGL

112.	HALB133	искусственная последовательность	CKADDKETCFAEEGPHLVAASKAALGL DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVPRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELRL DEGKASSAKQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDLTQVHTECCCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRAKTYETTLKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPKAEKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDT YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEK CKADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL
113.	HALB234	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVPRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELRL DEGKASSAKQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDLTQVHTECCCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRAKTYETTLKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPKAEKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDT YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEK CKADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL
114.	HALB C34S	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVPRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELRL DEGKASSAKQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDLTQVHTECCCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRAKTYETTLKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPKAEKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDT YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEK CKADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL
115.	HALB7 C34S	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVPRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELRL DEGKASSAKQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDLTQVHTECCCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRAKTYETTLKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPKAEKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDT YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEK CKADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL
116.	HALB098 C34S	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVPRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELRL DEGKASSAKQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDLTQVHTECCCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRAKTYETTLKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPKAEKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDT YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEK CKADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL
117.	HALB114 C34S	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVPRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELRL DEGKASSAKQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDLTQVHTECCCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRAKTYETTLKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPKAEKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDT YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEK CKADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL
118.	HALB254 C34S	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVPRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELRL DEGKASSAKQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDLTQVHTECCCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRAKTYETTLKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPKAEKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDT YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEK CKADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL
119.	HALB253 C34S	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVPRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELRL DEGKASSAKQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVDLTQVHTECCCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRAKTYETTLKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKHPKAEKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDT YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEK CKADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL
120.	HALB131 C34S	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVPRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELRL

			DEGKASSAQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFFKAEFAEVSKLVDLTKVHTECCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
121.	HALB135 C34S	искусственная последовательность	DAHKSVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQOSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKDELRL DEGKASSAQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFFKAEFAEVSKLVDLTKVHTECCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
122.	HALB133 C34S	искусственная последовательность	DAHKSVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQOSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKDELRL DEGKASSAQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFFKAEFAEVSKLVDLTKVHTECCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
123.	HALB234 C34S	искусственная последовательность	DAHKSVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQOSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKDELRL DEGKASSAQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFFKAEFAEVSKLVDLTKVHTECCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
124.	HALB C34A	искусственная последовательность	DAHKSVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKDELRL DEGKASSAQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFFKAEFAEVSKLVDLTKVHTECCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
			ESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGKLVVAASQAALGL
125.	HALB7 C34A	искусственная последовательность	DAHKSVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKDELRL DEGKASSAQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFFKAEFAEVSKLVDLTKVHTECCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGKLVVAASQAALGL
126.	HALB098 C34A	искусственная последовательность	DAHKSVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKDELRL DEGKASSAQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFFKAEFAEVSKLVDLTKVHTECCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGKLVVAASQAALGL
127.	HALB114 C34A	искусственная последовательность	DAHKSVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKDELRL DEGKASSAQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFFKAEFAEVSKLVDLTKVHTECCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
128.	HALB254 C34A	искусственная последовательность	DAHKSVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKDELRL DEGKASSAQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFFKAEFAEVSKLVDLTKVHTECCHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCECEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHCEYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL

			SKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
129.	HALB253 C34A	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLVEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKDELRL DEGKASSAKORLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTTECHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
130.	HALB131 C34A	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLVEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKDELRL DEGKASSAKORLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTTECHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
131.	HALB135 C34A	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLVEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKDELRL DEGKASSAKORLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTTECHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
132.	HALB133 C34A	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLVEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKDELRL DEGKASSAKORLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTTECHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
			CKADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
133.	HALB234 C34A	искусственная последовательность	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLVEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVVRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLPLKDELRL DEGKASSAKORLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTTECHG DLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFV ESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYAYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG SKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALVDDET YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQATALVELVKKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKC CKADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
134.	Ab156	искусственная последовательность	RDWDFVDFGGTVPVGG
135.	линейный FcRn- связывающий пептид	искусственная последовательность	QRVFTGHFGGLXPANG
136.	линейный FcRn- связывающий пептид Y	искусственная последовательность	QRVFTGHFGGLYPANG
137.	линейный FcRn- связывающий пептид H	искусственная последовательность	QRVFTGHFGGLHPANG
138.	основной FcRn- связывающий пептид H	искусственная последовательность	TGHFGGLHP
139.	циклический FcRn- связывающий пептид H	искусственная последовательность	QRFCTGHFGGLHPCNG
140.	HC Cross body 1		ASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGL YLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVF LFPKPKDITLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGTSTYRCV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDDLTVDKSRWQQGVNFCVSV MHEALHNNHTQKLSLSLSPGK
141.	LC Cross body 1		GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHTSYSCQVTEHGSTVEKTVAPTECSDKTHTCPPAPPELLGGP SVLFPKPKDITLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGTSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVNFCV CSVMHEALHNNHTQKLSLSLSPGK
142.	HC Cross body 2		ASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGL YLSLVVTVPSSMFGTQTYICNVHDKPSNTKVDKVEPKSDDKTHHTCPPAPPEAGGSPVF LFPKPKDITLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNTSTYRVV

			SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSGFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
143.	LC Cross body 2		GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTFSKQSNKYAASSYLSTLTPQWKSHRSYSQVTHEGSTEVEKTPVTECSSEPKSDDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
144.	Связывающий Fc гетеро-Fc		DKTHTCPPCPAPELLEGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGTSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
145.	Fc партнер гетеро-Fc		DKTHTCPPCPAPELLEGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGTSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSGFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
146.	Fc-мишень Maxibody 1		EPKSSDKTHTCPPCPAPELLEGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGTSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
147.	Fc CD3 Maxibody 1		EPKSSDKTHTCPPCPAPELLEGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGTSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSGFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
148.	Fc-мишень Maxibody 2		EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGTSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
149.	Fc CD3 Maxibody 2		EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGTSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSGFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
150.	Моно-Fc		APPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGTSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSGFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
151.	EvIII-1	VH CDR1	NYGMH
152.	EvIII-1	VH CDR2	VIWYDGS DKYADSVRG
153.	EvIII-1	VH CDR3	DGYDILTG NRPDFDY
154.	EvIII-1	VL CDR1	RSSQSLVHSDGNTYLS
155.	EvIII-1	VL CDR2	RISRRFS
156.	EvIII-1	VL CDR3	MQSTHVPT
157.	EvIII-1	VH	QVQLVESGGGVQSGRSLRSLCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWYDGS DKYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCARDGYDILTG NRPDFDYWGQGLTVTVSS
158.	EvIII-1	VL	DTVMQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPRLLIYRISRFRSGVDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEADVGVYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIK
159.	EvIII-1	scFv	QVQLVESGGGVQSGRSLRSLCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWYDGS DKYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCARDGYDILTG NRPDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDTVMQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPRLLIYRISRFRSGVDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEADVGVYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIK
160.	EvIII-1	биспецифическая молекула	QVQLVESGGGVQSGRSLRSLCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWYDGS DKYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCARDGYDILTG NRPDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDTVMQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPRLLIYRISRFRSGVDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEADVGVYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVAIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGFGNSIYSWYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDTVMQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPRLLIYRISRFRSGVDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEADVGVYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIK
161.	EvIII-2	VH CDR1	NYGMH
162.	EvIII-2	VH CDR2	VIWYDGS DKYADSVRG
163.	EvIII-2	VH CDR3	DGYDILTG NRPDFDY
164.	EvIII-2	VL CDR1	RSSQSLVHSDGNTYLS
165.	EvIII-2	VL CDR2	RISRRFS
166.	EvIII-2	VL CDR3	MQSTHVPT
167.	EvIII-2	VH	QVQLVESGGGVQSGRSLRSLCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWYDGS DKYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCARDGYDILTG NRPDFDYWGQGLTVTVSS
168.	EvIII-2	VL	DTVMQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPRLLIYRISRFRSGVDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEADVGVYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIK
169.	EvIII-2	scFv	QVQLVESGGGVQSGRSLRSLCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWYDGS DKYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCARDGYDILTG NRPDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDTVMQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPRLLIYRISRFRSGVDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEADVGVYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIK
170.	EvIII-2	биспецифическая молекула	QVQLVESGGGVQSGRSLRSLCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWYDGS DKYADSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCARDGYDILTG NRPDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDTVMQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPRLLIYRISRFRSGVDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEADVGVYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKLEWVAIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGFGNSIYSWYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDTVMQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPRLLIYRISRFRSGVDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEADVGVYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIK





## 4. Конструкт антитела по п.1 или 3, содержащий:

(a) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

(i) первый связывающий домен, который связывается с EGFRVIII и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159;

(ii) пептидный линкер, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-9; и

(iii) второй связывающий домен, который связывается с CD3 и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 103;

(b) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

(i) первый связывающий домен, который связывается с EGFRVIII и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159;

(ii) пептидный линкер, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-9;

(iii) второй связывающий домен, который связывается с CD3 и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 103;

(iv) пептидный линкер, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-9; и

(v) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 104-134;

(c) полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

(i) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность QRFVTGHFGGLX<sub>1</sub>PANG (SEQ ID NO: 135), где X<sub>1</sub> представляет собой Y или H;

(ii) первый связывающий домен, который связывается с EGFRVIII и содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159;

(iii) пептидный линкер, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-9;

(iv) второй связывающий домен, который связывается с CD3 и содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 103; и

(v) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность QRFVTGHFGGLHPANG (SEQ ID NO: 137) или QRFCTGHFGGLHPCNG (SEQ ID NO: 139);

(d) первый полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

(i) варибельную область тяжелой цепи (VH) указанного CD3-связывающего домена, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 101;

(ii) пептидный линкер, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8;

(iii) варибельную область легкой цепи (VL) указанного EGFRvIII-связывающего домена, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158; и

(iv) полипептид с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 140; и второй полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

(i) VH-область указанного EGFRvIII-связывающего домена, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157;

(ii) пептидный линкер, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8;

(iii) VL-область указанного CD3-связывающего домена, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 99 и SEQ ID NO: 102, и остаток серина на C-конце; и

(iv) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 141; (e) первый полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца:

(i) VH-область указанного CD3-связывающего домена, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 101;

(ii) пептидный линкер, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ





NO: 83, CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, и CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; и VH-область, содержащую CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, и CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88;

(x) VL-область, содержащую CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и VH-область, содержащую CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97; или

(xi) VH-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и VL-область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

6. Конструкт антитела по любому из пп.1-5, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:160.

7. Конструкт антитела по любому из пп.1-6, дополнительно содержащий His-метку, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 10.

8. Конструкт антитела по любому из пп.1-6, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:160, и дополнительно содержащий His-метку, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 10.

9. Конструкт антитела по любому из пп.1-6, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца: аминокислотную последовательность SEQ ID NO:160 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO 10.

10. Полипептид, связывающийся с рецептором эпидермального фактора роста (EGFRvIII) человека и макака и CD3 человека, содержащий:

(a) первый связывающий домен, который связывается с рецептором VIII эпидермального фактора роста (EGFRVIII) макака и человека и содержит вариabельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157, и вариabельную область легкой цепи область (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158; и

(b) второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека и содержит: VL-область, содержащую CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93 и CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и VH-область, содержащую: CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97.

11. Полипептид по п.10, содержащий:

(a) первый связывающий домен, который связывается с EGFRVIII человека и макака, и включает VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158; и

(b) второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека и включает VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99.

12. Полипептид по п.10 или 11, содержащий (a) первый домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 159; и (b) второй домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100.

13. Полипептид по любому из пп.10-12, дополнительно содержащий His-метку, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

14. Полипептид по любому из пп.10-13, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 189.

15. Полипептид по любому из пп.10-14, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 190.

16. Полипептид, связывающийся с рецептором эпидермального фактора роста (EGFRvIII) человека и макака и CD3 человека, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 160.

17. Полипептид по п.16, дополнительно содержащий His-метку, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

18. Полипептид по п.16, содержащий в следующем порядке, начиная с N-конца: аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 160, и His-метку, представленную в SEQ ID NO: 10.

19. Полипептид по п.16, дополнительно содержащий одноцепочечный Fc (scFc), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 181-188.

20. Полипептид по п.16, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 189.

21. Полипептид по п.16, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 190.

22. Полинуклеотид, кодирующий конструктор антитела или полипептид по любому из предыдущих пунктов.

23. Экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид по п.22.

24. Клонированный вектор, содержащий полинуклеотид по п.22

25. Клетка-хозяин для клонирования конструктора антитела по любому из пп.1-9 или полипептида по любому из пп.10-21, содержащая полинуклеотид, определенный в п.22, или вектор, определенный в п.24.

26. Клетка-хозяин для экспрессии конструктора антитела по любому из пп.1-9 или полипептида по любому из пп.10-21, содержащая полинуклеотид, определенный в п.22, или вектор, определенный в п.23.

27. Способ получения конструктора антитела по любому из пп.1-9 или полипептид по любому из пп.10-21, причем указанный способ включает:

(i) культивирование клетки-хозяина по п.26 в условиях, обеспечивающих экспрессию конструктора антитела по любому из пп.1-9 или полипептида по любому из пп.10-21; и

(ii) выделение продуцированного конструктора антитела или полипептида из культуры.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая конструктор антитела по любому из пп.1-9 или полипептида по любому из пп.10-21 и фармацевтически приемлемый носитель.

29. Применение конструктора антитела по любому из пп.1-9, или полипептида по любому из пп.10-21, или фармацевтической композиции по п.28 для профилактики, лечения или облегчения опухолевого заболевания.

30. Применение по п.29, где опухолевым заболеванием является глиобластома.

31. Способ лечения или облегчения опухолевого заболевания, включающий этап введения субъекту, нуждающемуся в этом, конструктора антитела по любому из пп.1-9, или полипептида по любому из пп.10-21, или фармацевтической композиции по п.28.

32. Способ по п.31, в котором указанным опухолевым заболеванием является раковое заболевание.

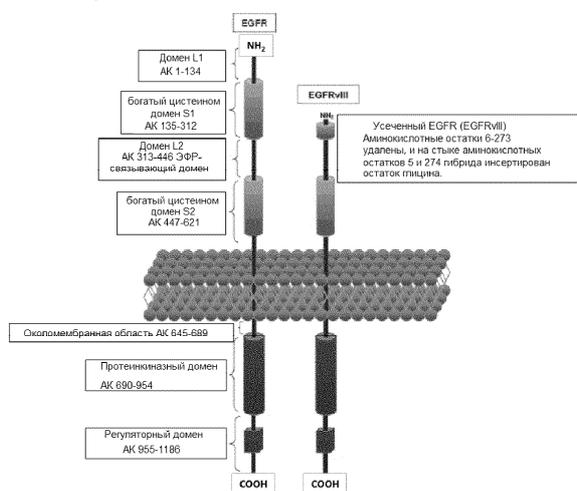
33. Способ по п.31, в котором указанным опухолевым заболеванием является метастатическое раковое заболевание.

34. Способ по п.31, в котором опухолевым заболеванием является глиобластома.

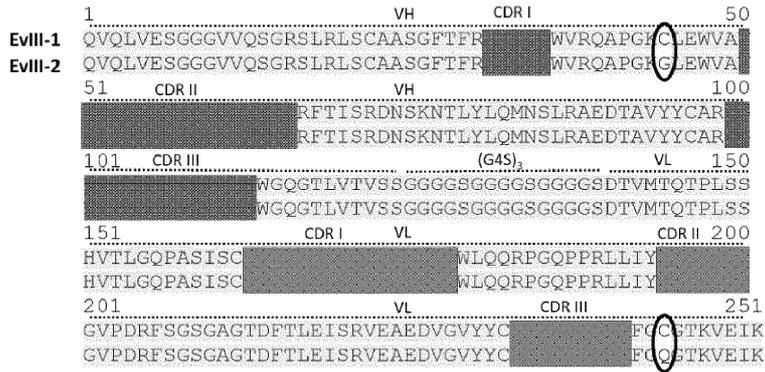
35. Применение по п.29, в котором опухолевое заболевание выбрано из группы, состоящей из глиобластомы, астроцитомы, медуллобластом, карцином молочной железы, немелкоклеточных карцином легких, карцином яичника, карцином предстательной железы, карцином центральной нервной системы или метастатического ракового заболевания, возникшего в результате любого из вышеуказанных заболеваний.

36. Способ по любому из пп.31-33, в котором опухолевое заболевание выбрано из группы, состоящей из глиобластомы, астроцитомы, медуллобластом, карцином молочной железы, немелкоклеточных карцином легких, карцином яичника, карцином предстательной железы, карцином центральной нервной системы или метастатического ракового заболевания, возникшего в результате любого из вышеуказанных заболеваний.

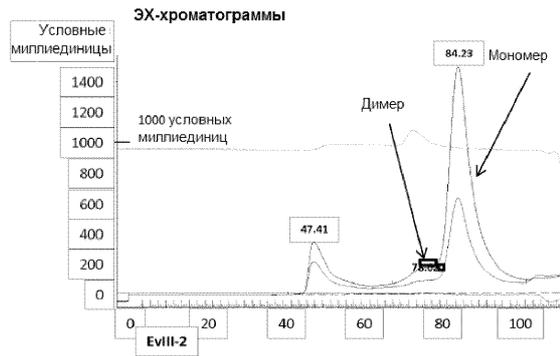
37. Набор для профилактики, лечения или облегчения опухолевого заболевания, отличающийся тем, что набор содержит конструктор антитела по любому из пп.1-9, полипептид по любому из пп.10-21, конструктор антитела или полипептид, полученные в соответствии со способом по п.27, полинуклеотид, определенный в п.22, вектор, определенный в п.23 или 24, клетку-хозяина, определенную в п.25 или 26, и/или фармацевтическую композицию по п.28.



Фиг. 1



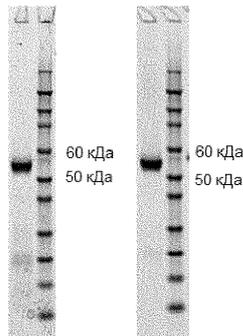
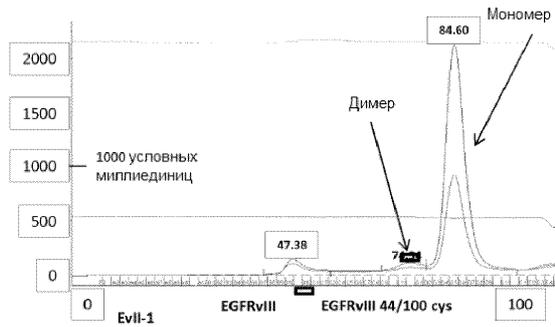
Фиг. 2



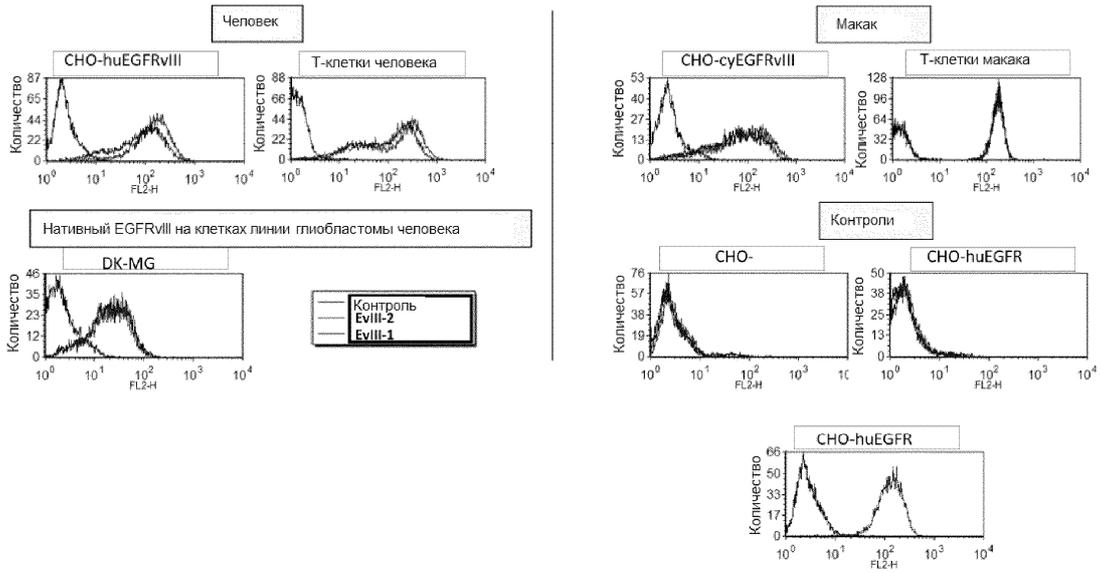
Синяя линия = ОП280 нм  
Красная линия = ОП254 нм

EGFRvIII BiTE	Выход мономера (мкг/л)	Процентная доля мономера
EvIII-2	2503	90
EvIII-1	3671	93

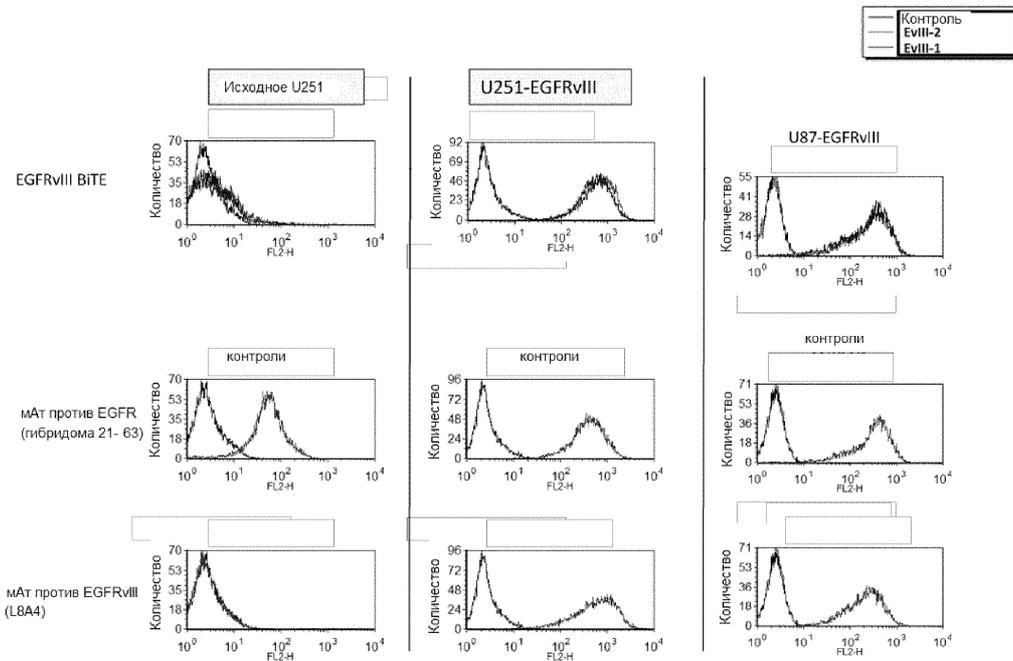
Фиг. 3



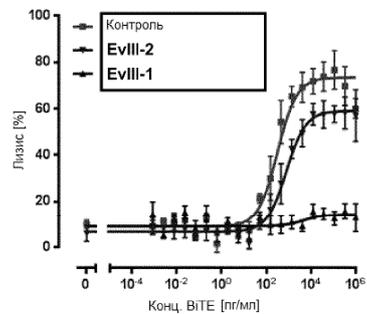
Фиг. 4



Фиг. 5

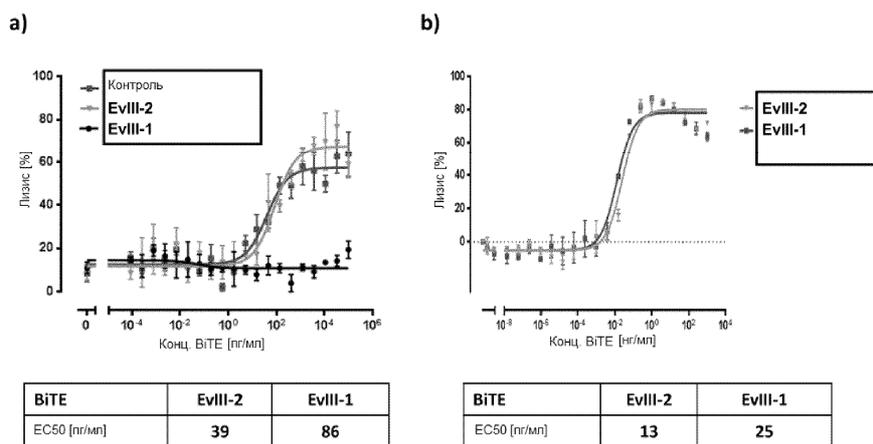


Фиг. 6

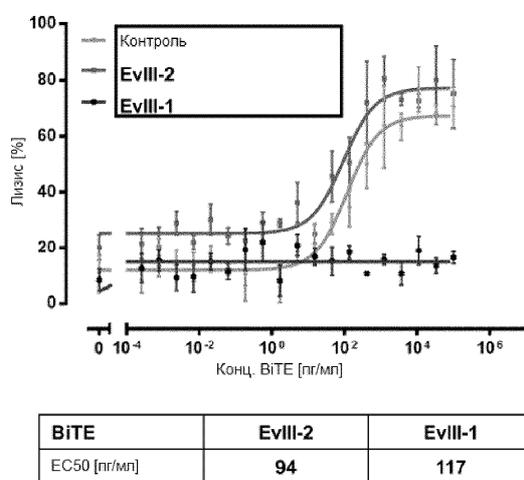


ВІТЕ	EvIII-2	EvIII-1
EC50 [пг/мл]	317	783

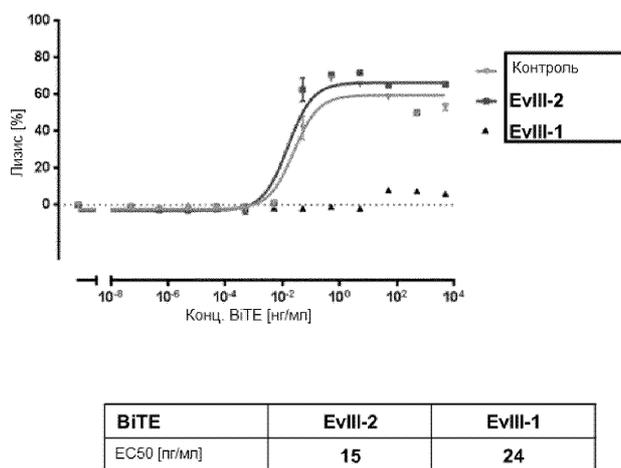
Фиг. 7



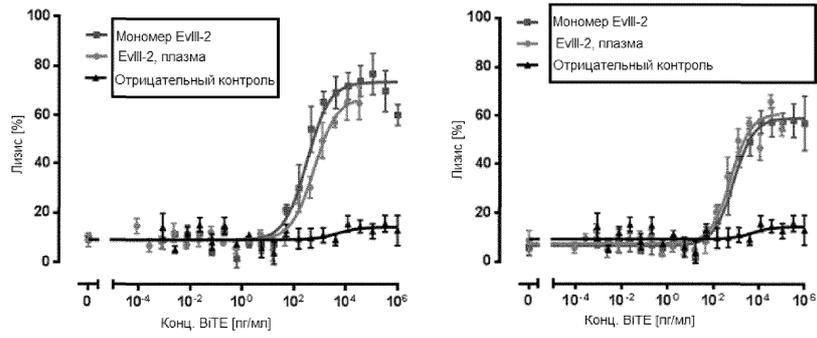
Фиг. 8



Фиг. 9

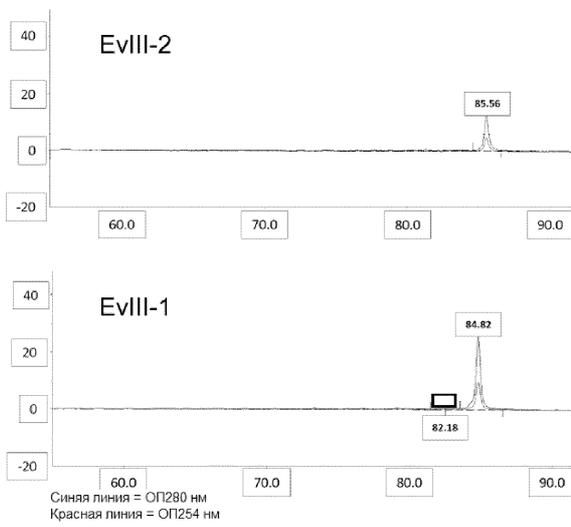


Фиг. 10



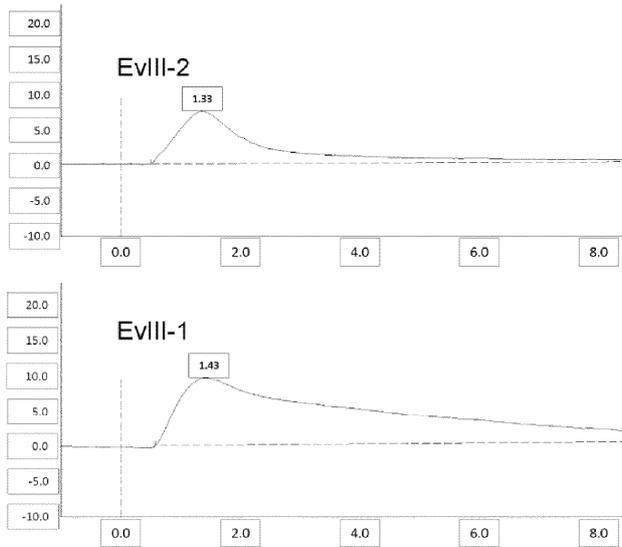
	ЕС <sub>50</sub> [пг/мл]		Отношение «Плазма:контроль» (ЕС <sub>50</sub> плазма/ЕС <sub>50</sub> контроль)
	С плазмой	Без плазмы	
EvIII-2	594	315	1.89
EvIII-1	586	783	0.75

Фиг. 11



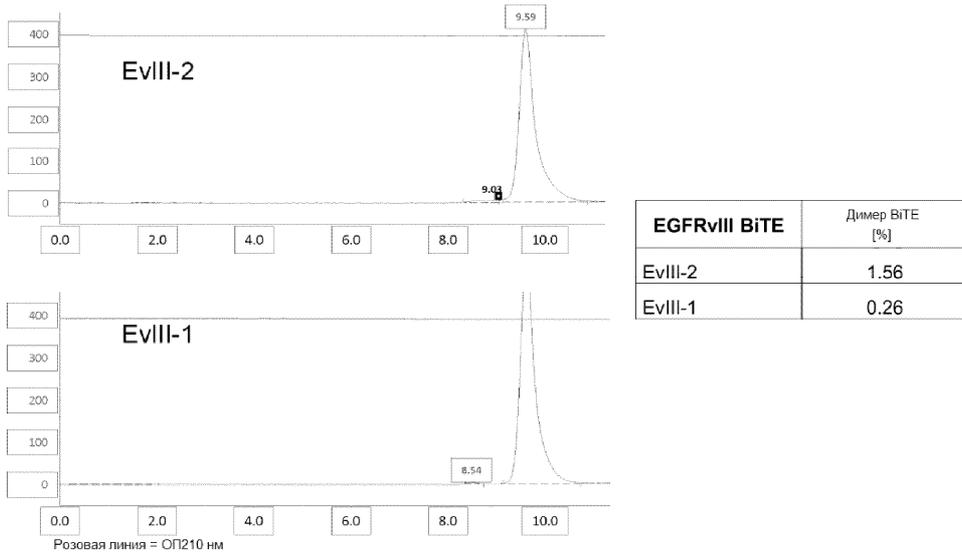
EGFRvIII BiTE	ППК основного пика [%]
EvIII-2	100
EvIII-1	96,4

Фиг. 12

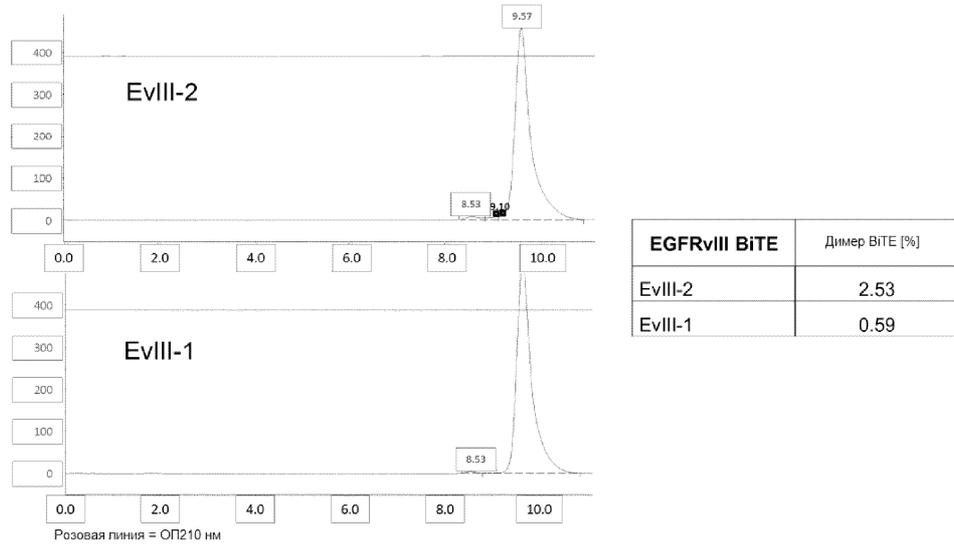


EGFRvIII BiTE	Поведение при элюировании с НИС октил
EvIII-2	3
EvIII-1	3

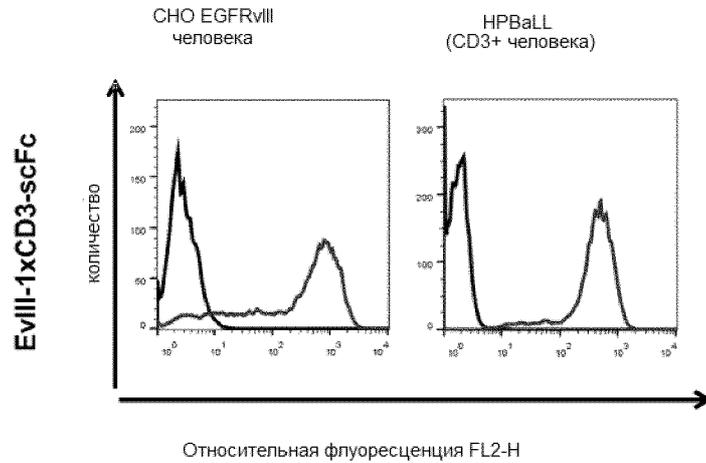
Фиг. 13



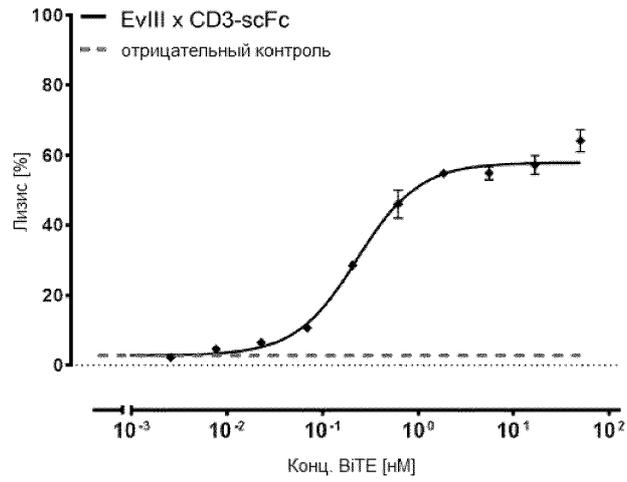
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

