(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 040028 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.11

(21) Номер заявки
201790719

(22) Дата подачи заявки
2015.09.22

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

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ МОНОВАЛЕНТНЫЕ ДИАТЕЛА, КОТОРЫЕ СПОСОБНЫ СВЯЗЫВАТЬ CD19 И CD3, А ТАКЖЕ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/055,695**
(32) **2014.09.26**
(33) **US**
(43) **2017.07.31**
(86) **PCT/US2015/051314**
(87) **WO 2016/048938 2016.03.31**

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

(72) Изобретатель:
Джонсон Лесли С., Бонвини Эцио, Лам Цзя-ин Као, Мур Пол А., Лю Лицинь, Коениг Скотт (US)

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

(56) US-A1-20110206672
WO-A2-2014145806
US-B2-7968687
US-A1-20130004416
US-A1-20100174053

(57) Изобретение относится к биспецифическому моновалентному Fc-диателу к CD19 x CD3, способному специфически связываться с CD19 и с CD3. При этом диателo содержит первую, вторую и третью полипептидные цепи, при этом указанные полипептидные цепи образуют ковалентно связанный комплекс. Изобретение также относится к фармацевтической композиции и применению биспецифического антитела для лечения заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией CD19, в частности гематологических злокачественных заболеваний.

040028 B1

040028 B1

Ссылка на родственную заявку

Согласно заявке на настоящий патент испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США с серийным № 62/055695 (поданной 26 сентября 2014 г., находящейся на рассмотрении), при этом указанная заявка тем самым включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка включает в себя один или несколько перечней последовательностей в соответствии с 37 C.F.R. 1.821 et seq., которые раскрываются на машиночитаемых носителях (файл с названием 1301_0116PCT_Sequence_Listing_ST25.txt, созданный 18 сентября 2015 г. и имеющий размер 47329 байт), файл с которыми включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат две полипептидных цепи и которые имеют один сайт связывания, специфический по отношению к эпитопу CD19, и один сайт связывания, специфический по отношению к эпитопу CD3 (т.е. биспецифическое моновалентное диателo к CD19 x CD3). Наиболее предпочтительно, такие биспецифические моновалентные диателa к CD19 x CD3 состоят из трех полипептидных цепей и имеют один сайт связывания, специфический по отношению к эпитопу CD19, и один сайт связывания, специфический по отношению к эпитопу CD3, а также дополнительно содержат Fc-домен иммуноглобулина (т.е. биспецифическое моновалентное Fc-диателo к CD19 x CD3). Биспецифические моновалентные диателa и биспецифические моновалентные Fc-диателa в соответствии с настоящим изобретением способны одновременно связываться с CD19 и CD3. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные диателa или такие биспецифические моновалентные Fc-диателa. Настоящее изобретение, кроме того, относится к способам применения таких диател в лечении заболевания, в частности, гематологических злокачественных заболеваний.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

A. CD19.

CD19 (антиген поверхности B-лимфоцита B4, номер доступа в Genbank M28170) представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа 95 кДа иммуноглобулинового суперсемейства (Stamenkovic, I. et al. (1988) "CD19, The Earliest Differentiation Antigen Of The B Cell Lineage, Bears Three Extracellular Immunoglobulin-Like Domains And An Epstein-Barr Virus-Related Cytoplasmic Tail", J. Exper. Med. 168(3):1205-1210; Tedder, T.F. et al. (1989) "Isolation Of cDNAs Encoding The CD19 Antigen Of Human And Mouse B Lymphocytes. A New Member Of The Immunoglobulin Superfamily", J. Immunol. 143(2):712-717; Zhou, L.J. et al. (1991) "Structure And Domain Organization Of The CD19 Antigen Of Human, Mouse, And Guinea Pig B Lymphocytes. Conservation Of The Extensive Cytoplasmic Domain", J. Immunol. 147(4):1424-1432). CD19 экспрессируется на фолликулярных дендритных клетках и на всех B-клетках из ранних B-клеток-предшественников во время реаранжировки тяжелой цепи вплоть до стадии плазматических клеток, когда экспрессия CD19 подавляется. CD19 не экспрессируется на гематопоэтических стволовых клетках или на B-клетках до стадии B-клеток-предшественников (Sato et al. (1995) "The CD19 Signal Transduction Molecule Is A Response Regulator Of B-Lymphocyte Differentiation", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11558-62; Loken et al. (1987) "Flow Cytometric Analysis of Human Bone Marrow. II. Normal B Lymphocyte Development", Blood, 70:1316- 1324; Wang et al. (2012) "CD19: A Biomarker For B Cell Development, Lymphoma Diagnosis And Therapy", Exp. Hematol. and Oncol. 1:36).

CD19 является компонентом комплекса B-клетка-рецептор (BCR), а также является положительным регулятором передачи сигнала B-клеткой, который модулирует порог для B-клеточной активации и гуморального иммунитета. CD19 взаимодействует с CD21 (CR2, рецептором фрагмента C3d) и CD81 посредством двух внеклеточных Ig-подобных доменов C2-типа, формируя вместе с CD225 комплекс BCR. Внутриклеточный домен CD19 вовлекается во внутриклеточные каскады передачи сигнала с регуляцией главным образом, но не исключительно, сигналов по ходу направления воздействия BCR и CD22 (Mei et al. (2012) "Rationale of Anti-CD19 Immunotherapy: An Option To Target Autoreactive Plasma Cells In Autoimmunity", Arthritis Res and Ther. 14 (Suppl. 5):S1; Wang et al. (2012) "CD19: A Biomarker For B Cell Development, Lymphoma Diagnosis And Therapy", Exp. Hematol. and Oncol. 1:36); Del Nagro et al. (2005) "CD19 Function in Central and Peripheral B-Cell Development", Immunologic Res. 31:119-131).

Некоторые свойства CD19 подтверждают его возможный потенциал как мишени для иммунотерапии. CD19 является одним из наиболее распространенных экспрессируемых антигенов в B-клеточной линии дифференцировки и экспрессируется при > 95% связанных с B-клетками злокачественных заболеваний, в том числе при остром лимфобластном лейкозе (ALL), хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) и неходжкинской лимфоме (NHL) (Wilson, K. et al. (2010) "Flow Minimal Residual Disease Monitoring Of Candidate Leukemic Stem Cells Defined By The Immunophenotype, CD34+CD38lowCD19+ In B-Lineage Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia", Haematologica 95(4):679-683; Maloney, D.G. et al. (1997) "IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy In Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma", Blood 90(6):2188-2195; Vose, J.M. (1998) "Current Approaches To The Management Of Non-Hodgkin's Lymphoma", Semin. Oncol. 25(4):483-491; Nagorsen, D. et al. (2012) "Bli-

natumomab: A Historical Perspective", Pharmacol. Ther. 136(3):334-342; Topp, M.S. et al. (2011) "Targeted Therapy With The T-Cell-Engaging Antibody Blinatumomab Of Chemotherapy-Refractory Minimal Residual Disease In B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results In High Response Rate And Prolonged Leukemia-Free Survival", J. Clin Oncol. 2011 Jun 20; 29(18):2493-2498; Nadler, et al. (1983) "B4, A Human B Lymphocyte-Associated Antigen Expressed On Normal, Mitogen-Activated, And Malignant B Lymphocytes." J. Immunol.; 131:244-250; Ginaldi et al. (1998) "Levels Of Expression Of CD19 And CD20 In Chronic B Cell Leukaemias", J. Clin. Pathol. 51:364-369; Anderson et al. (1984) "Expression of Human B Cell-Associated Antigens on Leukemias and Lymphomas: A Model of Human B Cell Differentiation", Blood 63:1424-1433). CD19 экспрессируется на немногих, если вообще экспрессируется, других типах клеток и не экспрессируется на терминально дифференцированных плазматических клетках, что, таким образом, может быть использовано при направленных на CD19 терапевтических методах. CD19 не попадает в кровоток и может быстро интернализироваться (Ma et al. (2002) "Radioimmunotherapy For Model B Cell Malignancies Using 90Y-Labeled Anti-CD19 And Anti-CD20 Monoclonal Antibodies", Leukemia 16:60-66; Raufi et al. (2013) "Targeting CD19 in B-cell lymphoma: emerging role of SAR3419", Cancer Management Res 3:225-233). Notably, CD19 expression is maintained on B cell lymphomas that become resistant to anti-CD20 therapy (Davis et al. (1999) "Therapy of B-cell Lymphoma With Anti-CD20 Antibodies Can Result In The Loss Of CD20 Antigen Expression." Clin Cancer Res, 5:611-615, 1999). Также CD19 был предложен в качестве мишени для лечения аутоиммунных заболеваний (Tedder (2009) "CD19: A Promising B Cell Target For Rheumatoid Arthritis", Nat. Rev. Rheumatol. 5:572-577).

В-клеточные злокачественные заболевания представляют разнородную группу нарушений с широко варьирующими характеристиками и клиническим поведением. Исторически большинство больных с симптоматическим заболеванием получали комбинацию не реагирующих перекрестно генотоксических средств с целью достижения длительной ремиссии и, в некоторых случаях, излечения. Несмотря на свою эффективность, многие традиционные режимы также ассоциируются с существенными острыми и длительными токсичностями (см., например, Stock, W. et al. (2013) "Dose Intensification Of Daunorubicin And Cytarabine During Treatment Of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: Results Of Cancer And Leukemia Group B Study 19802", Cancer. 2013 Jan 1; 119(1):90-98). Моноклональное антитело против CD20 ритуксимаб используют для лечения многих В-клеточных нарушений, при которых его можно использовать в комбинации со средствами "стандарта оказания медицинской помощи" или использовать в качестве отдельного средства (Fowler et al. (2013) "Developing Novel Strategies to Target B-Cell Malignancies", Targeted Pathways, B-Cell Lymphoma in ASCO Educational Book, p. 366-372; Bargou, R. et al. (2008) "Tumor Regression In Cancer Patients By Very Low Doses Of A T Cell-Engaging Antibody", Science 321(5891):974-977; Thomas, D.A. et al. (2010) "Chemoimmunotherapy With A Modified Hyper-CVAD And Rituximab Regimen Improves Outcome In De Novo Philadelphia Chromosome-Negative Precursor B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia", J. Clin. Oncol. 28(24):3880-3889). Несмотря на обнадеживающие клинические результаты, повторный курс лечения больных с медленно растущими лимфомами отдельным средством ритуксимабом ассоциировался с частотой ответа всего лишь 40%, что указывает на то, что может возникать устойчивость в злокачественных В-клетках в ответ на длительное воздействие ритуксимаба (Smith (2003) "Rituximab (Monoclonal Anti-CD20 Antibody): Mechanisms Of Action And Resistance." Oncogene. 22:7359-68; Davis et al. (1999) "Therapy of B-cell Lymphoma With Anti-CD20 Antibodies Can Result In The Loss Of CD20 Antigen Expression", Clin Cancer Res, 5:611-615, 1999; Gabrilovich, D. et al. (2003) "Tumor Escape From Immune Response: Mechanisms And Targets Of Activity", Curr. Drug Targets 4(7):525-536). Сообщали о том, что устойчивые к ритуксимабу клеточные линии, созданные in vitro, демонстрировали перекрестную устойчивость ко многим химиотерапевтическим средствам (Czuczman et al. (2008) "Acquirement Of Rituximab Resistance In Lymphoma Cell Lines Is Associated With Both Global CD20 Gene And Protein Down-Regulation Regulated At The Pretranscriptional And Post-transcriptional Levels", Clin Cancer Res. 14:1561-1570; Olejniczak et al. (2008) "Acquired Resistance To Rituximab Is Associated With Chemotherapy Resistance Resulting From Decreased Bax And Bak Expression", Clin Cancer Res. 14:1550-1560).

Дополнительные поверхностные антигены В-клеточной лимфомы, которые являются мишенями терапевтических антител, включают в себя CD19 (Hoelzer (2013) "Targeted Therapy With Monoclonal Antibodies In Acute Lymphoblasitic Leukemia, Curr. Opin. Oncol. 25:701-706; Hammer (2012) "CD19 As An Attractive Target For Antibody-Based Therapy", mAbs 4:571-577). Однако, несмотря на высокую активность против лимфомы, ассоциированную с комплексной интернализацией и внутриклеточным высвобождением свободного лекарственного средства, сообщалось о различных антителах против CD19, биспецифических антителах со связывающей частью против CD19, или о конъюгатах антитела и лекарственного средства (ADC), при этом противоопухолевые эффекты таких антител против CD19 или ADC были вариабельными, что указывает на то, что специфические свойства антител, такие как связывание эпитопа, способность индуцировать олигомеризацию CD19 или различия во внутриклеточной передачи сигнала, влияют на их эффективность (Du et al. (2008) "Differential Cellular Internalization Of Anti-CD19 And -CD22 Immunotoxins Results In Different Cytotoxic Activity", Cancer Res. 68:6300-6305; Press et al. (1994) "Retention Of B-Cell-Specific Monoclonal Antibodies By Human Lymphoma Cells. Blood", 83:1390-1397; Szatrowski et al. (2003) "Lineage Specific Treatment Of Adult Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia In First Re-

mission With Anti-B4-Blocked Ricin Or High-Dose Cytarabine: Cancer And Leukemia Group B Study 9311", Cancer 97:1471-1480; Frankel et al. (2013) "Targeting T Cells To Tumor Cells Using Bispecific Antibodies", Curr. Opin. Chem. Biol. 17:385-392).

Таким образом, несмотря на улучшения выживаемости для многих, у большинства больных, страдающих В-клеточными злокачественными заболеваниями, продолжают наблюдаться рецидивы после стандартной химиоиммунотерапии, и ежегодно более 15000 больных в Соединенных Штатах все еще умирают от В-клеточных злокачественных опухолей. Следовательно, необходимы методы лечения с новыми не вызывающими перекрестную устойчивость соединениями для дальнейшего улучшения выживаемости больных.

B. CD3.

CD3 является Т-клеточным корецептором, состоящим из четырех отдельных цепей (Wucherpfennig, K.W. et al. (2010) "Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation Of Signaling", Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2(4):a005140; pages 1-14; Chetty, R. et al. (1994) "CD3: Structure, Function, And Role Of Immunostaining In Clinical Practice", J. Pathol. 173(4):303-307; Guy, C.S. et al. (2009) "Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3 Complex", Immunol. Rev. 232(1):7-21).

У млекопитающих комплекс содержит цепь CD3γ, цепь CD3δ и две цепи CD3ε. Эти цепи ассоциируются с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (TCR), для образования сигнала активации в Т-лимфоцитах (Smith-Garvin, J.E. et al. (2009) "T Cell Activation", Annu. Rev. Immunol. 27:591-619). При отсутствии CD3 TCR не связываются надлежащим образом и разрушаются (Thomas, S. et al. (2010) "Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer" Immunology 129(2):170-177). Выяснили, что CD3 связывается с мембранами всех зрелых Т-клеток и практически отсутствует в другом типе клеток (см. Janeway, C.A. et al. (2005) In: Immunobiology: The Immune System In Health And Disease", 6th ed. Garland Science Publishing, NY, p. 214-216; Sun, Z. J. et al. (2001) "Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3ε:γ Heterodimer" Cell 105(7):913-923; Kuhns, M.S. et al. (2006) "Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex" Immunity. 2006 Feb; 24(2):133-139).

Инвариантный компонент передачи сигнала CD3ε комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) на Т-клетках использовали в качестве мишени для ускорения образования иммунологического синапса между Т-клетками и опухолевыми клетками. Совместное взаимодействие CD3 и опухолевого антигена активирует Т-клетки, запускающие лизис опухолевых клеток, экспрессирующих опухолевый антиген (Baeuerle et al. (2011) "Bispecific T Cell Engager For Cancer Therapy" In: Bispecific Antibodies, Kontermann, RE. (Ed.) Springer-Verlag; 2011:273-287). Этот подход обеспечивает глобальное взаимодействие биспецифических антител с Т-клеточным компартментом с высокой специфичностью в отношении опухолевых клеток и широко применим к широкому спектру опухолевых антигенов клеточной поверхности.

C. Антитела и другие связывающие молекулы.

Антитела представляют собой молекулы иммуноглобулина, способные к специфическому связыванию с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т.д., через по меньшей мере один сайт распознавания антигена, локализованный в вариабельной области молекулы иммуноглобулина. Используемый в настоящем документе термин охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их мутантов, встречающиеся в природе варианты, белки слияния, содержащие часть антитела с сайтом распознавания антигена необходимой специфичности, гуманизированные антитела, химерные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит сайт распознавания антигена необходимой специфичности.

Способность интактного немодифицированного антитела (например, IgG) связывать эпитоп антигена зависит от присутствия вариабельных доменов в легкой и тяжелой цепях иммуноглобулина (т.е. доменов VL и VH соответственно). Взаимодействие легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела и, в частности, взаимодействие его доменов VL и VH образуют один из сайтов связывания с эпитопом в антителе. Напротив, конструкция scFv содержит домены VL и VH антитела, находящиеся на одной полипептидной цепи, при этом домены отделяются гибким линкером достаточной длины для обеспечения самосборки двух доменов в функциональный сайт связывания с эпитопом. Если самосборка доменов VL и VH оказывается невозможной из-за недостаточной длины линкера (менее приблизительно 12 аминокислотных остатков), две из конструкций scFv взаимодействуют друг с другом с образованием бивалентной молекулы, в которой VL одной цепи ассоциируется VH другой (что рассматривается в Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies" Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658).

Показали, что в дополнение к их известным применениям в диагностике антитела применимы в качестве терапевтических средств. В последние несколько десятилетий возродился интерес к терапевтическому потенциалу антител, и антитела стали одним из ведущих классов получаемых биотехнологическими методами лекарственных средств (Chan, C.E. et al. (2009) "The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases" Singapore Med. J. 50(7):663-666). Почти 200 лекарственных средств на основе антител были одобрены для применения или находятся в разработке.

Натуральные антитела способны связываться только с одним видом эпитопа (т.е. моноспецифические), хотя они могут связывать несколько копий этого вида (т.е. проявляют бивалентность или мультивалентность). Разработан широкий ряд рекомбинантных форматов биспецифического антитела (см., например, PCT публикации № WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968), в большинстве из которых используются линкерные пептиды либо для слияния антитела против ядерного антигена (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) с дополнительным связывающим белком (например, scFv), либо для слияния, например, двух Fab-фрагментов или scFv. Как правило, такие подходы предусматривают компромиссы и альтернативы. Например, в PCT публикациях № WO 2013/174873, WO 2011/133886 и WO 2010/136172 раскрывается, что применение линкеров может вызывать проблемы в терапевтических планах, и описывается триспецифическое антитело, в котором домены CL и CH1 переключаются от их соответствующих естественных положений, а домены VL и VH были диверсифицированы (WO 2008/027236; WO 2010/108127) для обеспечения их связывания с более чем одним антигеном. Таким образом, молекулы, раскрываемые в этих документах, меняют специфичность связывания на способность связывать дополнительный вид антигена. В PCT публикациях № WO 2013/163427 и WO 2013/119903 раскрывается модификация домена CH2 с содержанием аддукта белка слияния, включающего в себя связывающий домен. В документе отмечается, что домен CH2, вероятно, играет всего лишь минимальную роль в опосредовании эффекторной функции. В PCT публикациях № WO 2010/028797, WO 2010028796 и WO 2010/028795 раскрываются рекомбинантные антитела, у которых Fc-области были замещены дополнительными доменами VL и VH с тем, чтобы сформировать трехвалентные связывающие молекулы. В PCT публикациях № WO 2003/025018 и WO 2003012069 раскрываются рекомбинантные диатела, у которых отдельные цепи содержат scFv-домены. В PCT публикации № WO 2013/006544 раскрываются мультивалентные молекулы Fab, которые синтезируют как отдельную полипептидную цепь, а затем подвергают протеолизу для получения гетеродимерных структур. Таким образом, молекулы, раскрываемые в данных документах, меняют все или некоторые из способностей опосредования эффекторной функции на способность связывать дополнительный вид антигена. В PCT публикациях № WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 и WO 1991/003493 раскрывается добавление дополнительных связывающих доменов или функциональных групп в антитело или часть антитела (например, добавление диатела в легкую цепь антитела, или добавление дополнительных доменов VL и VH в легкую и тяжелую цепи антитела, или добавление гетерологичного белка слияния, или сцепление множественных Fab-доменов друг с другом). Таким образом, молекулы, раскрываемые в этих документах, меняют нативную структуру антитела на способность связывать дополнительный вид антигена.

Кроме того, в уровне техники отмечается способность продуцировать диатела, которые отличаются от таких естественных антител способностью связывать два или более различных видов эпитопа (т.е. проявляют биспецифичность или мультиспецифичность в дополнение к бивалентности или мультивалентности) (см., например, Holliger et al. (1993) ""Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Protein Eng Des Sel. 17(l):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy" Cancer Res. 69(12):4941-4944).

Конструкция диатела основывается на одноцепочечных фрагментах вариабельной области (scFv). Такие молекулы получают путем связывания вариабельных областей легкой и/или тяжелой цепи с использованием короткого связывающего пептида. Bird et al. (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins" Science 242:423-426) раскрывают пример связывающих пептидов, которые представляют собой мостик длиной приблизительно 3,5 нм между карбокси-концом одной вариабельной области и амино-концом другой вариабельной области. Были сконструированы и использованы линкеры других последовательностей (Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242:423-426). Линкеры, в свою очередь, могут быть модифицированы для дополнительных функций, таких как присоединение лекарственных средств или присоединение к твердым подложкам. Одноцепочечные варианты могут быть получены, либо рекомбинантным путем, либо синтетическим. Для синтетического получения scFv может быть использован автоматический синтезатор. Для рекомбинантного получения scFv приемлемая плазмида, содержащая полинуклеотид, который кодирует scFv, может быть введена в приемлемую клетку-хозяина, либо эукариотическую, такую как клетки дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих, либо прокариотическую, такую как E.coli. Полинуклеотиды, кодирующие представляющий интерес scFv,

могут быть получены рутинными манипуляциями, такими как лигирование полинуклеотидов. Полученный в результате scFv может быть выделен с использованием стандартных методик очистки белков, известных в уровне техники.

Патент Соединенных Штатов Америки № 7585952 и публикация патентного документа Соединенных Штатов Америки № 2010-0173978 касаются молекул scFv, которые являются иммуноспецифическими по отношению к ErbB2. Были описаны биспецифические активаторы Т-клеток ("BiTE"), тип молекул scFv (WO 05/061547; Baeuerle, P et al. (2008) "BiTE: A New Class Of Antibodies That Recruit T Cells" Drugs of the Future 33:137-147; Bargou, et al. 2008; "Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody", Science 321: 974-977). Такие молекулы состоят из молекулы с одной полипептидной цепью, имеющей два антиген-связывающих домена, один из которых иммуноспецифически связывается с эпитопом CD3, а второй из которых иммуноспецифически связывается с антигеном, присутствующим на поверхности мишеневой клетки.

Описаны биспецифические молекулы, которые нацеливаются как на CD19, так и на CD3. Блинатумомаб, биспецифический в отношении scFv-CD19 x CD3 BiTE, проходит клинические испытания и, как сообщается, характеризуется аффинностью в отношении CD3 ~100 нМ и аффинностью в отношении CD19 ~1 нМ. Блинатумомаб демонстрирует EC_{50} в отношении лизиса мишеневых клеток in vitro ~10-100 пг/мл (Frankel et al. (2013) "Targeting T Cells To Tumor Cells Using Bispecific Antibodies", Curr. Opin. Chem. Biol. 17:385-392). Также были разработаны биспецифические переориентирующиеся антитела к CD19 x CD3 с двойной аффинностью (DART) (Moore et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma" Blood 117(17):4542-4551). По сравнению с биспецифическим в отношении scFv-CD19 x CD3 BiTE эта молекула демонстрировала подобные аффинности связывания, но характеризовалась более низкой EC_{50} для лизиса мишеневых клеток in vitro ~0,5-5 пг/мл, а также демонстрировала постоянно более высокие уровни максимального лизиса AFM11, также был описан биспецифический в отношении CD19 x CD3 Tandab. Сообщалось, что AFM11 характеризовался более низкой EC_{50} для лизиса мишеневых клеток in vitro ~0,5-5 пг/мл (Zhukovsky et al. (2013) "A CD19/CD3 Bispecific Tandab, AFM11, Recruits T Cells To Potently and Safely Kill CD19+ Tumor Cells", J Clin Oncol 31, 2013 (suppl; abstr 3068)). Ни одна из этих конструкций не включает в себя Fc-домен.

Несмотря на такой успех, получение стабильных функциональных гетеродимерных не являющихся моноспецифическими диател может быть дополнительно оптимизировано путем тщательного рассмотрения и размещения цистеиновых остатков в одной или нескольких используемых полипептидных цепях. Такие оптимизированные диатела могут быть получены с более высоким выходом и с большей активностью, чем неоптимизированные диател. Настоящее изобретение, таким образом, относится к проблеме обеспечения полипептидов, которые специально разработаны и оптимизированы для образования гетеродимерных диател. Настоящее изобретение решает эту проблему посредством обеспечения типичных оптимизированных диател к CD19 x CD3.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат две полипептидных цепи и которые имеют один сайт связывания, специфический по отношению к эпитопу CD19, и один сайт связывания, специфический по отношению к эпитопу CD3 (т.е. "биспецифическое моновалентное диателo к CD19 x CD3"). Наиболее предпочтительно, такие биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 состоят из трех полипептидных цепей и имеют один сайт связывания, специфический по отношению к эпитопу CD19, и один сайт связывания, специфический по отношению к эпитопу CD3, а также дополнительно содержат Fc-домен иммуноглобулина (т.е. "биспецифическое моновалентное Fc-диателo к CD19 x CD3"). Биспецифические моновалентные диатела и биспецифические моновалентные Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением способны одновременно связываться с CD19 и CD3. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные диатела или такие биспецифические моновалентные Fc-диатела. Настоящее изобретение, кроме того, относится к способам применения таких диател в лечении заболевания, в частности, гематологических злокачественных заболеваний.

Биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 и биспецифические моновалентные Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, содержат по меньшей мере две различных полипептидных цепи. Полипептидные цепи таких диател ассоциируются друг с другом гетеродимерным образом с образованием одного сайта связывания, специфического по отношению к эпитопу CD19, и одного сайта связывания, специфического по отношению к эпитопу CD3. Биспецифическое моновалентное диателo к CD19 x CD3 или биспецифическое моновалентное Fc-диателo в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, является моновалентным, поскольку оно способно связываться только с одной копией эпитопа CD19 и только с одной копией эпитопа CD3, но и биспецифическим, поскольку одно диателo способно связываться одновременно с эпитопом CD19 и с эпитопом CD3. Каждая из полипептидных цепей диател ковалентно связана с другой полипептидной цепью диателa, например, с помощью дисульфидной связи цистеиновых остатков, расположенных в таких полипептидных цепях, с образованием таким образом ковалентно связанного комплекса. Согласно конкретным вариантам осуще-

ствления диатела в соответствии с настоящим изобретением дополнительно имеют Fc-домен иммуноглобулина и/или альбумин-связывающий домен для продления периода полувыведения in vivo.

Более подробно, настоящее изобретение относится к биспецифическому моновалентному Fc-диателу к CD19 x CD3, способному к специфическому связыванию с CD19 и с CD3, при этом диателo содержит первую, вторую и третью полипептидную цепь, при этом полипептидные цепи образуют ковалентно связанный комплекс, и при этом:

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

A) домен IA, содержащий:

(1) субдомен (IA1), который содержит домен VL, способный связываться либо с CD19 (VL_{CD19}), либо с CD3 (VL_{CD3}); и

(2) субдомен (IA2), который содержит домен VH, способный связываться либо с CD19 (VH_{CD19}), либо с CD3 (VH_{CD3});

при этом субдомены IA1 и IA2 отделяются друг от друга полипептидным линкером и представляют собой либо

(a) VL_{CD19} и VH_{CD3}; либо

(b) VL_{CD3} и VH_{CD19};

B) домен IB, содержащий заряженный гетеродимер-промоторный домен, при этом домен IB отделен от домена IA полипептидным линкером;

C) домен IC, содержащий домен CH2-CH3 антитела; и

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

A) домен IIA, содержащий:

(1) субдомен (IIA1), который содержит домен VL, способный связываться либо с CD19 (VL_{CD19}), либо с CD3 (VL_{CD3}); и

(2) субдомен (IIA2), который содержит домен VH, способный связываться либо с CD19 (VH_{CD19}), либо с CD3 (VH_{CD3});

при этом субдомены IIA1 и IIA2 отделяются друг от друга полипептидным линкером и представляют собой:

(a) VL_{CD19} и VH_{CD3}, если субдоменами IA1 и IA2 являются VL_{CD3} и VH_{CD19}; или

(b) VL_{CD3} и VH_{CD19}, если субдоменами IA1 и IA2 являются VL_{CD19} и VH_{CD3};

B) домен IIB, содержащий заряженный гетеродимер-промоторный домен, при этом домен IIB отделен от домена IIA полипептидным линкером, и при этом заряженный гетеродимер-промоторный домен домена IB и заряженный гетеродимер-промоторный домен домена IIB имеют противоположные заряды; и

III) третья полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу домен IIIC, который содержит домен CH2-CH3 антитела;

при этом домены VL_{CD19} и VH_{CD19} образуют CD19-связывающий домен, а домены VL_{CD3} и VH_{CD3} образуют CD3-связывающий домен; и домены CH2-CH3 первой и третьей полипептидных цепей образуют Fc-домен, способный связываться с Fc-рецептором с образованием тем самым биспецифического моновалентного диатела к CD19 x CD3.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к варианту осуществления вышеупомянутого биспецифического моновалентного Fc-диатела к CD19 x CD3, в котором:

(A) каждый из доменов IB и IIB содержит цистеиновый остаток, который ковалентно связывает первую полипептидную цепь со второй полипептидной цепью с помощью дисульфидной связи; и

(B) каждый из доменов IC и IIIC содержит цистеиновый остаток, который ковалентно связывает первую полипептидную цепь с третьей полипептидной цепью с помощью дисульфидной связи.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к варианту осуществления любого из вышеупомянутых биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3, в котором VL_{CD19} имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, а VH_{CD19} имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к варианту осуществления любого из вышеупомянутых биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3, в котором VL_{CD3} имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, а VH_{CD3} имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к варианту осуществления любого из вышеупомянутых биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3, в котором домен CH2-CH3 домена IC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, а домен CH2-CH3 домена IIIC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к варианту осуществления любого из вышеупомянутых биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3, в котором:

(A) заряженный гетеродимер-промоторный домен домена IB имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, а заряженный гетеродимер-промоторный домен домена IIB имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; или

(B) заряженный гетеродимер-промоторный домен домена IB имеет аминокислотную последова-

тельность SEQ ID NO: 12, а заряженный гетеродимер-промоторный домен домена IIB имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к варианту осуществления любого из вышеупомянутых биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3, в котором:

(A) первая полипептидная цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

(B) вторая полипептидная цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и

(C) третья полипептидная цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к варианту осуществления любого из вышеупомянутых биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3, который способен перекрестно реагировать с CD19 и CD3 как человека, так и примата.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к любому из описанных выше биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3 для применения в качестве фармацевтического средства.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к любому из описанных выше биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3 для применения в лечении заболевания или состояния, ассоциируемого с экспрессией CD19 или характеризуемого таковой, или в способе лечения заболевания или состояния, характеризуемого экспрессией CD19, в частности, если заболеванием или состоянием, ассоциируемым с экспрессией CD19 или характеризуемым таковой, является злокачественная опухоль, и, более конкретно, если злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), хронического миелогенного лейкоза (CML), в том числе бластного криза CML и онкогена Абельсона, ассоциирующегося с CML (транслокация Bcr-ABL), миелодиспластического синдрома (MDS), острого B-клеточного лимфобластного лейкоза (B-ALL), диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), в том числе синдрома Рихтера или трансформации Рихтера CLL, волосатоклеточного лейкоза (HCL), новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток (BPDCN), неходжкинских лимфом (NHL), в том числе лейкоза из клеток мантийной зоны (MCL) и мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL), лимфомы Ходжкина, системного мастоцитоза и лимфомы Беркитта.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к ковалентно связанному полипептидному комплексу, при этом полипептидный комплекс содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, при этом:

(A) первая полипептидная цепь содержит полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, связанной с гетеродимер-промоторным доменом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12; и

(B) вторая полипептидная цепь содержит полипептид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, связанной с гетеродимер-промоторным доменом с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13;

при этом гетеродимер-промоторные домены первой полипептидной цепи и гетеродимер-промоторные домены второй полипептидной цепи ковалентно связаны друг с другом с помощью дисульфидной связи.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к фармацевтической композиции, содержащей любое из описанных выше биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3 и физиологически приемлемый носитель. Настоящее изобретение, кроме того, относится к применению такой фармацевтической композиции в лечении заболевания или состояния, ассоциируемого с экспрессией CD19 или характеризуемого таковой, в частности, если заболеванием или состоянием, ассоциируемым с экспрессией CD19 или характеризуемым таковой, является злокачественная опухоль, и более конкретно, если злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), хронического миелогенного лейкоза (CML), в том числе бластного криза CML и онкогена Абельсона, ассоциирующегося с CML (транслокация Bcr-ABL), миелодиспластического синдрома (MDS), острого B-клеточного лимфобластного лейкоза (B-ALL), диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), в том числе синдрома Рихтера или трансформации Рихтера CLL, волосатоклеточного лейкоза (HCL), новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток (BPDCN), неходжкинских лимфом (NHL), в том числе лейкоза из клеток мантийной зоны (MCL) и мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL), лимфомы Ходжкина, системного мастоцитоза и лимфомы Беркитта.

Биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 и биспецифические моновалентные Fc-диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно способны демонстрировать подобную аффинность связывания с растворимым CD3 человека или яванского макака и 10-кратную разницу в связывании с CD19, как проанализировали с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (BIAcore) или как проанализировали с помощью проточной цитометрии с использованием популяции гейтированных как CD4+ и CD8+ Т-клеток и популяции гейтированных как CD20+ B-клеток.

Биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 и биспецифические моновалентные Fc-диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно способны к опосре-

дованию перенаправленного киллинга мишеневых опухолевых клеток с использованием человеческих Т-клеток в анализе с использованием какой-либо из 3 мишеневых линий В-клеточной лимфомы, Raji/GF (лимфомы Беркитта), HBL-2 (лимфомы из клеток мантийной зоны) или Jeko-1 (лимфомы из клеток мантийной зоны), а также с использованием очищенных человеческих первичных Т-клеток в качестве эффекторных клеток. В таком анализе киллинг мишеневых опухолевых клеток измеряют с помощью анализа высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH), при котором ферментативную активность LDH, высвобожденной из клеток в результате клеточной смерти, измеряют количественно, или с помощью анализа с люциферазой, при котором относительная световая единица (RLU) люциферазы является показателем для определения относительной жизнеспособности мишеневых клеток Raji/GF, которые были сконструированы для экспрессии генов как зеленого флуоресцентного белка (GFP), так и люциферазы. Наблюдаемая EC_{50} такого перенаправленного киллинга составляет приблизительно 5 пМ или меньше, приблизительно 3 пМ или меньше, приблизительно 1 пМ или меньше, приблизительно 0,5 пМ или меньше, приблизительно 0,3 пМ или меньше, приблизительно 0,2 пМ или меньше, приблизительно 0,1 пМ или меньше, приблизительно 0,05 пМ или меньше, приблизительно 0,04 пМ или меньше, приблизительно 0,03 пМ или меньше, приблизительно 0,02 пМ или меньше, или приблизительно 0,01 пМ или меньше.

Биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 и биспецифические моновалентные Fc-диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно способны опосредовать цитотоксичность по отношению к мононуклеарным клеткам периферической крови (PBMC) человека и яванского макака, чтобы вызывать зависимое от дозы истощение CD20+ В-клеток в обеих этих клеточных системах при отношении эффекторных клеток к Т-клеткам 2:1, 3:1, 4: 1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 или 9:1. Наблюдаемая EC_{50} истощения CD20+ В-клеток человека составляет приблизительно 7 пМ или меньше, приблизительно 5 пМ или меньше, приблизительно 3 пМ или меньше, приблизительно 1 пМ или меньше, приблизительно 0,5 пМ или меньше, приблизительно 0,3 пМ или меньше, приблизительно 0,2 пМ или меньше, приблизительно 0,1 пМ или меньше, приблизительно 0,05 пМ или меньше, приблизительно 0,04 пМ или меньше, приблизительно 0,03 пМ или меньше, приблизительно 0,02 пМ или меньше, или приблизительно 0,01 пМ или меньше. Наблюдаемая EC_{50} истощения CD20+ В-клеток яванского макака составляет приблизительно 1000 пМ или меньше, приблизительно 900 пМ или меньше, приблизительно 800 пМ или меньше, приблизительно 500 пМ или меньше, приблизительно 300 пМ или меньше, приблизительно 100 пМ или меньше, приблизительно 50 пМ или меньше, приблизительно 20 пМ или меньше, приблизительно 10 пМ или меньше, приблизительно 5 пМ или меньше, приблизительно 2 пМ или меньше, или приблизительно 1 пМ или меньше, так что отношение истощения аутологичных В-клеток человека к истощению В-клеток яванского макака составляет приблизительно 500:1 или меньше, приблизительно 300:1 или меньше, приблизительно 100:1 или меньше, приблизительно 50:1 или меньше, приблизительно 20:1 или меньше, или приблизительно 10:1 или меньше.

Биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 и биспецифические моновалентные Fc-диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно способны опосредовать высвобождение цитокинов (например, IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-6 и IL-10, а особенно IFN-γ и TNF-α) из PBMC человека и яванского макака. Такое высвобождение составляет приблизительно 5000 пг/мл или меньше, приблизительно 4000 пг/мл или меньше, приблизительно 3000 пг/мл или меньше, приблизительно 2000 пг/мл или меньше, приблизительно 1000 пг/мл или меньше, приблизительно 500 пг/мл или меньше, приблизительно 2000 пг/мл или меньше, или приблизительно 100 пг/мл или меньше. Средняя EC_{50} такого высвобождения цитокина из PBMC человека составляет приблизительно 100 пМ или меньше, приблизительно 90 пМ или меньше, приблизительно 80 пМ или меньше, приблизительно 50 пМ или меньше, приблизительно 30 пМ или меньше, приблизительно 20 пМ или меньше, приблизительно 10 пМ или меньше, или приблизительно 5 пМ или меньше. Средняя EC_{50} такого высвобождения цитокина из PBMC яванского макака составляет приблизительно 3000 пМ или меньше, приблизительно 2000 пМ или меньше, приблизительно 1000 пМ или меньше, приблизительно 500 пМ или меньше, приблизительно 300 пМ или меньше, приблизительно 200 пМ или меньше, приблизительно 100 пМ или меньше, или приблизительно 50 пМ или меньше.

Биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 и биспецифические моновалентные Fc-диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно способны опосредовать ингибирование роста опухоли В-клеточной лимфомы человека в совместно смешанном ксенотрансплантате, в котором такие молекулы вводят мышам NOD/SCID вместе с опухолевыми клетками HBL-2 (лимфомы из клеток мантийной зоны человека) или Raji (лимфомы Беркитта) и активированными Т-клетками человека при отношении 1:5. Предпочтительно, такие диатела способны ингибировать рост опухоли, если обеспечены в концентрации более 100 мкг/мл, в концентрации приблизительно 100 мкг/кг, в концентрации приблизительно 80 мкг/кг, в концентрации приблизительно 50 мкг/кг, в концентрации приблизительно 20 мкг/кг, в концентрации приблизительно 10 мкг/кг, в концентрации приблизительно 5 мкг/кг, в концентрации приблизительно 2 мкг/кг, в концентрации приблизительно 1 мкг/кг, в концентрации приблизительно 0,5 мкг/кг, в концентрации приблизительно 0,2 мкг/кг, в концентрации приблизи-

тельно 0,1 мкг/кг, в концентрации приблизительно 0,05 мкг/кг, в концентрации приблизительно 0,02 мкг/кг, в концентрации приблизительно 0,01 мкг/кг, или в концентрации приблизительно 0,005 мкг/кг, или в концентрации менее 0,005 мкг/кг.

Биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 и биспецифические моновалентные Fc-диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно способны проявлять противоопухолевую активность в модели ксенотрансплантата HBL-2 (лимфомы из клеток мантийной зоны человека) у самок мышей NSG B2m-/- с имплантированными опухолевыми клетками HBL-2 внутрикожно (ID) в день 0 с последующей внутрибрюшинной (IP) инъекцией PBMC в день 4 и с введением диатела в день 17, чтобы вызывать снижение объема опухоли на приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 40%, приблизительно 60%, приблизительно 80%, приблизительно 90% или более чем 90%.

Биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 и биспецифические моновалентные Fc-диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно способны демонстрировать пролонгированные периоды полувыведения при введении реципиенту-человеку или отличному от человека животному. Такие периоды полувыведения могут быть измерены путем введения диатела трансгенной с помощью humFcRn мыши (патенты Соединенных Штатов Америки № 6992234 и 7358416; Haraya, K. (2014) "Application Of Human FcRn Transgenic Mice As A Pharmacokinetic Screening Tool Of Monoclonal Antibody", Xenobiotica 2014 Jul 17:1-8; Proetzel, G. et al. (2014) "Humanized FcRn mouse models for evaluating pharmacokinetics of human IgG antibodies", Methods 65(1):148-153; Stein, C. et al. (2012) "Clinical Chemistry Of Human FcRn Transgenic Mice", Mamm. Genome 23(3-4):259-269; Roopenian, D.C. et al. (2010) "Human FcRn Transgenic Mice For Pharmacokinetic Evaluation Of Therapeutic Antibodies", Methods Molec. Biol. 602:93-104). Измерение выполняют с использованием мыши B6.Cg-Fcgrt^{tmlDcr} (CAG-FCGRT)276Dcr/DcrJ (инвентарный номер 004919), доступной из Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, US.

Чтобы исключить всякие сомнения, диатела в соответствии с настоящим изобретением могут проявлять один, два, три, более чем три или все из функциональных признаков, описываемых в настоящем документе. Таким образом, диатела в соответствии с настоящим изобретением могут проявлять любую комбинацию функциональных признаков, описываемых в настоящем документе.

Диатела в соответствии с настоящим изобретением можно применять в качестве фармацевтического средства. Предпочтительно, диатела применяют в лечении заболевания или состояния, ассоциируемого с экспрессией CD19 или характеризуемого таковой. Настоящее изобретение также относится к применению диатела в соответствии с настоящим изобретением в изготовлении фармацевтической композиции, предпочтительно, для лечения заболевания или состояния, ассоциируемого с экспрессией CD19 или характеризуемого таковой, как далее определяется в настоящем документе.

Заболеванием или состоянием, ассоциируемым с экспрессией CD19 или характеризуемым таковой, может быть B-клеточное злокачественное заболевание (Campo, E. et al. (2011) "The 2008 WHO Classification Of Lymphoid Neoplasms And Beyond: Evolving Concepts And Practical Applications", Blood 117(19):5019-5032)). Например, злокачественная опухоль может быть выбрана из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), хроническом миелогенного лейкоза (CML), в том числе бластного криза CML и онкогена Абельсона, ассоциирующегося с CML (транслокация Bcr-ABL), миелодиспластического синдрома (MDS), острого B-клеточного лимфобластного лейкоза (B-ALL), диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), в том числе синдрома Рихтера или трансформации Рихтера CLL, волосатоклеточного лейкоза (HCL), новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток (BPDCN), неходжкинских лимфом (NHL), в том числе лейкоза из клеток мантийной зоны (MCL) и мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL), лимфомы Ходжкина, системного мастоцитоза и лимфомы Беркитта.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к фармацевтической композиции, содержащей любое из описанных выше диател и физиологически приемлемый носитель. Настоящее изобретение, в частности, относится к такой фармацевтической композиции, которой лечат заболевание или состояние, невосприимчивое к лечению ритуксимабом.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к применению описываемой выше фармацевтической композиции в лечении заболевания или состояния, ассоциируемого с экспрессией CD19 или характеризуемого таковой.

Настоящее изобретение, в частности, относится к варианту осуществления такого применения, при котором заболеванием или состоянием, ассоциируемым с экспрессией CD19 или характеризуемым таковой, является B-клеточное злокачественное заболевание (в частности, злокачественная опухоль, выбранная из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), хроническом миелогенного лейкоза (CML), в том числе бластного криза CML и онкогена Абельсона, ассоциирующегося с CML (транслокация Bcr-ABL), миелодиспластического синдрома (MDS), острого B-клеточного лимфобластного лейкоза (B-ALL), диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), в том числе синдрома Рихтера или трансформации Рихтера CLL, волосатоклеточного лейкоза (HCL), новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных

клеток (BPDCN), неходжкинских лимфом (NHL), в том числе лейкоза из клеток мантийной зоны (MCL) и мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL), лимфомы Ходжкина, системного мастоцитоза и лимфомы Беркитта).

Термины, такие как "приблизительно", следует понимать как предел 10%, более предпочтительно предел 5% определенного значения, если контекстом не установлено иное.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 иллюстрируется структура ковалентно связанного биспецифического моновалентного диатела, состоящего из двух полипептидных цепей.

На фиг. 2A и 2B иллюстрируются структуры двух версий первой, второй и третьей полипептидных цепей трехцепочечного биспецифического моновалентного Fc-диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением (версия 1, фиг. 2A; версия 2, фиг. 2B).

На фиг. 3 показано одновременное взаимодействие DART-A как с CD19, так и с CD3 (●). Ни контрольное DART 1 (■), ни контрольное DART 2 (▲) не способны связываться с обеими мишенями одновременно.

На фиг. 4A-4B показано связывание биспецифической молекулы к CD19 x CD3 (DART-A) с CD20+ B-клетками человека (фиг. 4A) и яванского макака (фиг. 4B).

На фиг. 5A-5B показано связывание биспецифической молекулы к CD19 x CD3 (DART-A) с CD4+ и CD8+ T-клетками человека (фиг. 5A) и яванского макака (фиг. 5B).

На фиг. 6A-6F показан опосредованный биспецифической молекулой к CD19 x CD3 (DART-A) перенаправленный киллинг мишеневых клеток по сравнению с контрольным DART 1. Кривые доза-ответ опосредованной DART-A цитотоксичности с использованием первичных человеческих T-клеток в качестве эффекторных клеток для мишеневых клеточных линий: HBL-2 (фиг. 6A), Raji/GF (зеленый флуоресцентный) (фиг. 6B), Jeko-1 (фиг. 6C), Molm-13 (фиг. 6D) и Colo205/Luc (фиг. 6F) с киллингом мишеневых клеток, измеряемым с использованием анализа LDH. На фиг. 6E показан киллинг клеток Raji/GF, определяемый с использованием анализа с люциферазой (RLU) для измерения относительной жизнеспособности клеток. Значения EC_{50} для DART-A показаны на каждом графике для 1 типичного эксперимента. DART-A: ▲; контрольное DART 1: ▼.

На фиг. 7A-7D показан опосредованный биспецифической молекулой к CD19 x CD3 (DART-A) перенаправленный киллинг мишеневых клеток Raji/GF при варьирующих отношениях E:T-клетка (10:1 (●), 5:1 (■) и 2,5:1 (▲)). Кривые доза-ответ опосредованной DART-A цитотоксичности (цитотоксичности в процентах) с первичными человеческими T-клетками в качестве эффекторных клеток для CD19+ мишеневых клеток Raji/GF, определяемой после 24-часовой инкубации (фиг. 7A) и после 48-часовой инкубации (фиг. 7B). Кривые доза-ответ опосредованной DART-A цитотоксичности (цитотоксичности в процентах) с первичными человеческими T-клетками в качестве эффекторных клеток для CD19-отрицательных клеток JIMT-1, определяемой после 24-часовой инкубации (фиг. 7C) и после 48-часовой инкубации (фиг. 7D), были включены в качестве контролей. Показан 1 из 3 типичных экспериментов, в каждом из которых использовали T-клетки от независимых доноров.

На фиг. 8A-8D показан опосредованный биспецифической молекулой к CD19 x CD3 (DART-A) перенаправленный киллинг мишеневых клеток Raji/GF при более низких отношениях E:T-клетка 2,5:1 (●) или 1:1 (■). Кривые доза-ответ опосредованной DART-A цитотоксичности (цитотоксичности в процентах) с первичными человеческими T-клетками в качестве эффекторных клеток для CD19+ мишеневых клеток Raji/GF, определяемой после 72-часовой инкубации (фиг. 8A) и после 96-часовой инкубации (фиг. 8B). Кривые доза-ответ опосредованной DART-A цитотоксичности (цитотоксичности в процентах) с первичными человеческими T-клетками в качестве эффекторных клеток для CD19-отрицательных клеток JIMT-1, определяемой после 72-часовой инкубации (фиг. 8C) и после 96-часовой инкубации (фиг. 8D), были включены в качестве контролей. Показан 1 из 3 типичных экспериментов, в каждом из которых использовали T-клетки от независимых доноров.

На фиг. 9A-9B показано опосредованное биспецифической молекулой к CD19 x CD3 (DART-A) истощение аутологичных B-клеток в PBMC человека или яванского макака. Кривые доза-ответ представлены для опосредованного DART (DART-A или контрольным DART 1) истощения аутологичных B-клеток. Фиг. 9A: процент CD20+ клеток человека после обработки PBMC с различными дозами DART-A или контрольного DART 1. Фиг. 9B: процент CD20+ клеток яванского макака после обработки PBMC с различными дозами DART-A или контрольного DART 1. На каждом графике показаны значения EC_{50} для DART-A. Процент CD3+ клеток анализировали параллельно и использовали в качестве внутреннего эталонного контроля, не наблюдали никаких изменений при какой-либо тестируемой концентрации. DART-A: ▲; контрольное DART 1: ▼.

На фиг. 10 показан опосредованный биспецифической молекулой к CD19 x CD3 (DART-A) перенаправленный киллинг мишеневых клеток с PBMC яванского макака при E:T=30:1. DART-A: ▲; контрольное DART 1: ▼.

На фиг. 11A-11C показано опосредованное биспецифической молекулой к CD19 x CD3 (DART-A) высвобождение цитокина из человеческих T-клеток в присутствии мишеневых клеток. Человеческие T-клетки обрабатывали DART-A или контрольным DART 1 в течение приблизительно 24 ч в присутствии

мишеневых клеток Raji/GF. Культуральные супернатанты собирали и подвергали основанному на ELISA измерению цитокинов. Показан один типичный эксперимент из 2 с использованием разных доноров. Фиг. 11A: высвобождение γ-интерферона (IFNγ); фиг. 11B: высвобождение фактора некроза опухоли-α (TNF-α); фиг. 11C: высвобождение интерлейкина-2 (IL-2). DART-A: ▲; контрольное DART 1: ▼.

На фиг. 12A-12D показана активация человеческих Т-клеток в ходе перенаправленного клеточного киллинга биспецифической молекулой к CD19 x CD3 (DART-A) по сравнению с контрольным DART 1. Кривые доза-ответ опосредованной DART-A индукции маркеров Т-клеточной активации CD25 (фиг. 12A-12B) и CD69 (фиг. 12C-12D) в CD8+ (фиг. 12A и 12C) и CD4+ (фиг. 12B и 12D) человеческих Т-клетках с использованием мишеневых клеток Raji/GF. Показан один типичный эксперимент из 2, в каждом из которых использовали Т-клетки от разных доноров. DART-A: ▲; контрольное DART 1: ▼.

На фиг. 13A-13D показана активация Т-клеток яванского макака в ходе перенаправленного клеточного киллинга биспецифической молекулой к CD19 x CD3 (DART-A) по сравнению с контрольным DART 1. Кривые доза-ответ опосредованной DART-A индукции маркеров Т-клеточной активации CD25 (фиг. 13A и 13B) и CD69 (фиг. 13C и 13D) в CD8+ (фиг. 13A и 13C) и CD4+ (фиг. 13B и 13D) Т-клетках яванского макака или PBMC с использованием мишеневых клеток Raji/GF. Показан один типичный эксперимент с использованием Т-клеток. DART-A: ▲; контрольное DART 1: ▼.

На фиг. 14A-14D показано, что биспецифическая молекула к CD19 x CD3 (DART-A) и контрольное DART 1 не способны опосредовать активацию человеческих Т-клеток в присутствии CD19-отрицательных клеток JIMT-1. Представлена кривая доза-ответ опосредованной DART-A индукции маркеров Т-клеточной активации CD25 (фиг. 14A и 14B) и CD69 (фиг. 14C и 14D) в CD8+ (фиг. 14A и 14C) и CD4+ (фиг. 14B и 14D) от того же донора, что и на фиг. 12A-12D. DART-A: ▲; контрольное DART 1: ▼.

На фиг. 15A-15B показаны внутриклеточные уровни окрашивания гранзима B (фиг. 15A) и перфорина (фиг. 15B) в CD4+ и CD8+ человеческие Т-клетках после инкубации с мишеневыми клетками Raji/GF и DART-A или контрольным DART 1 при варьирующих концентрациях в течение 24 ч при отношении E:T 10:1.

На фиг. 16A и 16B показана пролиферация меченных CFSE человеческих Т-клеток с помощью анализа FACS после совместного культивирования с мишеневыми клетками HBL-2 при отношении E:T 10:1 в присутствии DART-A или контрольного DART 1 при 200 нг/мл в течение 24 ч (фиг. 16A) или 72 ч (фиг. 16B). Показаны профили окрашивания после совместного культивирования с клетками HBL-2 в присутствии DART-A (черные линии) или в присутствии контрольного DART 1 (серая заливка).

На фиг. 17 показано ингибирование роста опухоли биспецифической молекулой к CD19 x CD3 (DART-A) у мышей с имплантированными опухолевыми клетками HBL-2 в присутствии активированных человеческих Т-клеток. Не страдающим ожирением диабетическим/с тяжелым комбинированным иммунодефицитом самкам мышей (NOD/SCID) (n=8/группа) имплантировали подкожно (SC) опухолевые клетки HBL-2 + активированные человеческие Т-клетки в день 0 с последующей обработкой средой в качестве контроля, контрольным DART 1 или DART-A в дни 0-3, в общей сложности 4 дозами, вводимыми IV. Человеческие Т-клетки и клетки HBL-2 инкубировали при отношении 1:5 (1×10^6 и 5×10^6 клеток соответственно). Объем опухоли показан как среднее по группе ± SEM.

На фиг. 18 показано ингибирование роста опухоли биспецифической молекулой к CD19 x CD3 (DART-A) у мышей с имплантированными опухолевыми клетками Raji в присутствии активированных человеческих Т-клеток. Самкам мышей NOD/SCID (n=8/группа) имплантировали SC опухолевые клетки Raji + активированные человеческие Т-клетки в день 0 с последующей обработкой средой в качестве контроля, контрольным DART 1 или DART-A в дни 0-3, в общей сложности 4 дозами, вводимыми IV. Человеческие Т-клетки и клетки Raji инкубировали при отношении 1:5(1×10^6 и 5×10^6 клеток соответственно). Объем опухоли показан как среднее по группе ± SEM.

На фиг. 19A-19B показано изменение объема опухоли в зависимости от времени у мышей с имплантированными опухолевыми клетками HBL-2. Фиг. 19A: самкам мышей NSG B2m-/- (n=8 на группу) имплантировали внутрикожно (ID) опухолевые клетки HBL-2 (5×10^6) в день 0. В день 4 мышам имплантировали PBMC (5×10^7) внутрибрюшинно (IP). Затем мышей обрабатывали внутривенно (IV) средой, контрольным DART 1 или биспецифическим DART-A к CD19 x CD3, как указано (см. стрелки Rx). Объем опухоли показан как среднее по группе ± SEM. Фиг. 19B: самкам мышей NSG B2m-/- (n=8 на группу) имплантировали внутрикожно (ID) опухолевые клетки HBL-2 (5×10^6) в день 0. В день 4 мышам имплантировали PBMC (5×10^7) внутрибрюшинно (IP). Затем мышей обрабатывали внутривенно (IV) средой, контрольным DART 1 или биспецифическим DART-A к CD19 x CD3, как указано (см. стрелки Rx). Объем опухоли показан как среднее по группе ± SEM.

На фиг. 20A-20B показаны уровни циркулирующих B-клеток в зависимости от времени у яванских макаков после IV введения до 4 циклов еженедельных нарастающих доз биспецифического DART-A к CD19 x CD3. Яванских макаков в группе 1 (n=4) обрабатывали средой → 0,5 → 5 → 50 → 50 мкг/кг DART-A, вводимых IV в дни 1, 8, 15, 22 и 29 (показано вертикальными линиями точечного пунктира) (фиг. 20A). Яванских макаков в группе 2 (n=4) обрабатывали средой → 2 → 10 → 100 → 100 мкг/кг DART-A, вводимых IV в дни 1, 8, 15, 22 и 29 (показано вертикальными линиями точечного пунктира)

(фиг. 20B). Показаны данные для каждого яванского макака.

На фиг. 21A-21D показаны уровни циркулирующих B-клеток в зависимости от времени у яванских макаков после IV введения до 3 циклов еженедельных фиксированных доз или до 5 циклов каждый 3 день фиксированных доз DART-A. Яванских макаков в группах 3-5 (n=2 на группу) обрабатывали биспецифическим DART-A к CD19 x CD3. Группа 3 (фиг. 21A) получала 5 нг/кг DART-A, группа 4 (фиг. 21B) получала 50 нг/кг DART-A, а группа 5 (фиг. 21C) получала 500 нг/кг DART-A. DART-A вводили IV в дни 1, 8 и 15 (показано вертикальными линиями точечного пунктира). Яванских макаков в группе 6 (n=2) (фиг. 21D) обрабатывали с помощью 500 нг/кг DART-A, вводимого IV в дни 1, 4, 8, 11 и 15 (показано вертикальными линиями точечного пунктира). Показаны данные для каждого яванского макака.

На фиг. 22 показан фармакокинетический (PK) анализ DART-A на трансгенных с помощью humFcRn мышах. mAb 1, mAb 2 и mAb 3 представляют собой нерелевантные гуманизированные антитела IgG1, используемые в качестве контроля для обеспечения определения периода полувыведения типичного антитела у трансгенных животных.

На фиг. 23 показаны кривые выживаемости на модели клеток Raji-luc диссеминированного лейкоза у восстановленных с помощью PBMC человека мышей после обработки с помощью 500 мкг/кг DART-A (■), 500 мкг/кг контрольного DART 1 (▲) или среды в качестве контроля (●).

На фиг. 24 показаны кривые выживаемости на модели клеток Raji-luc диссеминированного лейкоза у восстановленных с помощью PBMC человека мышей после обработки с помощью 500 мкг/кг (●), 100 мкг/кг (■), 20 мкг/кг (○), 4 мкг/кг (▲), 0,8 мкг/кг (▼) или 0,16 мкг/кг (□) DART-A, 500 мг/кг (Δ) контрольного DART 1 или среды в качестве контроля (♦).

На фиг. 25 показаны кривые выживаемости на модели клеток Raji.luc лимфомы у восстановленных с помощью PBMC человека мышей после обработки с помощью 0,5 мг/кг DART-A (▲), 0,1 мг/кг DART-A (■) или среды в качестве контроля (●).

На фиг. 26 показаны кривые выживаемости на модели клеток Raji.luc лимфомы у восстановленных с помощью PBMC человека мышей после обработки с помощью 500 мкг/кг (■), 100 мкг/кг (▲), 20 мкг/кг (▼), 4 мкг/кг (♦), 0,8 мкг/кг (□) или 0,16 мкг/кг (Δ) DART-A, 0,1 мг/кг контрольного DART 1 (○) или среды в качестве контроля (●).

На фиг. 27 показан профиль концентрация в сыворотке крови-время для DART-A у яванского макака, которому вводили дозу 10 мкг/кг DART-A.

На фиг. 28 показано среднее ± SEM число CD45+/CD20+ клеток/мкл, определяемое с помощью проточной цитометрии для дня исследования и группы. Вертикальные пунктирные линии в дни 8, 15, 22 и 29 указывают каждую дозу (D)

DART-A путем 2-часовой IV инфузии для животных групп 2-5, при этом животные группы 1 продолжали получать среду в качестве контроля. Ось x, указывающая день исследования, разделена на 3 сегмента, охватывающих дни -7 - -1, дни 0-63 и дни 64-121.

На фиг. 29A-29I показан типичный FACS анализ злокачественных B-клеток (CD20+/CD5+) (фиг. 29A-29C), T-клеток (CD4+ или CD8+) (фиг. 29D-29E) и активации T-клеток (CD25 в CD4+ (фиг. 29F-29G) или CD8+ (фиг. 29H-29I) T-клетках) в PBMC CLL (E:T=1:23) после отсутствия обработки (фиг. 29A), обработки с помощью DART-A (фиг. 29C, 29E, 29G и 29I) или контрольного DART 1 (фиг. 29B, 29D, 29F и 29H) в течение 6 суток.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат две полипептидных цепи и которые имеют один сайт связывания, специфический по отношению к эпитопу CD19, и один сайт связывания, специфический по отношению к эпитопу CD3 (т.е. "биспецифическое моновалентное диателo к CD19 x CD3"). Наиболее предпочтительно, такие биспецифические моновалентные диателa к CD19 x CD3 состоят из трех полипептидных цепей и имеют один сайт связывания, специфический по отношению к эпитопу CD19, и один сайт связывания, специфический по отношению к эпитопу CD3, а также дополнительно содержат Fc-домен иммуноглобулина (т.е. "биспецифическое моновалентное Fc-диателo к CD19 x CD3"). Биспецифические моновалентные диателa и биспецифические моновалентные Fc-диателa в соответствии с настоящим изобретением способны одновременно связываться с CD19 и CD3. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные диателa или такие биспецифические моновалентные Fc-диателa. Настоящее изобретение, кроме того, относится к способам применения таких диател в лечении заболевания, в частности, гематологических злокачественных заболеваний.

A. Антитела и другие связывающие молекулы.

1. Антитела.

Используемый в настоящем документе термин "антитела" охватывает не только интактные поликлональные или моноклональное антитела, но также их мутантов, встречающиеся в природе варианты, белки слияния, содержащие часть антитела с сайтом распознавания антигена необходимой специфичности, гуманизированные антитела и химерные антитела, а также любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит сайт распознавания антигена необходимой специфичности. По всему настоящему изобретению аминокислотные остатки легкой и тяжелой цепей

антител нумеруются в соответствии с индексом EU по Kabat et al. (1992) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health Publication № 91-3242. Используемый в настоящем документе термин "антиген-связывающий фрагмент антитела" означает часть антитела, которая имеет по меньшей мере один сайт распознавания антигена. Используемый в настоящем документе термин охватывает фрагменты (такие как Fab, Fab', $F(ab')_2$ Fv) и отдельную цепь (scFv).

Термин "моноклональное антитело" относится к однородной популяции антител, при этом моноклональное антитело состоит из аминокислот (встречающихся в природе и невстречающихся в природе), которые участвуют в селективном связывании антигена. Моноклональные антитела являются высоко специфическими, направленными против одного антигенного сайта. Термин "моноклональное антитело" охватывает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также и их фрагменты (такие как Fab, Fab', $F(ab')_2$ Fv), отдельную цепь (scFv), их мутантов, белки слияния, содержащие часть антитела, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит сайт распознавания антигена необходимой специфичности и способна связываться с антигеном. Не предполагается ограничение в отношении источника антитела или способа его получения (например, с помощью гибридомы, фагового отбора, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и т.д.). Термин включает в себя целые иммуноглобулины, а также фрагменты и т.п., описанные выше под определением термина "антитело". Способы получения моноклональных антител известны в уровне техники. Одним способом, который может быть использован, является способ согласно Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity", Nature 256:495-497, или его модификация. Как правило, моноклональные антитела разрабатывают на мышах, крысах или кроликах. Антитела получают путем иммунизации животного иммуногенным количеством клеток, клеточных экстрактов или белковых препаратов, которые содержат желаемый эпитоп. Иммуногеном могут быть без ограничения первичные клетки, культивируемые клеточные линии, раковые клетки, белки, пептиды, нуклеиновые кислоты или ткань. Клетки, используемые для иммунизации, могут быть культивированы в течение периода времени (например, по меньшей мере 24 ч) до их применения в качестве иммуногена. Клетки могут быть использованы в качестве иммуногенов сами по себе или в комбинации с неденатурирующим адъювантом, таким как Ribi. Как правило, клетки должны сохраняться интактными и предпочтительно жизнеспособными при использовании в качестве иммуногенов. Интактные клетки могут обеспечивать лучшее выявление антигенов иммунизированным животным, чем разрушенные клетки. Применение денатурирующих или агрессивных вспомогательных средств, например, адъюванта Фрейнда, может разрушить клетки и, поэтому, не рекомендуется. Иммуноген может быть введен несколько раз в определенные периоды времени, например, два раза в неделю или один раз в неделю, или могут быть введены так, чтобы поддерживать жизнеспособность животного (например, в тканевом рекомбинанте). В качестве альтернативы, существующие моноклональные антитела и любые другие эквивалентные антитела, которые являются иммуноспецифическими в отношении желаемого патогенного эпитопа, могут быть секвенированы и получены рекомбинантным методом любыми средствами, известными в уровне техники. Согласно одному варианту осуществления такое антитело секвенируют, а затем полинуклеотидную последовательность клонируют в вектор для экспрессии или размножения. Последовательность, кодирующая представляющее интерес антитело, может быть сохранена в векторе в клетке-хозяине, и клетка-хозяин затем может быть размножена и заморожена для будущего применения. Полинуклеотидная последовательность таких антител может быть использована для генетической манипуляции по созданию биспецифических молекул в соответствии с настоящим изобретением, а также химерного антитела, гуманизированного антитела или канинизированного антитела для улучшения аффинности или других характеристик антитела. Общий принцип гуманизирования антитела предусматривает сохранение основной последовательности антиген-связывающей части антитела при замене не являющейся человеческой остальной части антитела последовательностями человеческого антитела. Существует четыре основных стадии для гуманизирования моноклонального антитела. Они представляют собой: (1) определение нуклеотидной и предполагаемой аминокислотной последовательности легкого и тяжелого вариабельных доменов исходного антитела, (2) конструирование гуманизированного антитела или канинизированного антитела, т.е. принятие решения о том, какую каркасную область антитела применять в ходе процесса гамунизации или канинизации, (3) фактические методы/методики гуманизации или канинизации и (4) трансфекцию и экспрессию гуманизированного антитела. См., например, патенты США № 4816567, 5807715, 5866692 и 6331415.

2. Биспецифические антитела, мультиспецифические диатела и диатела DART™.

Обеспечение немоноспецифических "диател" дает значительное преимущество над антителами: способность к совместному лигированию и совместной локализации клеток, которые экспрессируют различные эпитопы. Таким образом, бивалентные диатела находят широкое применение, в том числе в терапии и иммунодиагностике. Бивалентность обеспечивает большую гибкость в дизайне и конструировании диатела в различных применениях, обеспечивая повышенную авидность к мультимерным антигенам, сшивку различных антигенов и направленное нацеливание на конкретные типы клеток, с учетом наличия обоих мишеневых антигенов. Из-за их увеличенной валентности, низких скоростей диссоциации

и быстрого выведения из кровотока (для диател небольшого размера, равного ~50 кДа или ниже) молекулы диател, известные в уровне техники, также нашли конкретное применение в области получения визуализации опухолей (Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris", Protein Eng. 10:1221). Особое значение имеет совместное лигирование различных клеток, например, сшивка цитотоксических Т-клеток с опухолевыми клетками (Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells, " Nature 314:628-631, and Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", Protein Eng. 9:299-305).

Эпитоп-связывающие домены диатела, также могут быть направлены на поверхностную детерминанту В-клетки, такую как CD19, CD20, CD22, CD30, CD37, CD40 и CD74 (Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma" Blood 117(17):4542-4551; Cheson, B.D. et al. (2008) "Monoclonal Antibody Therapy For B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma" N. Engl. J. Med. 359(6):613-626; Castillo, J. et al. (2008) "Newer monoclonal antibodies for hematological malignancies", Exp. Hematol. 36(7):755-768). Во многих исследованиях также выяснили, что связывание диатела с детерминантами эффекторных клеток, например, с Fcγ-рецепторами (FcγR), активирует эффекторную клетку (Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody " Protein Eng. 9:299-305; Holliger et al. (1999) "Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-Cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins", Cancer Res. 59:2909-2916; WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). Обычно активация эффекторной клетки запускается связыванием связанного с антигеном антитела с эффекторной клеткой путем взаимодействия Fc-FcγR, таким образом, в связи с этим молекулы диатела могут проявлять подобную Ig функциональность независимо от того, содержат ли они Fc-домен (например, как анализируется в любом анализе эффекторной функции, известном в уровне техники или представленном в настоящем документе (например, в анализе ADCC)). Путем сшивки опухолевых и эффекторных клеток диатело не только приводит эффекторную клетку в непосредственную близость к опухолевым клеткам, но и приводит к эффективному киллингу опухоли (см., например, Cao et al. (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics", Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197).

Однако вышеупомянутые преимущества ведут к существенным затратам. Для образования таких немоноспецифических диател необходима успешная сборка двух или более отдельных и разных полипептидов (т.е. такое образование требует, чтобы диатела были сформированы путем гетеродимеризации различных видов полипептидных цепей). Этот факт контрастирует с моноспецифическими диателами, которые образуются посредством гомодимеризации идентичных полипептидных цепей. Так как для образования немоноспецифического диатела необходимо предусмотреть по меньшей мере два разнородных полипептида (т.е. два вида полипептида), и поскольку гомодимеризация таких полипептидов приводит к неактивным молекулам (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588), получение таких полипептидов должно быть выполнено таким образом, чтобы предотвратить ковалентную связь между полипептидами одного и того же вида (то есть чтобы предотвратить гомодимеризацию) (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588). Таким образом, в данной области изучено нековалентное связывание таких полипептидов (см., например, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulflde-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

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

Несмотря на эту проблему, в данной области удалось разработать стабильные, ковалентно связанные гетеродимерные немоноспецифические диатела под названием DART™ (см., например, публикации патентных документов Соединенных Штатов Америки № 2013-0295121; 2010-0174053 и 2009-0060910; публикации европейских патентов № EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 и PCT публикации № WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538, а также Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment

Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold" Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion", J. Mol. Biol. 399(3):436-449). Такие диатела содержат два или более ковалентно связанных полипептида и предусматривают конструирование одного или нескольких цистеиновых остатков в каждый из используемых видов полипептида. Например, было показно, что добавление цистеинового остатка на С-конец таких конструкций обеспечивает дисульфидную связь между полипептидными цепями, стабилизируя полученный в результате гетеродимер без влияния на характеристики связывания бивалентной молекулы.

Каждый из двух полипептидов простейшего DART™ содержит три домена (фиг. 1). Первый полипептид содержит (i) домен, который содержит область связывания вариабельного домена легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), (ii) второй домен, который содержит область связывания вариабельного домена тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), и (iii) третий домен, который служит для обеспечения гетеродимеризации со вторым полипептидом и для ковалентного связывания первого полипептида со вторым полипептидом диатела. Второй полипептид содержит комплементарный первый домен (домен VL2), комплементарный второй домен (домен VH1) и третий домен, который связывается с третьим доменом первой полипептидной цепи для обеспечения гетеродимеризации и ковалентного связывания с первой полипептидной цепью. Такие молекулы являются стабильными, эффективными и обладают способностью одновременно связывать два или более антигенов. Они способны обеспечивать перенаправленный опосредованный Т-клетками киллинг клеток, экспрессирующих мишеневые антигены.

Согласно одному варианту осуществления каждый третий домен первого и второго полипептидов содержит цистеиновый остаток, который служит для связывания полипептидов вместе с помощью дисульфидной связи. Третий домен одного или обоих полипептидов может дополнительно иметь последовательность домена CH2-CH3 так, что образование комплекса полипептидов диатела формирует Fc-домен, который способен связываться с Fc-рецептором клеток (таких как В-лимфоциты, дендритные клетки, натуральные клетки-киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и тучные клетки) (фиг. 2A-2B). Были описаны многие вариации таких молекул (см., например, публикации патентных документов Соединенных Штатов Америки № 2013-0295121; 2010-0174053 и 2009-0060910; публикации европейских патентов № EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 и PCT публикации № WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Такие несущие Fc DART могут содержать три полипептидных цепи. Первый полипептид такого диатела содержит три домена: (i) VL1-содержащий домен, (ii) VH2-содержащий домен, (iii) домен, который обеспечивает гетеродимеризацию и ковалентное связывание с первой полипептидной цепью диатела, и (iv) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Второй полипептид такого DART™ содержит (i) VL2-содержащий домен, (ii) VH1-содержащий домен и (iii) домен, который обеспечивает гетеродимеризацию и ковалентное связывание с первой полипептидной цепью диатела. Третий полипептид такого DART™ содержит последовательность CH2-CH3. Таким образом, первая и вторая полипептидные цепи такого DART™ связываются вместе с образованием сайта связывания VL1/VH1, который способен связываться с эпитопом, а также сайта связывания VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом. Первый и второй полипептиды связываются друг с другом посредством дисульфидной связи с использованием цистеиновых остатков в их соответствующих третьих доменах. Следует отметить, что первая и третья полипептидные цепи образуют комплекс друг с другом с образованием Fc-домена, который стабилизируется с помощью дисульфидной связи. Такие диатела характеризуются усиленной эффективностью. Такие несущие Fc DART™ могут иметь любую из двух ориентаций (табл. 1).

Таблица 1

Первая ориентация	3[ья] цепь	NH_2-CH2-CH3-COOH
	1[ая] цепь	NH_2-VL1-VH2-гетеродимер-промоторный домен-CH2-CH3-COOH
	2[ая] цепь	NH_2-VL2-VH1-гетеродимер-промоторный домен-COOH
Вторая ориентация	3[ья] цепь	NH_2-CH2-CH3-COOH
	1[ая] цепь	NH_2-CH2-CH3-VL1-VH2-гетеродимер-промоторный домен-COOH
	2[ая] цепь	NH_2-VL2-VH1-гетеродимер-промоторный домен-COOH

B. Предпочтительные биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение, в частности, относится к биспецифическим моновалентным диателам к CD19 x CD3, которые способны одновременно связываться с CD19 и CD3, а также к применениям таких

молекул в лечении гематологических злокачественных заболеваний. Хотя неоптимизированные биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 являются полностью функциональными, аналогично улучшениям, полученным в экспрессии генов посредством оптимизации кодонов (см., например, Grosjean, H. et al. (1982) "Preferential Codon Usage In Prokaryotic Genes: The Optimal Codon-Anticodon Interaction Energy And The Selective Codon Usage In Efficiently Expressed Genes" Gene 18(3):199-209), возможно дальнейшее усиление стабильности и/или функции биспецифических моновалентных диател к CD19 x CD3 посредством модификации или уточнения их последовательностей.

Предпочтительными биспецифическими моновалентными диателами к CD19 × CD3 в соответствии с настоящим изобретением являются биспецифические моновалентные Fc-диатела к CD19 x CD3, которые состоят из трех полипептидных цепей, связывающихся друг с другом с образованием одного сайта связывания, специфического по отношению к эпитопу CD19, и одного сайта связывания, специфического по отношению к эпитопу CD3 (см. фиг. 2A-2B), для обеспечения способности одновременного связывания с CD19 и с CD3. Таким образом, такие диатела связываются с "первым антигеном", которым может быть либо CD3, либо CD19, и со "вторым антигеном", которым является CD19, если первым эпитопом является CD3, и который является CD3, если первым эпитопом является CD19.

Предпочтительно, как показано на фиг. 2A, первая из таких трех полипептидных цепей будет содержать, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, антиген-связывающий домен вариабельного домена легкой цепи (VL) "первого" антигена (либо CD3, либо CD19), антиген-связывающий домен вариабельного домена тяжелой цепи (VH) второго антигена (CD19, если первым антигеном был CD3; CD3, если первым антигеном был CD19), гетеродимер-промоторный домен и C-конец. Промежуточный линкерный пептид (линкер 1) отделяет антиген-связывающий домен вариабельного домена легкой цепи от антиген-связывающего домена вариабельного домена тяжелой цепи. Предпочтительно, антиген-связывающий домен вариабельного домена тяжелой цепи соединяется с гетеродимер-промоторным доменом промежуточным линкерным пептидом (линкером 2). В случае биспецифического моновалентного Fc-диатела к CD19 x CD3 C-конец гетеродимер-промоторного домена соединяется с доменами CH2-CH3 Fc-области ("Fc-доменом") промежуточным линкерным пептидом (линкером 3) или промежуточным спейсер-линкерным пептидом (спейсер-линкером 3). Наиболее предпочтительно, первая из трех полипептидных цепей, таким образом, будет содержать в направлении от N-конца к C-концу $VL_{\text{первый антиген}}$ - линкер 1 - $VH_{\text{второй антиген}}$ - линкер 2 - гетеродимер-промоторный домен - спейсер-линкер 3 - Fc-домен.

В качестве альтернативы, как показано на фиг. 2B, первая из таких трех полипептидных цепей будет содержать, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, линкер 3, домены CH2-CH3 Fc-области ("Fc-домен"), промежуточный спейсерный пептид (линкер 4), имеющий, например, аминокислотную последовательность APSSS (SEQ ID NO: 47) или аминокислотную последовательность APSSSPME (SEQ ID NO: 48), антиген-связывающий домен вариабельного домена легкой цепи (VL) первого антигена (либо CD3, либо CD19), антиген-связывающий домен вариабельного домена тяжелой цепи (VH) второго антигена (CD19, если первым антигеном был CD3; CD3, если первым антигеном был CD19), гетеродимер-промоторный домен и C-конец. Промежуточный линкерный пептид (линкер 1) отделяет антиген-связывающий домен вариабельного домена легкой цепи от антиген-связывающего домена вариабельного домена тяжелой цепи. Предпочтительно, антиген-связывающий домен вариабельного домена тяжелой цепи соединяется с гетеродимер-промоторным доменом промежуточным линкерным пептидом (линкером 2). Наиболее предпочтительно, первая из трех полипептидных цепей, таким образом, будет содержать, в направлении от N-конца к C-концу, линкер 3 - Fc-домен - линкер 4 - $VL_{\text{первый антиген}}$ - линкер 1 - $VH_{\text{второй антиген}}$ - линкер 2 - гетеродимер-промоторный домен.

Предпочтительно, вторая из таких трех полипептидных цепей будет содержать, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, антиген-связывающий домен вариабельного домена легкой цепи (VL) второго антигена, антиген-связывающий домен вариабельного домена тяжелой цепи (VH) первого антигена, гетеродимер-промоторный домен и C-конец. Промежуточный линкерный пептид (линкер 1) отделяет антиген-связывающий домен вариабельного домена легкой цепи от антиген-связывающего домена вариабельного домена тяжелой цепи. Предпочтительно, антиген-связывающий домен вариабельного домена тяжелой цепи соединяется с гетеродимер-промоторным доменом промежуточным линкерным пептидом (линкер 2). Наиболее предпочтительно, вторая из трех полипептидных цепей, таким образом, будет содержать, в направлении от N-конца к C-концу, $VL_{\text{второй антиген}}$ - линкер 1 - $VH_{\text{первый антиген}}$ - линкер 2 - гетеродимер-промоторный домен.

Предпочтительно, третья из таких трех полипептидных цепей будет содержать линкерный пептид (линкер 3) и домены CH2-CH3 Fc-области ("Fc-домен").

Антиген-связывающий домен вариабельного домена легкой цепи первой полипептидной цепи взаимодействует с антиген-связывающим доменом вариабельного домена тяжелой цепи второй полипептидной цепи для образования функционального сайта связывания антигена, который является специфическим по отношению к первому антигену (т.е. либо CD19, либо CD3). Подобным образом, антиген-связывающий домен вариабельного домена легкой цепи второй полипептидной цепи взаимодействует с антиген-связывающим доменом вариабельного домена тяжелой цепи первой полипептидной цепи для образования второго функционального сайта связывания антигена, который является специфическим по

отношению ко второму антигену (т.е. либо CD3, либо CD19, в зависимости от идентичности первого антигена). Таким образом, выбор антиген-связывающего домена вариабельного домена легкой цепи и антиген-связывающего домена вариабельного домена тяжелой цепи первой и второй полипептидных цепей координируется так, что две полипептидных цепи совместно содержат антиген-связывающие домены вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей, способные связываться с CD19 и CD3.

1. Предпочтительные линкеры.

Наиболее предпочтительно, длину линкера 1, который отделяет такие домены VL и VH полипептидной цепи, выбирают таким образом, чтобы в значительной степени или полностью предотвратить связывание таких доменов VL и VH друг с другом. Таким образом, домены VL и VH первой полипептидной цепи не способны в значительной степени или полностью связываться друг с другом. Подобным образом, домены VL и VH второй полипептидной цепи не способны в значительной степени или полностью связываться друг с другом. Предпочтительный промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) имеет последовательность (SEQ ID NO: 1): GGGSGGGG.

Задача линкера 2 заключается в отделении домена VH полипептидной цепи от гетеродимер-промоторного домена этой полипептидной цепи. Любой из ряда линкеров может быть использован в качестве линкера 2. Предпочтительная последовательность такого линкера 2 предусматривает аминокислотную последовательность ASTKG (SEQ ID NO: 2), которая происходит из домена CH1 IgG, или GGCGGG (SEQ ID NO: 3), имеющую цистеиновый остаток, который может быть использован для ковалентного связывания первой и второй полипептидных цепей друг с другом с помощью дисульфидной связи. Поскольку линкер 2 ASTKG (SEQ ID NO: 2) не содержит такого цистеина, применение такого линкера 2 предпочтительно ассоциируется с применением содержащего цистеин гетеродимер-промоторного домена, такого как E-спираль SEQ ID NO: 12 или K-спираль SEQ ID NO: 13 (см. ниже).

Задача линкера 3 заключается в отделении гетеродимер-промоторного домена полипептидной цепи от Fc-домена этой полипептидной цепи. Любой из ряда линкеров может быть использован в качестве линкера 3. Предпочтительная последовательность такого линкера 3 предусматривает аминокислотную последовательность DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 4). Предпочтительная последовательность для спейсер-линкера 3 предусматривает аминокислотную последовательность GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 5).

2. Предпочтительные гетеродимер-промоторные домены.

Образование гетеродимеров первой и второй полипептидных цепей может управляться включением гетеродимер-промоторных доменов. Такие домены включают в себя GVEPKSC (SEQ ID NO: 6) или VEPKSC (SEQ ID NO: 7) в одной полипептидной цепи и GFNRGEC (SEQ ID NO: 8) или FNRGEC (SEQ ID NO: 9) в другой полипептидной цепи (US 2007/0004909).

Более предпочтительно, однако, гетеродимер-промоторные домены в соответствии с настоящим изобретением образуются из одного, двух, трех или четырех тандемно повторяющихся спиральных доменов противоположного заряда, которые содержат последовательность по меньшей мере шести, по меньшей мере семи или по меньшей мере восьми заряженных аминокислотных остатков (Apostolovic, B. et al. (2008) "pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil", Biomacromolecules 9:3173-3180; Arndt, K.M. et al. (2001) "Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain", J. Molec. Biol. 312:221-228; Amdt, K.M. et al. (2002) "Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils", Structure 10:1235-1248; Boucher, C. et al. (2010) "Protein Detection By Western Blot Via Coiled-Coil Interactions", Analytical Biochemistry 399:138-140; Cachia, P.J. et al. (2004) "Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy" J. Mol. Recognit. 17:540-557; De Crescenzo, G.D. et al. (2003) "Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding", Biochemistry 42:1754-1763; Fernandez-Rodriquez, J. et al. (2012) "Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag", Protein Science 21:511-519; Ghosh, T.S. et al. (2009) "End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures", Acta Crystallographica D65:1032-1041; Grigoryan, G. et al. (2008) "Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions", Curr. Opin. Struc. Biol. 18:477-483; Litowski, J.R. et al. (2002) "Designing Heterodimeric Two-Stranded α-Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And α-Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity", J. Biol. Chem. 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. et al. (2012) "The d'--d--d' Vertical Triad is Less Discriminating Than the a'--a--a' Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif", J. Amer. Chem. Soc. 134(5):2626-2633; Straussman, R. et al. (2007) "Kinking the Coiled Coil - Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface", J. Molec. Biol. 366:1232-1242; Tripet, B. et al. (2002) "Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance", J. Molec. Biol. 323:345-362; Woolfson, D.N. (2005) "The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies", Adv. Prot. Chem. 70:79-112; Zeng, Y. et al. (2008) "A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism", J. Gene Med. 10:355-367).

Такие повторяющиеся спиральные домены могут быть точными повторами или могут иметь замены. Например, гетеродимер-промоторный домен первой полипептидной цепи может содержать последовательность из восьми отрицательно заряженных аминокислотных остатков, а гетеродимер-промоторный домен второй полипептидной цепи может содержать последовательность из восьми положительно заряженных аминокислотных остатков (или vice versa). Не имеет значения, какая спираль предусматривается для первой или второй полипептидных цепей, при условии, что используется спираль противоположного заряда для другой полипептидной цепи. Однако предпочтительное биспецифическое моновалентное диатело к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением имеет первую полипептидную цепь с отрицательно заряженной спиралью. Положительно заряженной аминокислотой может быть лизин, аргинин, гистидин и т.д., и/или отрицательно заряженной аминокислотой может быть глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота и т.д. Положительно заряженной аминокислотой предпочтительно является лизин, и/или отрицательно заряженной аминокислотой предпочтительно является глутаминовая кислота. Возможно использование только одного гетеродимер-промоторного домена (поскольку такой домен будет ингибировать гомодимеризацию и тем самым обеспечивать гетеродимеризацию), однако, предпочтительно, чтобы и первая, и вторая полипептидные цепи диатела в соответствии с настоящим изобретением содержали гетеродимер-промоторные домены.

Согласно предпочтительному варианту осуществления один из гетеродимер-промоторных доменов будет содержать четыре тандемных "E-спиральных" домена (SEQ ID NO: 10: **E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K), глутаматные остатки которых будут образовывать отрицательный заряд при pH 7, тогда как другие гетеродимер-промоторные домены будут содержать четыре тандемных "K-спиральных" домена (SEQ ID NO: 11: **K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E), лизиновые остатки которых будут образовывать положительный заряд при pH 7. Присутствие таких заряженных доменов обеспечивает связь между первым и вторым полипептидами и, таким образом, содействует гетеродимеризации. Особенно предпочтительным является гетеродимер-промоторный домен, в котором один из четырех тандемных "E-спиральных" доменов SEQ ID NO: 10 был модифицирован с содержанием цистеинового остатка: **E**VAA**C**E**K**-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K (SEQ ID NO: 12). Подобным образом, особенно предпочтительным является гетеродимер-промоторный домен, в котором один из четырех тандемных "K-спиральных" доменов SEQ ID NO: 11 был модифицирован с содержанием цистеинового остатка: **K**VAA**C**K**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E (SEQ ID NO: 13).

3. Ковалентное связывание полипептидных цепей.

Биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением конструируют так, что их первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связываются друг с другом через один или несколько цистеиновых остатков, расположенных вдоль их длины. Такие цистеиновые остатки могут быть введены в промежуточный линкер, который отделяет домены VL и VH полипептидов. В качестве альтернативы, линкер 2 может содержать цистеиновый остаток. В качестве дополнения или в качестве альтернативы, линкер 3 может содержать цистеиновый остаток, как в SEQ ID NO: 4 или в SEQ ID NO: 5. Наиболее предпочтительно, один или несколько спиральных доменов гетеродимер-промоторного домена будут замещены с содержанием цистеинового остатка, как в SEQ ID NO: 12 или в SEQ ID NO: 13.

Согласно конкретным вариантам осуществления биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением могут дополнительно иметь альбумин-связывающий домен для продления периода полувыведения in vivo.

4. Предпочтительные Fc-домены.

Fc-домен биспецифических моновалентных Fc-диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением может быть либо полной Fc-областью (например, полной Fc-областью IgG), либо только фрагментом полной Fc-области. Хотя Fc-домен биспецифических моновалентных Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением может обладать способностью связываться с одним или несколькими Fc-рецепторами (например, FcγR), более предпочтительно, такой Fc-домен будет вызывать снижение связывания с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) или FcγRIIIB (CD16b) (относительно связывания, демонстрируемого Fc-областью дикого типа) или будет в значительной степени устранять способность такого Fc-домена связываться с таким рецептором(ами). Fc-домен биспецифических моновалентных Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением может включать в себя частично или полностью домен CH2 и/или частично или полностью домен CH3 полной Fc-области или может содержать вариантную CH2 и/или вариантную CH3 последовательность (которая может включать в себя, например, одну или несколько вставок и/или одну или несколько делеций в отношении доменов CH2 или CH3 полной Fc-области). Fc-домен биспецифических моновалентных Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением может содержать отличные от Fc полипептидные части, или может содержать части не встречающихся в природе полных Fc-областей, или может содержать не встречающиеся в природе ориентации доменов CH2 и/или CH3 (такие как, например, два домена CH2 или два домена CH3, или в направлении от N-конца к C-концу домен CH3, связанный с доменом CH2 и т.д.).

Согласно предпочтительному варианту осуществления каждая из первой и третьей полипептидных

цепей биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением содержит домены CH2-CH3, которые связываются вместе с образованием Fc-домена иммуноглобулина (IgG). Аминокислотной последовательностью домена CH2-CH3 человеческого IgG1 является (SEQ ID NO: 14):

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK.

Таким образом, оба домена CH2 и/или CH3 первой и третьей полипептидных цепей могут состоять из SEQ ID NO: 14 или ее варианта.

Особенно предпочтительно, чтобы домены CH2-CH3 первой и третьей полипептидных цепей биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением демонстрировали пониженное связывание (или практически отсутствие связывания) с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) или FcγRIIIB (CD16b) (относительно связывания, демонстрируемого Fc-областью дикого типа (SEQ ID NO: 14)). Fc-варианты и мутантные формы, способные опосредовать такое измененное связывание, хорошо известны в уровне техники и включают в себя аминокислотные замены в положениях 234 и 235, замену в положении 265 или замену в положении 297 (см., например, патент США № 5624821, включенный в настоящий документ посредством ссылки). Согласно предпочтительному варианту осуществления домен CH2-CH3 первой и/или третьей полипептидных цепей биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением включает в себя замену в положении 234 аланином и в 235 аланином.

Домены CH2 и/или CH3 первой и третьей полипептидных цепей не обязательно должны быть идентичными в последовательности и преимущественно являются модифицированными для обеспечения образования комплекса между двумя полипептидными цепями. Например, аминокислотная замена (предпочтительно замена аминокислотой, содержащей объемную боковую группу, образующую "выступ", например, триптофан) может быть введена в домен CH2 или CH3 так, что пространственное взаимодействие будет препятствовать взаимодействию с подобным образом мутированным доменом и будет обязывать мутированный домен составлять пару с доменом, в котором была сконструирована дополняющая или приспособительная мутация, т.е. "впадина" (например, замена глицином). Такой набор мутаций может быть сконструирован в любой паре полипептидов, содержащих молекулу биспецифического моновалентного Fc-диателa, и, кроме того, может быть сконструирован в любой части полипептидных цепей указанной пары. Способы конструирования белков для содействия гетеродимеризации, а не гомодимеризации, хорошо известны в уровне техники, в частности, в отношении конструирования подобных иммуноглобулину молекул, и охватываются настоящим документом (см., например, Ridgway et al. (1996) ""Knobs-Into-Holes" Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization", Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library", J. Mol. Biol. 270: 26-35, and Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis", J. Immunol. Methods 296:95-101; каждая из которых тем самым включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). Предпочтительно, "выступ" конструируют в доменах CH2-CH3 первой полипептидной цепи, а "впадину" конструируют в доменах CH2-CH3 третьей полипептидной цепи. Таким образом, "выступ" будет помогать в предотвращении гомодимеризации первой полипептидной через ее домены CH2 и/или CH3. Поскольку третья полипептидная цепь предпочтительно содержит замену в виде "впадины", она будет гетеродимеризоваться с первой полипептидной цепью, а также будет гомодимеризоваться сама с собой. Предпочтительный выступ создают путем модификации Fc-домена нативного IgG с содержанием модификации T366W. Предпочтительную "впадину" создают путем модификации Fc-домена нативного IgG с содержанием модификации T366S, L368A и Y407V. Для содействия очистке гомодимера третьей полипептидной цепи от конечного биспецифического моновалентного Fc-диателa, содержащего первую, вторую и третью полипептидные цепи, обеспечивают мутацию сайта связывания белка A доменов CH2 и CH3 третьей полипептидной цепи предпочтительно с помощью аминокислотной замены в положении 435 (H435R). Таким образом, гомодимер третьей полипептидной цепи не будет связываться с белком A, тогда как биспецифическое моновалентное Fc-диателo сохранит свою способность связывать белок A посредством сайта связывания белка A в первой полипептидной цепи.

Предпочтительная последовательность для доменов CH2 и CH3 первой полипептидной цепи биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением будет иметь несущую "выступ" последовательность (SEQ ID NO: 15):

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSL**W**C**L**VK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHN**H**YTQKS LSLSPGK.

Предпочтительная последовательность для доменов CH2 и CH3 третьей полипептидной цепи биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением будет иметь несущую "впадину" последовательность (SEQ ID NO: 16):

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSL**S**C**A**VK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFL**V**SKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHN**R**YTQKS LSLSPGK.

Следует отметить, что домены CH2-CH3 в SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 включают в себя замену в положении 234 аланином и в 235 аланином и, таким образом, образуют Fc-домен, демонстрирующий пониженное связывание (или практически отсутствие связывания) с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) или FcγRIIIB (CD16b) (относительно связывания, демонстрируемого Fc-областью дикого типа (SEQ ID NO: 14).

Предпочтительным является то, что первая полипептидная цепь будет иметь несущую "выступ" последовательность CH2-CH3, такую как последовательность SEQ ID NO: 15. Однако следует учитывать, что несущий "впадину" домен CH2-CH3 (например, SEQ ID NO: 16) может быть использован в первой полипептидной цепи, и в этом случае должен быть использован несущий "выступ" домен CH2-CH3 (например, SEQ ID NO: 15) в третьей полипептидной цепи.

5. Предпочтительные вариабельные домены к CD19.

Антиген-связывающий домен вариабельного домена легкой цепи любого антитела против CD19 может быть использован в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно, однако, такой домен VL_{CD19} будет иметь аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 17):

ENVLTQSPAT LSVTPGEKAT ITC**RASQSVS YMH**WYQQKPG QAPRLLIY**DA** **SNRAS**GVPSR FSGSGSGTDH TLTISSLEAE DAATYYC**FQG SVYPFT**FGQG TKLEIK,

при этом подчеркнутые последовательности представляют собой, соответственно, их CDR1, CDR2 и CDR3:

VL_{CD19} CDR1: RASQSVSYMH (SEQ ID NO: 18),

VL_{CD19} CDR2: DASNRAS (SEQ ID NO: 19),

VL_{CD19} CDR3: FQGSVYPFT (SEQ ID NO: 20).

Подобным образом, антиген-связывающий домен вариабельного домена тяжелой цепи любого антитела против CD19 может быть использован в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно, однако, такой домен VH_{CD19} будет иметь аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 21):

QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLS **TSGMGVG**WIR QPPGKALEWL A**HIWWDDDKR YNPALKS**RLT ISKDTSKNQV FLTMTNMDPV DTATYYCAR**M** **ELWSYYFDY**W GQGTTVTVSS,

при этом подчеркнутые последовательности представляют собой, соответственно, их CDR1, CDR2 и CDR3:

VH_{CD19} CDR1: TSGMGVG (SEQ ID NO: 22),

VH_{CD19} CDR2: HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 23),

VH_{CD19} CDR3: MELWSYYFDY (SEQ ID NO: 24).

6. Предпочтительные вариабельные домены к CD3.

Антиген-связывающий домен вариабельного домена легкой цепи любого антитела против CD3 может быть использован в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно, однако, такой домен VL_{CD3} будет иметь аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 25):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TC**RSSTGAVT TSNYAN**WVQQ KPGQAPRGLI G**GTNKRAP**WT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC **ALWYSNLWV**F GGGTKLTVLG,

при этом подчеркнутые последовательности представляют собой, соответственно, их CDR1, CDR2 и CDR3:

VL_{CD3} CDR1: RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 26),

VL_{CD3} CDR2: GTNKRAP (SEQ ID NO: 27),

VL_{CD3} CDR3: ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 28).

Подобным образом, антиген-связывающий домен вариабельного домена тяжелой цепи любого антитела против CD3 может быть использован в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтитель-

но, однако, такой домен VH_{CD3} будет иметь аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 29):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **TYAMN**WVRQA

PGKGLEWVG**R IRSKYNNYAT YYADSVKG**RF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT

EDTAVYYCVR **HGNFGNSYVS WFAY**WGQGTL VTVSS,

при этом подчеркнутые последовательности представляют собой, соответственно, их CDR1, CDR2 и CDR3:

VH_{CD3} CDR1:	TYAMN	(SEQ ID NO: 30),
VH_{CD3} CDR2:	RIRSKYNNYATYYADSVKG	(SEQ ID NO: 31),
VH_{CD3} CDR3:	HGNFGNSYVSWFAY	(SEQ ID NO: 32).

7. Необязательный альбумин-связывающий домен.

Как раскрывается в WO 2012/018687, для дальнейшего улучшения in vivo фармакокинетических свойств биспецифических моновалентных диател к CD19 x CD3 и биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением, такие диатела могут быть модифицированы с содержанием полипептидной части связывающего белка сыворотки крови на одном или нескольких концах диатела. Наиболее предпочтительно, такая полипептидная часть связывающего белка сыворотки крови будет размещена на С-конце диатела. Особенно предпочтительной полипептидной частью связывающего белка сыворотки крови для этой цели является альбумин-связывающий домен (ABD) из белка G стрептококка. Альбумин-связывающий домен 3 (ABD3) белка G Streptococcus штамма G148 является особенно предпочтительным.

Альбумин-связывающий домен 3 (ABD3) белка G Streptococcus штамма G148 состоит из 46 аминокислотных остатков, образующих стабильный трехспиральный пучок, и обладает широкой специфичностью связывания альбумина (Johansson, M.U. et al. (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules", J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). Альбумин является наиболее распространенным белком в плазме и имеет период полувыведения у людей 19 суток. Альбумин имеет несколько низкомолекулярных сайтов связывания, которые обеспечивают его нековалентную связь с другими белками и, тем самым, продлевают его периоды полувыведения из сыворотки крови.

Таким образом, вторая полипептидная цепь такого биспецифического моновалентного диатела к CD19 x CD3 или биспецифического моновалентного Fc-диатела с альбумин-связывающим доменом содержит линкер (линкер 4), который отделяет Е-спираль (или K-спираль) такой полипептидной цепи от альбумин-связывающего домена. Предпочтительной последовательностью для такого линкера 4 является SEQ ID NO: 33: GGGS. Предпочтительный альбумин-связывающий домен (ABD) имеет последовательность (SEQ ID NO: 34): LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP.

С. Иллюстративное биспецифическое моновалентное Fc-диатело к CD19 x CD3 "DART-A".

Настоящее изобретение относится к иллюстративному биспецифическому моновалентному Fc-диателу к CD19 x CD3, способному одновременно и специфически связываться с CD19 и с CD3. Такое иллюстративное диатело называют "DART-A". Выяснили, что диатела в соответствии с настоящим изобретением демонстрируют усиленную функциональную активность относительно других диател к CD19 x CD3.

Как указывается выше, биспецифические моновалентные Fc-диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением содержат три полипептидных цепи. Первая полипептидная цепь DART-A содержит, в направлении от N-конца к С-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способный связываться с CD19 (VL_{CD19}) (SEQ ID NO: 17), промежуточный линкерный пептид (линкер 1; GGGSGGGG (SEQ ID NO: 1)), домен VH моноклонального антитела, способный связываться с CD3 (VH_{CD3}) (SEQ ID NO: 29), промежуточный линкерный пептид (линкер 2; ASTKG (SEQ ID NO: 2)), гетеродимер-промоторный (Е-спиральный) домен (**E**VAA**C**E**C**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K (SEQ ID NO: 12)), промежуточный линкерный пептид (спейсер-линкер 3; GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 5)), полипептид, который содержит несущие "выступ" домены CH2 и CH3 (последовательность Fc-домена, SEQ ID NO: 15), и С-конец.

Таким образом, первая полипептидная цепь DART-A состоит из SEQ ID NO: 17 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 29 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 12 - SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 15.

Аминокислотная последовательность первого полипептида DART-A представляет собой (SEQ ID NO: 35):

ENVLTQSPATLSVTPGEKATITCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
ASGVPSRFSGSGSGTDHTLTISSLEAEDAATYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIKGGGSG
GGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRS
KYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV
SWFAYWGQGTLVTVSSASTKGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGDKT
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Предпочтительный полинуклеотид, кодирующий такой полипептид, представляет собой (SEQ ID NO: 36):

gagaatgtgctcacacagtcccctgcaactctgagcgtaactccaggggagaaggccaccatcacgtgtagagcctccca
gagtgtgagctacatgcactggtatcagcagaaacctggacaagctcccaggttgctgatctatgacgcgagcaaccgggctagtggc
gttccatcccggttttctggctcaggatctggcactgaccacaccctcaccatatccagccttgaagccgaagatgccgcaacctactac
tgctttcaggggagtgtgtatcccttcacattcggtcagggtacaaagctggagattaagggtggaggatccggcggcggaggcgag
gtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtccagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagcac
atacgctatgaattgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggttggaaggatcaggtccaagtacaacaattatgcaac
ctactatgccgactctgtgaagggtagattcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgaaaac
cgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaattcttacgtgtcttggtttgcttattggggacaggggacactg
gtgactgtgtcttccgcctccaccaagggcgaagtggccgcatgtgagaaagaggttgctgctttggagaaggaggtcgctgcacttg
aaaaggaggtcgcagccctggagaaaggcggcggggacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgcgggg
ggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgt
gagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggag
cagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtc
tccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcc
cccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtg
ggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagct
caccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaa
gagcctctccctgtctccgggtaaa.

Вторая полипептидная цепь DART-A содержит, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способный связываться с CD3 (VL_{CD3}) (SEQ ID NO: 25), промежуточный линкерный пептид (линкер 1; GGGSGGGG (SEQ ID NO: 1)), домен VH моноклонального антитела, способный связываться с CD19 (VH_{CD19}) (SEQ ID NO: 21), промежуточный линкерный пептид (линкер 2; ASTKG (SEQ ID NO: 2)), гетеродимер-промоторный (K-спиральный) домен (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 13) и C-конец.

Таким образом, второй полипептид DART-A состоит из SEQ ID NO: 25 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 21 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 13.

Аминокислотная последовательность второго полипептида DART-A представляет собой (SEQ ID NO: 37):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGG
TNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLT
VLGGGGSGGGGQVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGWIRQPPGKA
LEWLAHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTSKNQVFLTMTNMDPVDTATYYCARME
LWSYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE.

Предпочтительный полинуклеотид, кодирующий такой полипептид, имеет последовательность (SEQ ID NO: 38):

caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcggaactgtgaccctgacatgcagatccagcacagg

cgcagtgaccacatctaactacgccaattgggtgcagcagaagccaggacaggcaccaaggggcctgatcgggggtacaaacaaa

agggctccctggacccctgcacggttttctggaagtctgctgggcggaaaggccgctctgactattaccggggcacaggccgaggac

gaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtgggtgttcgggggtggcacaaaactgactgtgctgggaggggtggatc

cggcggaggtggacaggtgacactgagggaatctggtccagctctggtgaaacccactcagacgctcactctcacttgcacctttagt

gggttctcactgtccacatctggcatgggagtaggctggattcgacagccacctgggaaagccttggagtggcttgcccacatctggtg

ggatgacgacaagcggtataatcccgcactgaagagcagactgaccatcagcaaggatacatccaagaaccaggtgtttctgaccatg

accaacatggaccctgtcgatacagccacctactattgtgctcgcatggagttgtggtcctactacttcgactattggggacaaggcaca

accgtgactgtctcatccgcctccaccaagggcaaagtggccgcatgtaaggagaaagttgctgctttgaaagagaaggtcgccgca

cttaaggaaaaggtcgcagccctgaaagag.

Третья полипептидная цепь DART-A содержит, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, пептид (линкер 3; DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 4)), полипептид, который содержит несущие "впадину" домены CH2 и CH3 (последовательность Fc-домена, SEQ ID NO: 16), и C-конец.

Таким образом, третий полипептид DART-A состоит из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 16.

Аминокислотная последовательность третьего полипептида DART-A представляет собой (SEQ ID NO: 39):

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK

FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP

ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLS

PGK.

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует такой полипептид, имеет последовательность (SEQ ID NO: 40):

gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgcgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacc

caaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaa

ctggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagc

gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgag

aaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaacc

aggtcagcctgagttgcgcagtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaac

tacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctcgtcagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag

gggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccgctacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa.

D. Контрольные DART.

Для более убедительной демонстрации свойств биспецифических моновалентных диател к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением конструировали два контрольных DART. Первое контрольное DART ("контрольное DART 1") способно связываться с флуоресцеином и CD3. Второе контрольное DART ("контрольное DART 2") способно связываться с флуоресцеином и CD19.

Антитело против флуоресцеина, используемое для создания контрольного DART 1 и 2, представляло собой антитело 4-4-20 (Gruber, M. et al. (1994) "Efficient Tumor Cell Lysis Mediated By A Bispecific Single Chain Antibody Expressed In Escherichia coli", J. Immunol. 152(11):5368-5374; Bedzyk, W.D. et al. (1989) "Comparison Of Variable Region Primary Structures Within An Anti-Fluorescein Idiotype Family" J. Biol. Chem. 264(3):1565-1569), которое использовали в контрольных диателах. Аминокислотные последовательности вариабельных легких и вариабельных тяжелых доменов антитела против флуоресцеина 4-4-20 являются следующими: аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи антитела против флуоресцеина 4-4-20 (SEQ ID NO: 41)

DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS

ISC**RSSQSLV HSNGNTYLR**W YLQKPGQSPK VLIY**KVSNRF S**GVPDRFSGS

GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFC**SQSTHVP W**TFGGGTKLE IK;

аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антитела против флуоресцеина 4-4-20 (SEQ ID NO: 42)

EVKLDETGGG LVQPGRPMKL

SCVASGFTFS **DYWM**NWVRQS PEKGLEWVA**Q IRNKPYNYET YYSDSVKG**RF

TISRDDSKSS VYLQMNNLRV EDMGIYYCTG **SYYGMDY**WGQ GTSVTVSS.

1. Контрольное DART 1 (флуоресцеин x CD3).

Первая полипептидная цепь контрольного DART 1 содержит, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способный связываться с флуоресцеином (VL_{4-4-20}) (SEQ ID NO: 41), промежуточный линкерный пептид (линкер 1; GGGSGGGG (SEQ ID NO: 1)), домен VH моноклонального антитела, способный связываться с CD3 (VH_{CD3}) (SEQ ID NO: 29), промежуточный лин-

керный пептид (линкер 2; GGCGGG (SEQ ID NO: 3)), гетеродимер-промоторный (E-спиральный) домен (**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K (SEQ ID NO: 10)), промежуточный линкерный пептид (спейсер-линкер 3; GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 5)), полипептид, который содержит несущие "выступ" домены CH2 и CH3 (последовательность Fc-домена, SEQ ID NO: 15), и С-конец.

Таким образом, первая полипептидная цепь контрольного DART 1 состоит из SEQ ID NO: 41 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 29 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 10 - SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 15.

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи контрольного DART 1 представляет собой (SEQ ID NO: 43):

DVVMTQTPFSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLI

YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEI

KGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLE

WVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHG

NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALE

KGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK

FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP

ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS

PGK.

Вторая полипептидная цепь контрольного DART 1 содержит, в направлении от N-конца к С-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способный связываться с CD3 (VL_{CD3}) (SEQ ID NO: 25), промежуточный линкерный пептид (линкер 1; GGGSGGGG (SEQ ID NO: 1)), домен VH моноклонального антитела, способный связываться с флуоресцеином (VH_{Fluor}) (SEQ ID NO: 42), промежуточный линкерный пептид (линкер 2; GGCGGG (SEQ ID NO: 3)), гетеродимер-промоторный (K-спиральный) домен (**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E (SEQ ID NO: 11) и С-конец.

Таким образом, вторая полипептидная цепь контрольного DART 1 состоит из SEQ ID NO: 25 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 42 - SEQ ID N03 - SEQ ID NO: 11.

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи контрольного DART 1 представляет собой (SEQ ID NO: 44):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGG

TNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLT

VLGGGGSGGGGEVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKG

LEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGS

YYGMDYWGQGTSVTVSSASTKGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE.

Третья полипептидная цепь контрольного DART 1 содержит, в направлении от N-конца к С-концу, N-конец, пептид (линкер 3; DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 4)), полипептид, который содержит несущие "впадину" домены CH2 и CH3 (последовательность Fc-домена, SEQ ID NO: 16), и С-конец.

Таким образом, третья полипептидная цепь контрольного DART 1 состоит из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 16.

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи контрольного DART 1 представляет собой (SEQ ID NO: 39):

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK

FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP

ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLS

PGK.

2. Контрольное DART 2 (флуоресцеин x CD19).

Первая полипептидная цепь контрольного DART 2 содержит, в направлении от N-конца к С-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способный связываться с CD19 (VL_{CD19}) (SEQ ID NO: 17), промежуточный линкерный пептид (линкер 1; GGGSGGGG (SEQ ID NO: 1)), домен VH моноклонального антитела, способный связываться с флуоресцеином (VH_{Fluor}) (SEQ ID NO: 42), промежуточный линкерный пептид (линкер 2; GGCGGG (SEQ ID NO: 3)), гетеродимер-промоторный (E-спиральный) домен (**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K (SEQ ID NO: 10)), промежуточный линкерный пептид (спейсер-линкер 3; GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 5)), полипептид, который содержит несущие "выступ" домены CH2 и CH3 (последовательность Fc-домена, SEQ ID NO: 15), и С-конец.

Таким образом, первая полипептидная цепь контрольного DART 2 состоит из SEQ ID NO: 17 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 42 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 10 - SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 15.

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи контрольного DART 2 представляет собой (SEQ ID NO: 45):

ENVLTQSPATLSVTPGEKATITCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDASNR

ASGVPSRFSGSGSGTDHTLTISSLEAEDAATYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIKGGGSG

GGGEVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIR
NKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDY

WGQGTSVTVSSASTKGEVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGDKTHTCPPC

PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN

AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP

REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS

DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

Вторая полипептидная цепь контрольного DART 2 содержит, в направлении от N-конца к С-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способный связываться с флуоресцеином (VL_{Fluor}) (SEQ ID NO: 41), промежуточный линкерный пептид (линкер 1; GGGSGGGG (SEQ ID NO: 1)), домен VH моноклонального антитела, способный связываться с CD3 (VH_{CD3}) (SEQ ID NO: 29), промежуточный линкерный пептид (линкер 2; GGCGGG (SEQ ID NO: 3)), гетеродимер-промоторный (K-спиральный) домен (**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E (SEQ ID NO: 11) и С-конец.

Таким образом, вторая полипептидная цепь контрольного DART 2 состоит из SEQ ID NO: 41 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 29 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 11.

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи контрольного DART 2 представляет собой (SEQ ID NO: 46):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGG

TNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLT

VLGGGGSGGGGEVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKG

LEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGS

YYGMDYWGQGTSVTVSSASTKGKVAACKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE.

Третья полипептидная цепь контрольного DART 2 содержит, в направлении от N-конца к С-концу, N-конец, пептид (линкер 3; DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 4)), полипептид, который содержит несущие "впадину" домены CH2 и CH3 (последовательность Fc-домена, SEQ ID NO: 16), и С-конец.

Таким образом, третья полипептидная цепь контрольного DART 2 состоит из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 16.

Аминокислотная последовательность третьего полипептида контрольного DART 2 представляет собой (SEQ ID NO: 39):

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK

FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLS

PGK.

Е. Фармацевтические композиции.

Композиции в соответствии с настоящим изобретением включают в себя нефасованные композиции лекарственного средства, применимые в изготовлении фармацевтических композиций (например, неочищенных или нестерильных композиций) и фармацевтических композиций (т.е. композиций, которые являются приемлемыми для введения субъекту или больному), которые могут быть использованы в получении единичных дозированных форм. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество биспецифических моновалентных диател к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением или комбинацию таких средств и фармацевтически приемлемый носитель. Предпочтительно, композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат профилактически или терапевтически эффективное количество биспецифического моновалентного диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также охватывает фармацевтические композиции, содержащие биспецифическое моновалентное диатело к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением (и, в частности, биспецифическое моновалентное Fc-диатело к CD19 x CD3) и второе терапевтическое антитело (например, специфическое по отношению к опухоли моноклональное антитело), которое является специфическим по отношению к конкретному антигену злокачественной опухоли, и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно конкретному варианту осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или в другой общепризнанной фармакопее для использования на животных и, более конкретно, на людях. Термин "носитель" относится к разбавителю, адъюванту (например, адъюванту Фрейнда (полному и неполному), вспомогательному средству или среде, с которыми вводят терапевтическое средство. Такими фармацевтическими носителями могут быть стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе масла из нефти, животного, растительного или синтетического происхож-

дения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является предпочтительным носителем, если фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, особенно для инъекционных растворов. Приемлемые фармацевтические вспомогательные средства включают в себя крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, натрия стеарат, глицерина моностеарат, тальк, натрия хлорид, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция при необходимости также может содержать незначительные количества увлажняющих или эмульгирующих средств, или pH-буферных средств. Такие композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов замедленного высвобождения и т.п.

Как правило, ингредиенты композиций в соответствии с настоящим изобретением либо обеспечиваются отдельно, либо смешиваются вместе в единичной дозированной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закупоренном контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного средства. Если композиция подлежит введению путем инфузии, она может быть распределена в инфузионную бутылку, содержащую стерильные фармацевтической степени чистоты воду или солевой раствор. Если композицию вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекции или солевого раствора так, что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

Композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть составлены в нейтральной форме или в форме соли. Фармацевтически приемлемые соли включают в себя без ограничения соли, образованные анионами, такими как анионы, полученные из хлористоводородной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., а также соли, образованные катионами, такими как катионы, полученные из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, содержащим один или несколько контейнеров, заполненных биспецифическим моновалентным диателом к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением (и, в частности, биспецифическим моновалентным Fc-диателом к CD19 x CD3) отдельно или с таким фармацевтически приемлемым носителем. В качестве дополнения, одно или несколько других профилактических или терапевтических средств, применимых для лечения заболевания, также могут быть включены в фармацевтическую упаковку или набор. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, содержащим один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими из ингредиентов фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. Необязательно с таким контейнером(ами) может быть связано пояснение в форме, предписанной государственным органом, регулирующим изготовление, применение или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, при этом в пояснении отражается одобрение данным органом изготовления, применения или продажи для введения людям.

Настоящее изобретение относится к наборам, которые могут быть использованы в вышеупомянутых способах. Набор может содержать биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 и, более предпочтительно, биспецифическое моновалентное Fc-диатело к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением. Набор может дополнительно содержать одно или несколько других профилактических и/или терапевтических средств, применимых для лечения злокачественной опухоли, в одном или нескольких контейнерах; и/или набор может дополнительно содержать одно или несколько цитотоксических антител, которые связывают один или несколько антигенов злокачественной опухоли, ассоциированных со злокачественной опухолью. Согласно некоторым вариантам осуществления другим профилактическим или терапевтическим средством является химиотерапевтическое средство. Согласно другим вариантам осуществления профилактическим или терапевтическим средством является биологическое или гормональное терапевтическое средство.

F. Способы введения.

Композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть обеспечены для лечения, профилактики и облегчения одного или нескольких симптомов, ассоциирующихся с заболеванием, нарушением или инфекцией, путем введения субъекту эффективного количества белка слияния или конъюгированной молекулы в соответствии с настоящим изобретением или фармацевтической композиции, содержащей белок слияния или конъюгированную молекулу в соответствии с настоящим изобретением. В предпочтительном аспекте такие композиции являются в значительной степени очищенными (т.е. практически не содержат веществ, которые ограничивают их эффект или вызывают нежелательные побочные эффекты). Согласно конкретному варианту осуществления субъектом является животное, предпочтительно млекопитающее, такое как отличное от примата (например, бычьи, лошадиные, кошачьи, псовые, грызуны и т.д.) или примат (например, обезьяна, такая как яванский макак, человек и т.д.). Согласно предпочтительному варианту осуществления, субъектом является человек.

Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения композиций в соответствии с настоящим изобретением, например, инкапсулирование в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать антитело или белок слияния, опосредо-

ванный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System", J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструирование нуклеиновой кислоты как части ретровирусного или другого вектора и т.д.

Способы введения молекулы в соответствии с настоящим изобретением включают в себя без ограничения парентеральное введение (например, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и мукозальное (например, интраназальным и пероральным путями). Согласно конкретному варианту осуществления биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 или биспецифические моновалентные Fc-диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции могут быть введены каким-либо традиционным путем, например, инфузией или болюсной инъекцией, абсорбцией через эпителиальные или слизисто-кожные оболочки (например, через слизистую полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и слизистую оболочку кишки и т.д.), а также могут быть введены вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или локальным. Кроме того, также может быть использовано легочное введение, например, путем применения ингалятора или небулайзера и состава с аэрозольным средством. См., например, патенты США № 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 и 4880078, а также PCT публикации № WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Настоящее изобретение также относится к таким биспецифическим моновалентным диателам к CD19 x CD3 (и, в частности, к биспецифическому моновалентному Fc-диателу к CD19 x CD3) в соответствии с настоящим изобретением, которые упакованы в герметично закупоренный контейнер, такой как ампула или саше, с указанием количества молекулы. Согласно одному варианту осуществления биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением поставляют в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закупоренном контейнере и могут быть восстановлены, например, водой или солевым раствором до концентрации, подходящей для введения субъекту. Предпочтительно, биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением поставляют в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка в герметично закупоренном контейнере при единичной дозировке по меньшей мере 5 мкг, более предпочтительно по меньшей мере 10 мкг, по меньшей мере 15 мкг, по меньшей мере 25 мкг, по меньшей мере 50 мкг, по меньшей мере 100 мкг или по меньшей мере 200 мкг.

Лиофилизированные биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 или биспецифические моновалентные Fc-диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением следует хранить при 2-8°C в их оригинальном контейнере, и молекулы следует вводить в пределах 12 ч, предпочтительно в пределах 6 ч, в пределах 5 ч, в пределах 3 ч или в пределах 1 ч после восстановления. Согласно альтернативному варианту осуществления биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением поставляют в жидкой форме в герметично закупоренном контейнере с указанием количества и концентрации молекулы, белка слияния или конъюгированной молекулы. Предпочтительно, жидкую форму биспецифических моновалентных диател к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением поставляют в герметично закупоренном контейнере, в котором молекулы присутствуют в концентрации по меньшей мере 1 мкг/мл, более предпочтительно по меньшей мере 2,5 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл или по меньшей мере 100 мкг/мл.

Количество композиции в соответствии с настоящим изобретением, которое будет эффективным в лечении, предупреждении или облегчении одного или нескольких симптомов, ассоциируемых с нарушением, может быть определено стандартными клиническими методиками. Точная доза, используемая в составе, будет также зависеть от пути введения и тяжести состояния, а также будет определяться в соответствии с решением практикующего врача и обстоятельствами каждого больного. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных с помощью тест-систем in vitro или животных моделей.

Для биспецифических моновалентных диател к CD19 x CD3 или биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3, охватываемых настоящим изобретением, дозировку, вводимую больному, предпочтительно определяют на основании массы тела (кг) субъекта-реципиента. Вводимая дозировка, как правило, составляет от по меньшей мере приблизительно 0,3 нг/кг в сутки до приблизительно 0,9 нг/кг в сутки, от по меньшей мере приблизительно 1 нг/кг в сутки до приблизительно 3 нг/кг в сутки, от по меньшей мере приблизительно 3 нг/кг в сутки до приблизительно 9 нг/кг в сутки, от по меньшей мере приблизительно 10 нг/кг в сутки до приблизительно 30 нг/кг в сутки, от по меньшей мере приблизительно 30 нг/кг в сутки до приблизительно 90 нг/кг в сутки, от по меньшей мере приблизительно 100 нг/кг в сутки до приблизительно 300 нг/кг в сутки, от по меньшей мере приблизительно 200 нг/кг в сутки до приблизительно 600 нг/кг в сутки, от по меньшей мере приблизительно 300 нг/кг в сутки до приблизительно 900 нг/кг в сутки, от по меньшей мере приблизительно 400 нг/кг в сутки до приблизительно 800 нг/кг в сутки, от по меньшей мере приблизительно 500 нг/кг в сутки до приблизительно 1000 нг/кг в сутки, от по меньшей мере приблизительно 600 нг/кг в сутки до приблизительно 1000 нг/кг в сутки, от по

меньшей мере приблизительно 700 нг/кг в сутки до приблизительно 1000 нг/кг в сутки, от по меньшей мере приблизительно 800 нг/кг в сутки до приблизительно 1000 нг/кг в сутки, от по меньшей мере приблизительно 900 нг/кг в сутки до приблизительно 1000 нг/кг в сутки или по меньшей мере приблизительно 1000 нг/кг в сутки.

Согласно другому варианту осуществления больному осуществляют введение согласно режиму лечения, предусматривающему одну или несколько доз такого профилактически или терапевтически эффективного количества биспецифических моновалентных диател к CD19 x CD3 (и, в частности, биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3), охватываемых настоящим изобретением, при этом режим лечения осуществляют в течение 2, 3, 4, 5, 6 или 7 суток. Согласно некоторым вариантам осуществления режим лечения предусматривает периодическое введение доз профилактически или терапевтически эффективного количества биспецифических моновалентных диател к CD19 x CD3, охватываемых настоящим изобретением (например, введение дозы в день 1, день 2, день 3 и день 4 данной недели и отсутствие введения доз профилактически или терапевтически эффективного количества биспецифических моновалентных диател к CD19 x CD3 (и, в частности, биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3), охватываемых настоящим изобретением, в день 5, день 6 и день 7 одной и той же недели). Как правило, осуществляют 1, 2, 3, 4, 5 или больше курсов лечения. Каждый курс может предусматривать одинаковый режим или отличный режим.

Согласно другому варианту осуществления вводимую дозу повышают в течение первой четверти, первой половины или первых двух третьих или трех четвертей режима(ов) (например, на протяжении первого, второго или третьего режимов лечения, предусматривающего 4 курса) до достижения суточного профилактически или терапевтически эффективного количества биспецифических моновалентных диател к CD19 x CD3 (и, в частности, биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3), охватываемых настоящим изобретением.

В табл. 2 представлены 5 примеров различных режимов введения дозы, описанных выше для типичного курса лечения.

Таблица 2

Режим	День	Дозировка диатела (нг диатела на кг массы субъекта в сутки)				
1	1, 2, 3, 4	100	100	100	100	100
	5, 6, 7	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
2	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
3	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
4	1, 2, 3, 4	300	500	700	900	1,000
	5, 6, 7	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует

Дозировка и частота введения биспецифических моновалентных диател к CD19 x CD3 или биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением могут быть снижены или изменены путем усиления тканевого поглощения и проницаемости биспецифических моновалентных диател к CD19 x CD3 с помощью модификаций, таких как, например, липидизация.

Дозировка биспецифических моновалентных диател к CD19 x CD3 или биспецифических моновалентных Fc-диател к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением, вводимая больному, может быть вычислена для применения в виде монотерапии. В качестве альтернативы, биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 или биспецифические моновалентные Fc-диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением используют в комбинации с другими терапевтическими композициями, и дозировка, вводимая больному, ниже, чем при использовании указанных молекул в виде монотерапии.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть введены локально на участке, нуждающемся в лечении; это может быть достигнуто, например, без ограничения локальной инфузией, инъекцией или посредством имплантата, при этом указанный имплантат представляет собой пористый, непористый или желатинообразный материал, в том числе мембраны, такие как эластические мембраны или волокна. Предпочтительно, при введении молекулы в соответствии с настоящим изобретением следует соблюдать осторожность при использовании материалов, которые молекула не абсорбирует.

Композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть доставлены в везикуле, в частности, в липосоме (см. Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533); Treat et al, in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, p. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., p. 317-327).

Композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть доставлены в системе контролированного высвобождения или замедленного высвобождения. Любая методика, известная специалисту

в данной области, может быть использована для получения составов замедленного высвобождения, содержащих одно или несколько биспецифических моновалентных диател к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением. См., например, патент США № 4526938, PCT публикацию WO 91/05548; PCT публикацию WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; and Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Согласно одному варианту осуществления в системе контролированного высвобождения может быть использован насос (см. Langer, supra; Sefton, (1987) "Implantable Pumps", CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis", Surgery 88:507-516; and Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery", N. Engl. J. Med. 321:574-579). Согласно другому варианту осуществления могут быть использованы полимерные материалы для достижения контролированного высвобождения молекул (см., например, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate", Science 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization", Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits", J. Neurosurg. 7(1):105-112); патент США № 5679377; патент США № 5916597; патент США № 5912015; патент США № 5989463; патент США № 5128326; PCT публикацию № WO 99/15154 и PCT публикацию № WO 99/20253). Примеры полимеров, используемых в составах замедленного высвобождения, включают в себя без ограничения поли(2-гидроксиэтилметакрилат), поли(метилметакрилат), поли(акриловую кислоту), сополимер этилена и винилацетата, поли(метакриловую кислоту), полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли(N-винилпирролидон), поли(виниловый спирт), полиакриламид, поли(этиленгликоль), полилактиды (PLA), сополимер лактида и гликолидов (PLGA) и сложные полиортоэфиры. Система контролированного высвобождения может быть помещена вблизи от терапевтической мишени (например, в легкие), что, таким образом, требует только части системной дозы (см., например, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, p. 115-138 (1984)). Полимерные композиции, применимые в качестве имплантатов контролированного высвобождения, могут быть использованы согласно Dunn et al. (см. патент США № 5945155). Этот конкретный способ основан на терапевтическом эффекте in situ контролированного высвобождения биоактивного материала из полимерной системы. Имплантацию, как правило, можно осуществлять в любое место в организме больного при необходимости терапевтического лечения. Можно использовать неполимерную систему непрерывной доставки, при которой используют неполимерный имплантат в организме субъекта в качестве системы доставки лекарственного средства. После имплантации в организм органический растворитель имплантата будет рассеиваться, диспергироваться или выноситься из композиции в окружающую тканевую жидкость, а неполимерный материал будет постепенно коагулироваться или осаждаться с образованием твердой микропористой матрицы (см. патент США № 5888533).

Системы контролированного высвобождения обсуждаются в обзоре Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533). Любая методика, известная специалисту в данной области, может быть использована для получения составов замедленного высвобождения, содержащих одно или несколько терапевтических средств в соответствии с настоящим изобретением. См., например, патент США № 4526938; публикации международных заявок № WO 91/05548 и WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotheraphy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; and Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Если композицией в соответствии с настоящим изобретением является нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифическое моновалентное диателo к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением, то нуклеиновая кислота может быть введена in vivo для обеспечения экспрессии кодируемого ею биспецифического моновалентного диатела к CD19 x CD3 или биспецифического моновалентного Fc-диатела к CD19 x CD3 с помощью конструирования ее в виде части подходящего вектора экспрессии нуклеиновой кислоты и введения его таким образом, чтобы он стал внутриклеточным, например, путем использования ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286), или путем непосредственной инъ-

екции, или путем применения бомбардировки микрочастицами (например, генной пушкой, Biolistic, Dupont), или путем покрытия липидами, или с помощью рецепторов клеточной поверхности или трансфицирующих средств, или путем введения его в связь с подобным гомеобоксу пептидом, который, как известно, входит в ядро (см., например, Joliot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868), и т.д. В качестве альтернативы, нуклеиновая кислота может быть введена внутриклеточно и включена в ДНК клетки-хозяина для экспрессии путем гомологичной рекомбинации.

Лечение субъекта терапевтически или профилактически эффективным количеством биспецифического моновалентного диатела к CD19 x CD3 (и, в частности, биспецифического моновалентного Fc-диатела к CD19 x CD3) в соответствии с настоящим изобретением может предусматривать лечение однократной дозой или, предпочтительно, может предусматривать лечение серией доз. Согласно предпочтительному примеру субъекта лечат таким диателом один раз в неделю в течение от приблизительно 1 до 10 недель, предпочтительно от 2 до 8 недель, более предпочтительно, от приблизительно 3 до 7 недель и, еще более предпочтительно, в течение приблизительно 4, 5 или 6 недель. Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть введены один раз в сутки, два раза в сутки или три раза в сутки. В качестве альтернативы, фармацевтические композиции могут быть введены один раз в неделю, два раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз в месяц, один раз каждые шесть недель, один раз каждые два месяца, два раза в год или один раз в год. Также будет понятно, что эффективная дозировка молекул, используемых для лечения, может повышаться или снижаться на протяжении курса конкретного лечения.

G. Применения композиций в соответствии с настоящим изобретением.

Биспецифические моновалентные диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением (и, в частности, биспецифические моновалентные Fc-диатела к CD19 x CD3 в соответствии с настоящим изобретением) обладают способностью лечить любое заболевание или состояние, ассоциируемое с экспрессией CD19 или характеризуемое таковой. Таким образом, без ограничения такие молекулы могут быть использованы в диагностике или лечении острого миелоидного лейкоза (AML), хронического миелогенного лейкоза (CML), в том числе бластного криза CML и онкогена Абельсона, ассоциирующегося с CML (транслокация Bcr-ABL), миелодиспластического синдрома (MDS), острого В-клеточного лимфобластного лейкоза (B-ALL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), в том числе синдрома Рихтера или трансформации Рихтера при CLL, волосатоклеточного лейкоза (HCL), новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток (BPDCN), неходжкинских лимфом (NHL), в том числе лейкоза из клеток мантийной зоны (MCL) и мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL), лимфомы Ходжкина, системного мастоцитоза и лимфомы Беркитта; аутоиммунной волчанки (SLE), аллергии, астмы и ревматоидного артрита. Биспецифические моновалентные диатела в соответствии с настоящим изобретением, в качестве дополнения, могут быть использованы в изготовлении медицинских средств для лечения описываемых выше состояний.

Примеры

Описываемое в целом настоящее изобретение будет легче понять с помощью ссылки на следующие примеры, которые представлены с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения, если не указано иное.

Пример 1.

Количественное определение экспрессии CD19 на клеточной поверхности.

Для идентификации приемлемых мишеневых клеточных линий при оценивании биологической активности биспецифических диател к CD19 x CD3 сначала подтверждали уровень экспрессии CD19 на клеточной поверхности с использованием количественного FACS (QFACS) на панели клеточных линий В-клеточной лимфомы/лейкоза человека, в том числе Nalm-6 (острого лимфобластного лейкоза), Raji (лимфомы Беркитта), Daudi (лимфомы Беркитта), HBL-2 (лимфомы из клеток мантийной зоны), MEC-1 (хронического лимфоцитарного лейкоза) и Jeko-1 (лимфомы из клеток мантийной зоны), MOLM-13 (клеточной линии острого миелоидного лейкоза), JIMT-1 (злокачественной опухоли молочной железы) и Colo205 (злокачественной опухоли толстой кишки). Абсолютное число сайтов связывания CD19 антитела на поверхности вычисляли с использованием набора QFACS. Как показано в табл. 3, абсолютное число сайтов связывания CD19 в клеточных линиях выстраивалось в следующем порядке Raji (высокое) > Nalm-6 (среднее) > Daudi (среднее) > HBL2 (среднее) > MEC-1 (низкое) > Jeko-1 (низкое). Как и ожидалось, экспрессия CD19 в MOLM-3, JIMT-1 и Colo205 CD19 отсутствовала, что согласуется с тем, что CD19 является специфическим В-клеточным антигеном.

Таблица 3

Мишеневая клеточная линия	Экспрессия CD19 на поверхности (сайты связывания антитела)
Raji	670322
Nalm-6	442730
Daudi	369860
HBL-2	334725
MEC-1	177025
Jeko-1	124396

Пример 2.

Аффинности связывания.

Для количественного определения степени связывания биспецифического моновалентного диатела против CD19 x CD3 и CD3 человека или яванского макака выполняли анализы BIACORE™ с использованием иллюстративного биспецифического моновалентного Fc-диатела против CD19 x CD3, DART-A. При анализах BIACORE™ измеряли скорость диссоциации kd. Аффинность связывания (KD) между антителом и его мишенью является функцией констант скорости реакции ассоциации (скорости ассоциации ka) и диссоциации (скорости диссоциации kd) согласно формуле: KD=[kd]/[ka]. В анализе BIACORE™ применяли поверхностный плазмонный резонанс для непосредственного измерения этих кинетических параметров.

Результаты связывания DART-A (0-100 нМ) с растворимыми CD3 и CD19 человека или яванского макака анализировали с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (BIAcore), как показано в табл. 4.

Аффинность связывания DART-A является подобной в отношении CD3 человека или яванского макака (KD=21,2 и 21,9 нМ соответственно). Однако DART-A характеризуется аффинностью в отношении CD19 яванского макака, которая в приблизительно 10 раз ниже таковой в отношении CD19 человека (KD=20,3 и 2,0 нМ соответственно) из-за повышенной константы скорости диссоциации (kd) в отношении CD19 яванского макака. Яванский макак остается подходящим видом для токсикологических оцениваний, хотя следует учитывать разницу в аффинности связывания CD19.

Таблица 4

Антигены	ka (± SD) (M-1s-1)	kd (± SD) (s-1)	KD (± SD) (nM)
CD3ε/δ человека	$2,2 \times 10^5$	$4,5 (\pm 0,1) \times 10^{-3}$	21,2 (± 1,7)
CD3ε/δ яванского макака	$2,0 (\pm 0,1) \times 10^5$	$4,3 (\pm 0,2) \times 10^{-3}$	21,9 (± 1,2)
CD19-His человека	$2,8 (\pm 0,3) \times 10^5$	$5,6 (\pm 0,6) \times 10^{-4}$	2,0 (± 0,2)
CD19-His яванского макака	$2,4 (\pm 0,1) \times 10^5$	$4,7 (\pm 1,1) \times 10^{-3}$	20,3 (± 1,3)

Пример 3.

Характеристики клеточного связывания.

Связывание DART-A с лейкоцитами крови (очищенными от цельной крови) мыши, крысы, кролика, яванского макака и человека оценивали in vitro с помощью проточной цитометрии. Лейкоциты окрашивали с помощью DART-A, а также контрольного DART 1 и контрольного DART 2 при концентрациях 25 или 100 нМ в течение приблизительно 1 ч. Контрольное DART 2 содержит тот же компонент связывания CD19, что и DART-A, тогда как контрольное DART 1 содержит тот же компонент связывания CD3, что и DART-A. После инкубации выявляли белки DART, связанные с лейкоцитами с помощью mAb против E-спирали/K-спирали (EK), которое распознает область гетеродимеризации EK спирали белков DART. Не наблюдали связывание DART-A у лейкоцитов крови мыши, крысы или кролика. Подобным образом, ни одно контрольное диатело DART не демонстрировало какое-либо связывание с лейкоцитами мыши, крысы или кролика. Как и ожидали, обе концентрации тестируемого DART-A показывали специфическое связывание с лейкоцитами как человека, так и яванского макака.

Бифункциональный анализ ELISA использовали для демонстрации одновременного взаимодействия обоих мишеневых антигенов с DART-A. Планшеты для ELISA покрывали растворимым гетеродимером CD3ε/δ человека и инкубировали при 4°C в течение ночи, а затем блокировали с помощью BSA. Добавляли различные концентрации DART-A, а затем добавляли растворимый человеческий CD19-биотин. Планшеты промывали и выявляли иммунный комплекс с хемолюминесцентным субстратом, конъюгированным со стрептавидином. Как показано на фиг. 3, DART-A способно одновременно связываться как с CD19, так и с CD3.

Далее оценивали биспецифическое связывание DART-A в лейкоцитах крови (очищенных от цельной крови) как яванского макака, так и человека с помощью проточной цитометрии. Лейкоциты окраши-

вали с помощью DART-A, контрольного DART 1 или контрольного DART 2 при концентрациях, варьирующих от 0,005 до 80 нМ в течение приблизительно 1 ч. После инкубации выявляли связывание с лейкоцитами с использованием биотинилированного mAb против E-спирали/K-спирали (EK), которое распознает область гетеродимеризации EK спирали белка DART и стрептавидин-PE. Поскольку DART-A связывается с CD3, использовали комбинацию CD4 и CD8 для определения популяции Т-клеток. Подобным образом, CD20 использовали в качестве маркера В-клеток вместо CD19. Поэтому, в данном исследовании гейтированные как CD4+ и CD8+ события представляют популяцию Т-клеток, а гейтированные как CD20+ события представляют популяцию В-клеток. DART-A демонстрировало биспецифическое связывание с В-клетками и Т-клетками как человека, так и яванского макака. Напротив, контрольные диатела DART показывали только моноспецифическое связывание с В-клетками (контрольное DART 2) или Т-клетками (контрольное DART 1) в соответствии с их соответствующей специфичностью связывания. Титрационные кривые связывания диател DART-A и контрольного DART в отношении В- и Т-клеток человека и яванского макака представлены на фиг. 4A-4B и фиг. 5A-5B.

Пример 4.

Опосредованный DART-A перенаправленный киллинг мишеневых опухолевых клеток с использованием человеческих Т-клеток.

Способность DART-A опосредовать перенаправленный киллинг мишеневых клеток оценивали на 3 мишеневых клеточных линиях В-клеточной лимфомы Raji/GF (лимфомы Беркитта), HBL-2 (лимфомы из клеток мантийной зоны) и Jeko-1 (лимфомы из клеток мантийной зоны), демонстрирующих диапазон экспрессии CD19, с использованием очищенных человеческих первичных Т-клеток в качестве эффекторных клеток. Клетки Raji/GF демонстрировали самые высокие уровни экспрессии CD19, за которыми шли средние уровни экспрессии CD19 в клетках HBL-2 и более низкие уровни экспрессии CD19 в клетках Jeko-1. Киллинг мишеневых опухолевых клеток измеряли с использованием анализа высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH), при котором количественно измеряли ферментативную активность LDH, высвобожденной из клеток в результате смерти клеток, или с использованием анализа люциферазы, при котором относительная световая единица (RLU) люциферазы является показателем для определения относительной жизнеспособности мишеневых клеток Raji/GF, которые были сконструированы для экспрессии репортерных генов как зеленого флуоресцентного белка (GFP), так и люциферазы.

DART-A демонстрировало мощный перенаправленный клеточный киллинг на всех 3 клеточных линиях при использовании очищенных Т-клеток от нескольких независимых человеческих доноров при отношении эффектора к мишеневым клеткам (E:T) 10:1 (фиг. 6A-6C). Средняя эффективная концентрация при значениях 50% максимальной активности (EC_{50}) составляла $1{,}05\times10^{-1}$ пМ для клеток HBL-2, $3{,}07\times10^{-1}$ пМ для клеток Raji/GF и $1{,}46\times10^{-1}$ пМ для клеток Jeko-1 (табл. 5). Контрольное DART 1 не опосредовало Т-клеточный перенаправленный киллинг мишеневых клеток. Что наиболее важно, не наблюдали активность клеточного киллинга в клеточных линиях (Molm-13 и Colo205), которые не экспрессируют CD19 (фиг. 6D-6F).

Таблица 5

Краткое описание значений EC_{50} от типичного опосредованного DART-A перенаправленного киллинга мишеневых клеток Raji/GF при варьирующих отношениях E:T-клетки

	E:T = 10:1		E:T = 5:1		E:T = 2,5:1	
Цитотоксичность	EC_{50} (пМ)	Emax (%)	EC_{50} (пМ)	Emax (%)	EC_{50} (пМ)	Emax (%)
24 часа	0,14	63	0,67	24	нет данных	4
48 часов	0,0441	73	0,38	48	1,08	11

Для оценивания активности DART-A в присутствии более низкого числа эффекторных клеток тестировали перенаправленный клеточный киллинг при более низких отношениях E:T-клетки 5:1, 2,5:1 и 1:1 на клетках Raji/GF после инкубации с DART-A в течение 24-96 ч. Цитотоксическая активность, наблюдаемая при отношении 5:1, составляла приблизительно половину максимальной активности, наблюдаемой при отношении 10:1; более низкую специфическую активность также наблюдали с отношением E:T-клетки 2,5:1 в моменты времени как 24, так и 48 ч (фиг. 7A-7D и табл. 5). После инкубации в течение 72 или 96 ч цитотоксичность в отношении клеток Raji/GF в значительной степени повышалась при отношениях 2,5:1 и 1:1 (см. фиг. 8A-8D и табл. 6). Следует отметить, что эффективный клеточный лизис при более низких отношениях E:T-клетки усиливался в клетках Raji/GF в зависимости от времени, что указывало на серийный киллинг мишеневых клеток активированными DART-A Т-клетками. Кинетические показатели подтверждают, что время является ограничивающим фактором при низком числе Т-клеток для эффективного устранения большего количества мишеневых клеток. В заключение, данные нескольких экспериментов с использованием человеческих Т-клеток от разных доноров показывают, что активность опосредованного DART-A перенаправленного клеточного киллинга зависит как от отношения E:T-клетки, так и от времени, в частности, при более низких отношениях E:T-клетки.

Таблица 6

Краткое описание значений EC_{50} от типичного опосредованного DART-A перенаправленного киллинга мишеневых клеток Raji/GF при более низких отношениях E:T-клетки

	E:T = 2,5:1		E:T = 1:1	
Цитотоксичность	EC_{50} (пМ)	Emax (%)	EC_{50} (пМ)	Emax (%)
72 часа	1,54	64	2,79	33
96 часов	0,422	87	0,440	56

Пример 5.

Опосредованное DART-A истощение аутологичных B-клеток в PBMC человека и яванского макака.

Поскольку нормальные B-клетки экспрессируют CD19, и поскольку DART-A, как было показано, перекрестно реагируют с CD19 и CD3 яванского макака (пример 2, фиг. 4A-4B и фиг. 5A-5B), исследовали опосредованную DART-A цитотоксичность на мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) как человека, так и яванского макака. Наблюдали зависимое от дозы истощение CD20+ B-клеток в PBMC как человека, так и яванского макака, после лечения с помощью DART-A (фиг. 9A-9B). Как и ожидали, не наблюдали истощение B-клеток после лечения с помощью контрольного DART 1.

Для дальнейшего подтверждения активности DART-A в отношении PBMC использовали несколько независимых доноров PBMC человека или яванского макака с варьирующими отношением T-клеток (эффекторов) к B-клеткам (мишеням) E:T-клетки для оценивания эффективности. В кратком описании (табл. 7) значения EC_{50} для истощения B-клеток человека находились в диапазоне от 1,84 до 6,27 пМ; тогда как значения EC_{50} для истощения B-клеток яванского макака составляли от 106,8 до 859,1 пМ. Эффективность DART-A в отношении истощения аутологичных B-клеток человека оказалась выше, чем в отношении истощения B-клеток яванского макака (в среднем приблизительно в 100 раз выше; диапазон 19-312 раз). Однако следует отметить, что отношение E:T-клетки в отношении PBMC яванского макака (в среднем приблизительно 4:1) было ниже такового в отношении PBMC человека (в среднем приблизительно 8:1), что, вероятно, способствовало большей разнице в значениях EC_{50}, с учетом того факта, что активность опосредованного DART-A перенаправленного киллинга зависит от отношения E:T-клетки. Потенциальные различия в уровнях экспрессии CD19 между B-клетками человека и яванского макака могут представлять другой вариабельный фактор, способствующий очевидной разнице в эффективности.

Таблица 7

Краткое описание значений EC_{50} для истощения аутологичных B-клеток после обработки PBMC человека или яванского макака с помощью DART-A

	Значения EC_{50} (пМ)			Значения EC_{50} (пМ)	
	DART-A	Контрольное DART		**DART-A**	Контрольное DART
Человек 5 (E:T= 8:1)	6,27	Отсутствие активности	Яванский макак 5 (E:T= 3:1)	166,2	Отсутствие активности
Человек 6 (E:T= 8:1)	2,75	Отсутствие активности	Яванский макак 6 (E:T= 2:1)	859,1	Отсутствие активности
Человек 7 (E:T= 5:1)	5,52	Отсутствие активности	Яванский макак 7 (E:T= 3:1)	106,8	Отсутствие активности
Человек 8 (E:T= 9:1)	1,84	Отсутствие активности	Яванский макак 8 (E:T= 7:1)	239,1	Отсутствие активности
Среднее	4,20	Не применимо	Среднее	342,8	Не применимо

Важно отметить, что опосредованная DART-A эффективная цитотоксичность против мишеневых клеток Raji/GF при использовании PBMC яванского макака в качестве эффекторных клеток с EC_{50} $1{,}30\times10^{-2}$ пМ (фиг. 10) была подобна наблюдаемой при использовании человеческих T-клеток в качестве эффекторных клеток (средняя $EC_{50}=3{,}07\times10^{-1}$ пМ), что указывает на то, что T-клети человека и яванского макака характеризуются сравнимой активностью против одной и той же мишеневой клеточной линии. Эти данные дополнительно подтверждают применение яванского макака в качестве подходящего вида для оценивания DART-A в неклинических токсикологических исследованиях.

Пример 6.

Оценивание опосредованного DART-A высвобождения цитокина с использованием эффекторных клеток человека или яванского макака.

Опосредованное DART-A истощение популяции B-клеток в PBMC человека и яванского макака ассоциировали с высвобождением цитокина в PBMC как человека, так и яванского макака. Как кратко описывается ниже в табл. 8, значения EC_{50} для высвобождения цитокина являются эквивалентными таковым

или превышают таковые для истощения аутологичных B-клеток человека или яванского макака, что указывает на то, что DART-A является более эффективным в опосредовании истощения B-клеток, чем в индуцировании высвобождения цитокина in vitro. Профили высвобождения цитокина между человеком и яванскими макаками in vitro обладают некоторыми схожестью и различиями. IFN-γ и TNF-α являлись преобладающими цитокинами, высвобождаемыми у обоих видов после обработки с помощью DART-A. Однако IL-6 был третьим наиболее преобладающим цитокином, продуцируемым в людей, на основании значений Emax, тогда как IL-2 продуцировался в значительных количествах только в PBMC яванского макака. Сравнение средних значений EC_{50} для наиболее чувствительных цитокинов, продуцируемых в PBMC, после инкубации с DART-A (IFN-γ, TNF-α и IL-6 у людей) со средними значениями EC_{50} для истощения аутологичных B-клеток показало наличие по меньшей мере 6-кратного выявляемого предела безопасности, что отражается в разнице между истощением B-клеток и продуцированием цитокинов у людей (табл. 9).

Таблица 8

Краткое описание значений EC_{50} для истощения аутологичных B-клеток и продуцирования цитокина после обработки PBMC человека или яванского макака с помощью DART-A

PBMC человека	
Анализ (число тестируемых доноров)	Среднее EC_{50} (пМ)
Истощение B-клеток человека (n = 4)	4,20
Высвобождение цитокина человека (n = 2)	
IFN-γ	25,21
TNF-α	31,83
IL-10	70,11
IL-6	23,55
IL-4	Нет данных*
IL-2	56,77
PBMC яванского макака	
Истощение B-клеток яванского макака (n = 4)	342,8
Высвобождение цитокина яванского макака (n = 2)	
IFN-γ	925,24
TNF-α	262,22
IL-6	306,68
IL-5	486,22
IL-4	1718,63
IL-2	2930,19

* Ниже предела выявления.

Таблица 9

Краткое описание значений EC_{50} для цитотоксичности против продуцирования цитокинов после in vitro оценивание DART-A в клетках человека

Анализ CTL[1]		PBMC человека[2]	
Анализ (число доноров)	Среднее EC_{50} (пМ)	Анализ (число доноров)	Среднее EC_{50} (пМ)
Цитотоксичность		Истощение аутологичных B-клеток	
HBL-2 (n = 5)	0,11	PBMC (n = 7)	4,20
Raji/GF (n = 5)	0,31		
Jeko-1 (n = 3)	0,15		
Высвобождение цитокина (n = 2)		Высвобождение цитокина (n = 2)	
IFN-γ	5,51	IFN-γ	25,21

TNF-α	3,71	TNF-α	31,83
IL-2	6,32	IL-6	23,55
Кратность разницы EC_{50} (ориентировочный предел безопасности)	12-58	Кратность разницы EC_{50} (ориентировочный предел безопасности)	6-8

[1] Активность оценивали с использованием анализа CTL с экспрессирующими CD19 опухолевыми клетками (HBL-2, Raji/GF или Jeko-1) в присутствии очищенных человеческих Т-клеток (E:T=10:1). Высвобождение цитокина оценивали с использованием опухолевых клеток Raji/GF.

[2] Активность оценивали в нормальных PBMC человека.

Также исследовали опосредованное DART-A высвобождение цитокина Т-клетками в присутствии мишеневых клеток. Наблюдали зависимое от дозы DART продуцирование цитокина TNF-α, IFN-γ и IL-2 из человеческих Т-клеток с наиболее высокими уровнями (Emax), наблюдаемыми для IL-2 (> 7000 пг/мл) после совместной инкубации с мишеневыми клетками Raji/GF (фиг. 11A-11C; табл. 10). Также получали значительные уровни TNF-α и IFN-γ (~2000-4000 пг/мл). Как и ожидали, инкубация с контрольным диателом DART не приводила к какому-либо выявляемому продуцированию цитокина (фиг. 11A-11C). При анализе среднего значения EC_{50} для наиболее чувствительного цитокина, продуцируемого очищенными человеческими Т-клетками (TNF-α), после инкубации с DART-A в присутствии экспрессирующих CD19 мишеневых клеток (Raji/GF) по сравнению со средним значением EC_{50} для цитотоксичности в отношении мишеневых клеток по меньшей мере чувствительной мишеневой клеточной линии (Raji/GF) наблюдали по меньшей мере 12-кратный выявляемый предел безопасности между киллингом мишеневых клеток и продуцированием цитокина (см. вышеприведенную табл. 9).

Таблица 10

Значения EC_{50} для опосредованного DART-A продуцирования цитокина человеческими Т-клетками в присутствии мишеневых клеток Raji/GF от двух независимых доноров при E:T=10:1

	D47067		D44284	
Цитокин	EC_{50} (пМ)	Emax (пг/мл)	EC_{50} (пМ)	Emax (пг/мл)
IFN-γ	8,58	3885	2,44	2219
TNF-α	6,79	3722	0,626	2361
IL-2	11,31	8496	1,33	7492

Пример 7.

Оценивание опосредованной DART-A активации Т-клеток человека и яванского макака.

Эффект на Т-клетки при опосредованном DART-A перенаправленном лизисе мишеневых клеток (клеток Raji/GF) характеризовали путем оценивания экспрессии маркеров Т-клеточной активации CD69 и CD25. Как CD25, так и CD69 активировали в CD4+ и CD8+ Т-клетках человека и яванского макака зависимым от дозы способом (фиг. 12A-12D и фиг. 13A-13D), что указывало на то, что опосредованный DART-A перенаправленный клеточный киллинг ассоциируется с одновременной активацией Т-клеток. Не наблюдали Т-клеточную активацию в присутствии CD19-отрицательных клеток JIMT-1 (фиг. 14A-14D). Эти данные подтверждают, что Т-клеточная активация зависит от совместного взаимодействия мишеневых клеток. Дополнительно подтверждая данный вывод, контрольное DART 1 не опосредовало индукцию маркеров Т-клеточной активации (фиг. 12A-12D и фиг. 13A-13D).

Пример 8.

Оценивание механизма действия CD19 x CD3.

Для подтверждения того, что предполагаемый механизм опосредованного CD19 x CD3 перенаправленного клеточного киллинга Т-клетками опосредуется гранзимом B и перфорином, измеряли внутриклеточные уровни гранзима B и перфорина в Т-клетках после воздействия DART-A или контрольного DART 1 в анализе CTL. Наблюдали зависимую от дозы активацию уровней гранзима B и перфорина как в CD8+, так и в CD4+ Т-клетках после 24-часовой инкубации человеческих Т-клеток с DART-A в присутствии мишеневых клеток Raji/GF при отношении E:Т-клетки 10:1 (фиг. 15A-15B). Напротив, не наблюдали активацию гранзима B или перфорина при инкубации человеческих Т-клеток с мишеневыми клетками Raji/GF и контрольным DART 1. Эти данные подтверждают, что опосредованный DART-A киллинг мишеневых клеток может быть опосредован через пути гранзима B и перфорина. Следует отметить, что активация гранзима B (фиг. 15A) и перфорина (фиг. 15B) была выше в CD8+ Т-клетках по сравнению с CD4+ Т-клетками, что указывает на ожидаемую более высокую эффективность CD8+ Т-клеток в отношении CTL.

Также оценивали размножение Т-клеток при совместном взаимодействии эффектор:мишеневая клетка с помощью CD9 x CD3, учитывая тот факт, что пролиферация одновременно с Т-клеточной акти-

вации была зарегистрирована ранее. Меченные CFSE человеческие Т-клетки культивировали совместно с мишеневыми клетками HBL-2 при отношении E:T-клетки 10:1 в присутствии DART-A или контрольного DART 1 при концентрации 200 нг/мл. Пролиферацию меченных CFSE Т-клеток контролировали с помощью уровней разбавления CFSE в зависимости от времени с помощью анализа FACS (фиг. 16A-16B). На фиг. 16A показаны профили окрашивания CFSE в присутствии DART-A или контрольного DART1 и мишеневых клеток. Добавление DART-A приводит к пролиферации (разбавление CFSE) с пролиферацией приблизительно 75% клеток после 72-часовой инкубации (фиг. 16B). Напротив, не наблюдали пролиферацию меченных CFSE Т-клеток в присутствии контрольного DART 1.

Пример 9.

Эффективность в смешанных ксенотрансплантатах.

Ингибирование роста опухоли В-клеточной лимфомы человека с помощью DART-A оценивали на самках мышей NOD/SCID (n=8/группа), инъецированных опухолевыми клетками HBL-2 (лимфомы из клеток мантийной зоны человека) или Raji (лимфомы Беркитта), смешанными с активированными человеческими Т-клетками. В обоих исследованиях человеческие Т-клетки и опухолевые клетки (HBL-2 или Raji) объединяли при отношении 1:5 (1×10^6 и 5×10^6 клеток соответственно) и инъецировали SC мышам в день 0. Затем вводили среду в качестве контроля (только опухолевые клетки), DART-A или контрольное DART 1 IV в дни 0, 1, 2 и 3.

Как показано на фиг. 17, рост опухолевых клеток HBL-2 полностью ингибировался после IV обработки с помощью DART-A при уровнях дозы ≥ 0,2 мкг/кг. Хотя обработка с помощью 0,02 мкг/кг DART-A, по-видимому, замедляла рост опухолей HBL-2, ответ не был статистически значимым. Опухоли HBL-2 в группах, обрабатываемых средой и контрольным DART, достигали среднего объема опухоли приблизительно 1000 $мм^3$ в день 13.

Как показано на фиг. 18, не наблюдали значительного роста опухолевых клеток Raji до конца исследования (день 28) у мышей, обрабатываемых DART-A при всех оцениваемых дозах (0,8-100 мкг/кг). Обработка с помощью 0,8 мкг/кг DART-A приводила к полному ответу у 7 из 8 мышей. Опухоли Raji в группах, обрабатываемых средой и контрольным DART 1, демонстрировали рост опухоли in vivo со средними объемами опухоли, достигающими 2449,4±421,1 $мм^3$ и 2968,2±200,0 $мм^3$ соответственно в конце исследования (день 28).

Пример 10.

Эффективность в моделях установленной опухоли.

Противоопухолевую активность DART-A оценивали на модели ксенотрансплантата HBL-2 (лимфомы из клеток мантийной зоны человека) у самок мышей NSG B2m-/- (n=8/группа). Мышам имплантировали опухолевые клетки HBL-2 (5×10^6 клеток) внутрикожно (ID) в день 0 с последующей внутрибрюшинной (IP) инъекцией PBMC (5×10^7 клеток) в день 4. Обработку средой, контрольным DART 1 или DART-A, вводимыми IV, начинали в день 17 при достижении средних объемов опухоли для групп, получавших среду, контрольное DART 1 или DART-A, 438,4±80,2, 433,7±63,8 и 531,7±122,5 $мм^3$ соответственно. В день 21 (2-е введение дозы) средние объемы опухоли увеличивались до 1306,1±240,4, 1185,6±138,7 и 958,5±216,1 $мм^3$ в группах, обрабатываемых средой, контрольным DART 1 и DART-A соответственно. В день 24 (3-е введение дозы) средний объем опухоли в получавших среду и контрольное DART 1 группах увеличивался до 2401,3±397,4 и 2623,7±351,5 $мм^3$ соответственно. Напротив, группа, которая получала DART-A, демонстрировала понижение объема на 45% до 527,3±148,3 $мм^3$. Опухоли в обрабатываемой DART-A группе продолжали уменьшаться в размере, в конечном итоге достигая конечного объема 111,4±38,9 $мм^3$ в день 42, 88,3% снижения от максимального отмеченного объема опухоли (фиг. 19A). Вкратце, обработка с 0,5 мг/кг DART-A приводила к уменьшению больших установленных опухолей лимфомы из клеток мантийной зоны HBL-2. Не отмечали рецидив до дня 42, когда исследование завершали.

Для другой группы несущих опухоль мышей со средним размером опухоли 541 $мм^3$ (n=4 мыши) в день исследования 14 планировали обработку с помощью 500 мкг/кг DART-A. Во время первой дозы (день исследования 17) опухоли достигали среднего объема 2279±61 $мм^3$ (фиг. 19B). Однако перед третьей (день исследования 24) и четвертой (день исследования 28) дозами объемы опухоли составляли 1469±162 и 848±74 $мм^3$ соответственно, что отвечало снижению на 36 и 63% соответственно.

Пример 11.

Токсикокинетическое исследование DART-A на яванских макаках.

Не соответствующее требованиям GLP (надлежащей лабораторной практики) токсикологическое исследование выполняли на яванских макаках для оценивания разных доз и режимов DART-A. Фаза A предусматривала 1-ю из выполняемых для оценивания 2-часовых IV инфузий индивидуальных для животного нарастающих доз DART-A каждую последующую неделю в течение 4 недель, как кратко описано в табл. 11 (фаза A). Половину яванских макаков фазы A в каждой группе (1M/1F) умертвляли в день 36 или день 64. Затем проводили фазу B исследования для оценивания 2-часовых IV инфузий DART-A, вводимых в виде фиксированных доз в каждой группе (табл. 11, фаза B). Для групп 3, 4 и 5 одни и те же дозы (5, 50 или 500 нг/кг соответственно) вводили каждую последующую неделю в общей сложности по

3 дозы на животное. Для группы 6 вводили 500 нг/кг в дни исследования 1, 4, 8, 11 и 15 в виде 2-часовой IV инфузий в общей сложности по 5 доз на животное. Всех животных фазы B умертвляли в день 18.

Таблица 11

Схема эксперимента (фаза A)

№ группы	Самец	Самка	Тестируемый материал	Доза	День введения дозы исследования	Уровень дозы (нг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Концентрация дозы (нг/мл)
1	2	2	Среда	1	1	0	0,3	0
			DART-A	2	8	500	0,3	1700
				3	15	5000	0,3	16700
				4	22	50000	0,3	166700
				5	29	50000	0,3	166700
2	2	2	**DART-A**	1	1	0	0,3	0
				2	8	2000	0,3	7000
				3	15	10000	0,3	33300
				4	22	100000	0,3	333300
				5	29	100000	0,3	333300

Схема эксперимента (фаза B)

№ группы	Самец	Самка	Тестируемый материал	Доза	День введения дозы исследования	Фактический уровень дозы* (нг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Фактическая концентрация дозы (нг/мл)
3	1	1	**DART-A**	1	1	5	0,3	150
				2	8	5	0,3	150
				3	15	5	0,3	150
4	1	1	**DART-A**	1	1	50	0,3	1500
				2	8	50	0,3	1500
				3	15	50	0,3	1500
5	1	1	**DART-A**	1	1	500	0,3	15000
				2	8	500	0,3	15000
				3	15	500	0,3	15000
6	1	1	**DART-A**	1	1	500	0,3	15000
				2	4	500	0,3	15000
				3	8	500	0,3	15000
				4	11	500	0,3	15000
				5	15	500	0,3	15000

* Показан фактический уровень дозы, вводимой на основании анализа концентраций дозируемого состава. Следует отметить, что фактические дозы были в 10 раз меньше определяемых протоколом уровней дозы для фазы B.

1. Токсикокинетическое исследование DART-A на яванских макаках (фаза A).

Не соответствующее требованиям GLP, пилотное, поисковое с нарастающими дозами исследование DART-A выполняли на яванских макаках. В фазе A исследования двум группам яванских макаков (n=4/группа; 2M/2F) вводили индивидуально нарастающие дозы среды (день 1) или DART-A в виде 2-часовых IV инфузий в дни 1, 8, 15, 22 и 29. Яванские макаки в группе 1 получали среду в качестве контроля → 500 → 5000 → 50000 → 50000 нг/кг DART-A. Яванские макаки в группе 2 получали среду в качестве контроля → 2000 → 10000 → 100000 → 100000 нг/кг DART-A. Половину яванских макаков фазы A в каждой группе (1M/1F) умертвляли в день 36 или день 64.

Не наблюдали связанную с DART-A смертность на протяжении фазы A исследования, а также не наблюдали связанные с DART-A макроскопические изменения или изменения массы органов. Однако наблюдали связанные с DART-A эффекты при уровнях дозы ≥ 500 нг/кг, как подробно показано ниже. Эти эффекты соответствовали фармакологии тестируемого продукта и не считались токсикологически значимыми.

В фазе A в день 36 связанные с DART-A микроскопические изменения ограничивались лимфатиче-

скими узлами (паховыми, подчелюстными и мезентериальными), селезенкой и лимфоидной тканью, ассоциированной с кишечником (GALT), для всех животных групп 1 и 2 при отсутствии восстановления микроскопических изменений ко дню 64. В день 36 микроскопические изменения в лимфатических узлах и селезенке были подобными и заключались в снижении, от умеренного до заметного, числа и размера идентифицированных лимфоидных фолликулярных зародышевых центров; в GALT наблюдали минимальное снижение числа и размера лимфоидных фолликулярных зародышевых центров. Ко дню 64 связанные с тестируемым продуктом изменения все еще присутствовали в лимфатических узлах, селезенке и GALT; в лимфатических узлах и селезенке микроскопические изменения заключались в снижении, от умеренного до заметного, числа и размера лимфоидных фолликулярных зародышевых центров, а в GALT наблюдали минимальное снижение числа и размера лимфоидных фолликулярных зародышевых центров.

Оценивание костного мозга (грудина), лимфатических узлов (паховых, подчелюстных и мезентериальных) и селезенки с помощью иммуногистохимии (IHC) показало значительное снижение числа CD20-положительных клеток у животных в фазе A в день 36 с лишь частичным восстановлением окрашивания CD20 ко дню 64. В день 36, как правило, не отмечали CD20-положительного окрашивания в костном мозге или лимфатических узлах животных в фазе A за исключением одного животного из группы 1, у которого присутствовало CD20-положительное окрашивание от очень слабого, слабого до умеренного в зародышевых центрах и лимфоцитарной короне, соответственно, только пахового лимфатического узла. В селезенке идентифицировали CD20-положительные клетки только в красной пульпе 3 животных (у 1 животного из группы 1; у 2 животных из группы 2) с частотой CD20-положительных клеток от очень редкой до редкой и интенсивностью от минимальной или слабой до умеренной.

У восстановившихся животных (день 64) отмечали умеренно окрашенные CD20-положительные клетки, от очень редких до единичных, в костном мозге животных только группы 1. В лимфатических узлах (паховых, подчелюстных и мезентериальных) идентифицировали CD20-положительное окрашивание только у одного животного из группы 1; частота CD20-положительных клеток, как правило, значительно снижалась во всех лимфатических узлах, тогда как интенсивность окрашивания положительных клеток была от умеренной до заметной. CD20-положительные клетки идентифицировали в селезенке всех животных групп 1 и 2. У животных группы 1 CD20-положительные клетки идентифицировали в лимфоидных фолликулах, периартериолярных лимфоидных муфтах (PALS) и красной пульпе у одного животного и в PALS и красной пульпе у другого животного. У животных группы 2 CD20-положительные клетки идентифицировали очень редко или редко только в красной пульпе со слабой интенсивностью окрашивания.

Ниже кратко описывается оценивание на основании FACS истощения B-клеток, цитокинов и ADA в части фазы A данного исследования.

a. Оценивание с помощью FACS B-, T-, NK-клеток и моноцитов.

Образцы цельной крови собирали для оценивания проточной цитометрией ряда подгрупп лимфоцитов и популяций моноцитарных клеток. Животных в фазе A оценивали на неделе -1; до введения дозы в дни 1, 8, 15, 22 и 29; через 24 ч после начала инфузии (SOI) в дни 2, 9, 16, 23 и 30; через 72 ч после SOI в дни 4, 11, 18, 25 и 32; в день 35; а также в дни 43, 50, 57 и 63 (применяли только по отношению к половине яванских макаков в фазе A из каждой группы с умерщвлением после периода восстановления в день 64).

Зависимые от дозы снижения абсолютного числа B-лимфоцитов (CD20+) наблюдали, начиная со дня 9 (через 24 ч после SOI) для обеих групп (групп 1 и 2). В популяциях B-лимфоцитов для животных, получавших 500 нг/кг/доза, (группа 1) наблюдали тенденцию к возвращению к уровням до исследования в дни 11 и 15, тогда как значения для животных, получавших 2000 нг/кг/доза, (группа 2) оставались пониженными. B-лимфоциты были практически истощены на день 16 (через 24 ч после SOI) после введения второй дозы DART-A для обеих получавших дозу групп и оставались истощенными в течение всех последующих моментов времени (фиг. 20A-20B). Истощение B-лимфоцитов было предполагаемым фармакологическим эффектом DART-A.

Другие популяции иммунных клеток, в том числе моноцитов, клеток натуральных киллеров (NK) и T-клеток, также оценивали с помощью проточной цитометрии.

Отмечали временные, зависимые от дозы снижения числа CD14+ моноцитов, начиная со дня 9, через 24 ч после SOI, для большинства животных, получавших дозу 2000 нг/кг (группа 2). Также отмечали снижения числа CD14+ моноцитов в день 16 и день 23, через 24 ч после SOI, для большинства животных, получавших дозу 5000 и 50000 нг/кг соответственно, (группа 1) и для всех животных, получавших дозу 10000 и 100000 нг/кг соответственно, (группа 2). Популяции CD14+ моноцитов быстро восстанавливались после окончания каждой инфузии и, как правило, достигали исходных значений перед исследованием или превышали таковые на момент времени перед введением следующей дозы, снова снижаясь через 24 ч после последующих доз. В конце фазы ведения доз CD14+ моноциты колебались со значениями, которые отклонялись к уровням до исследования, и сохраняли значения, которые находились на исходных уровнях до исследования или превышали таковые.

Наблюдали временные, зависимые от дозы снижения для всех T-лимфоцитов, CD4+ T-лимфоцитов,

CD8+ Т-лимфоцитов, регуляторных Т-лимфоцитов (CD4+/CD25+/FoxP3+), CD159a+ NK-клеток, CD16+ NK-клеток и CD16+/CD159a+ NK-клеток, при этом наибольшие снижения наблюдали у животных, получавших 2000 нг/кг/дозу, (группа 2) в день 9 (через 24 ч после SOI) и после 5000 нг/кг/доза у животных группы 1 в день 16 (через 24 ч после SOI). Подгруппы Т-лимфоцитом и NK-клеток быстро восстанавливались после окончания каждой инфузии и, как правило, достигали исходных значений перед исследованием или превышали таковые перед следующей дозой в дни 15 и 22, снова снижаясь через 24 ч после каждой дозы. Не отмечали дополнительные снижения для группы 1 или 2 в день 30 (через 24 ч после SOI) после доз, вводимых в день 29.

Также оценивали популяции CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов на предмет активации маркеров активации PD-1, TIM-3, CD25 и CD69 с целью определения статуса активации клеток после введения дозы DART-A. Наблюдали различные повышения частоты PD-1+, CD69+ и CD25+ в CD4+ Т-лимфоцитах, а также PD-1+ и CD69+ в CD8+ Т-лимфоцитах после введения дозы, что указывало на повышение частоты активированных CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в цельной крови после введения дозы. Частота CD69+, PD-1+ и CD25+ (в меньшей степени, наблюдающаяся у некоторых, но не у всех животных) в CD4+ Т-лимфоцитах, а также PD-1+ и CD69+ в CD8+ Т-лимфоцитах повышалась после доз 500 нг/кг (группа 1) и 2000 нг/кг (группа 2), начиная со дня 9 (через 24 ч после SOI). Эти значения, как правило, оставались выше исходных уровней и были весьма различны для всех последующих моментов времени. Относительные процентные доли популяций CD25+/CD69+, TIM-3+ и PD-1+/TIM-3+ лимфоцитов, как правило, составляли < 1% всей популяции CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, что затрудняет оценку любых связанных с DART-A изменений. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что введение DART-A приводило к тенденции усиления экспрессии PD-1 и CD69 как в CD4+, так и в CD8+ Т-лимфоцитах наряду с более умеренным повышением CD25+ в CD4+ Т-лимфоцитах у некоторых, но не у всех, животных.

b. Оценивание цитокинов.

Уровни IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF-α и IFN-γ в сыворотке крови определяли (анализом EMD Millipore) перед введением дозы и через 4 и 24 ч после начала каждой инфузии. Наблюдали временные, коррелирующиеся с дозой DART-A повышения уровней IL-10 (до 1918 пг/мл) через 4 ч после начала инфузии, при которой яванским макакам вводили нарастающие дозы, варьирующие от 500 до 50000 нг/кг в группе 1 и от 2000 до 100000 нг/кг в группе 2, с помощью IV инфузии за 2-часовый период для первых 3 доз; при этом уровни, как правило, возвращались к исходным в пределах 24 ч после начала инфузии. Как правило, не выявляли IL-10 через 4 ч после начала последней инфузии DART-A в какой-либо группе (50000 нг/кг в группе 1 или 100000 нг/кг в группе 2) за одним исключением (животное 2502). Животное 2502 испытывало временное повышение IL-10 до 332 пг/мл после последней дозы (100000 нг/кг в день 29), но данное повышение было ниже по абсолютной величине, чем повышение IL-10 после первой дозы 100 мкг/кг в день 22 (570 пг/мл). Один яванский макак (животное 1001) при уровне дозы 50000 нг/кг, который испытывал наибольшие уровни IL-10 (1918 пг/мл в день 22), также одновременно испытывал временные повышения IL-2 (32 пг/мл), IL 5 (45 пг/мл) и IL-6 (357 пг/мл). Временные повышения уровней IL-6 наблюдали у большинства яванских макаков через 4 ч после инфузии DART-A; однако, повышения, как правило, были подобны по абсолютной величине или были ниже таковой (за исключением животного 1001, описанного выше) по сравнению с уровнями, наблюдаемыми после инфузии среды в качестве контроля в день 1 (до 190 пг/мл) без четкого ответа на дозу. Не наблюдали явных клинических показаний, ассоциирующихся с повышенными уровнями цитокинов.

Не наблюдали устойчивые изменения в уровнях IL-5, IL-4, IL-2, IFN-γ или TNF-α после инфузии DART-A. Уровни IL-5 были различными, при этом приблизительно половина животных в каждой группе испытывала небольшие и временные повышения (~10-20 пг/мл; за исключением животного 1001, обсуждаемого выше) после инфузии DART-A в дни 15 или 22. Уровни IFN-γ у некоторых животных также были вариабельными в ходе исследования с небольшими (< ~10 пг/мл) и временными повышениями после инфузии.

2. Токсикокинетическое исследование DART-A на яванских макаках (фаза B).

В фазе B исследования 4 группам яванских макаков (n=2/группа; 1M/1F) вводили фиксированные дозы DART-A в виде 2-часовых IV инфузии, при этом 3 дозы вводили в дни 1, 8 и 15 для группы 3 (5 нг/кг), группы 4 (50 нг/кг) и группы 5 (500 нг/кг) и 5 доз вводили в дни 1, 4, 8, 11 и 15 для группы 6 (500 нг/кг). Всех животных в фазе B подвергали эвтаназии в день 18.

Не наблюдали связанной с DART-A смертности на протяжении фазы B исследования, а также не наблюдали связанные с DART-A макроскопические изменения или изменения массы органов.

В день 18 связанные с DART-A микроскопические изменения ограничивались лимфатическими узлами (паховыми, подчелюстными и мезентериальными) и селезенкой у животных групп 4, 5 и 6 и заключались в снижении, от минимального до умеренного, числа и размера идентифицированных лимфоидных фолликулярных зародышевых центров, при этом не наблюдали явного изменения размера и/или клеточной плотности лимфоидной ткани, содержащей PALS, в селезенке. Не регистрировали микроскопические изменения в группе 3 (5 нг/кг).

Оценивали дополнительные фиксированные в формалине залитые парафином срезы костного мозга

(грудина), лимфатических узлов (паховых, подчелюстных и мезентериальных) и селезенки с помощью IHC на предмет клеточных популяций, которые экспрессируют CD20 (Mordenti, J. et al. (1991) "Interspecies Scaling Of Clearance And Volume Of Distribution Data For Five Therapeutic Proteins", Pharm. Res. 8(11):1351-1359). Не наблюдали существенной разницы в распределении и/или интенсивности окрашивания CD20-положительных клеток в костном мозге (грудина), лимфатических узлах (паховых, подчелюстных и мезентериальных) или селезенке в группах 3, 4, 5 или 6. Во всех тканях положительное окрашивание ассоциировалось с клеточной мембраной. Как правило, в костном мозге единичные CD20-положительные клетки были локализованы по всей строме костного мозга, и интенсивность окрашивания положительных клеток была от умеренной до заметной. В лимфатических узлах CD20-положительные клетки, главным образом, ассоциировались с зародышевыми центрами и лимфоцитарной короной фолликулов, при этом меньшее количество CD20-положительных клеток располагалось в паракортексе, медуллярных связках, а также в медуллярных и подкапсульных синусах. Интенсивность окрашивания в зародышевых центрах, лимфоцитарной короне, медуллярных связках, а также в медуллярных и подкапсульных синусах была от умеренной до заметной. Интенсивность окрашивания в паракортексе была от слабой до заметной. В селезенке CD20-положительные клетки, главным образом, ассоциировались с зародышевыми центрами, фолликулярной мантией и маргинальной зоной лимфоидных фолликулов, при этом меньшее количество CD20-положительных клеток располагалось в PALS и красной пульпе, и интенсивность окрашивания была от умеренной до заметной.

Ниже кратко описывается оценивание на основании FACS истощения B-клеток, цитокинов и ADA в части фазы B данного исследования.

a. Оценивание с помощью FACS B-клеток, T-клеток, NK-клеток и моноцитов.

Образцы цельной крови собирали для оценивания проточной цитометрией ряда подгрупп лимфоцитов и популяций моноцитарных клеток. Животных в фазе B оценивали на неделе -1; до введения дозы в дни 1, 4 (только группа 6) 8, 11 (только группа 6) и 15; через 24 ч после SOI в дни 2, 9 и 16; а также через 72 ч после SOI в день 4 и день 11 (только группы 3-5).

Заметные зависимые от дозы снижения общего числа B-лимфоцитов (CD20+) наблюдали через 24 ч после начала инфузии для доз, вводимых в дни 1, 8 и 15. Наибольшие снижения для групп с обработкой 5 нг/кг (группа 3), 50 нг/кг (группа 4) и 500 нг/кг (группы 5 и 6) наблюдали в день 2 (через 24 ч после SOI). Популяции B-лимфоцитов быстро восстанавливались после каждой инфузии в группах 3 и 4 и наблюдались со значениями, колеблющимися вблизи исходных уровней до исследования во все другие моменты времени. В группах 5 и 6 наблюдали минимальное восстановление между дозами, и сохранялись, как правило, пониженные значения во всех моментах времени после дня 2 (фиг. 21A-21D). Постоянное истощение B-лимфоцитов было предполагаемым фармакологическим эффектом DART-A при более высоких дозах.

Другие популяции иммунных клеток, в том числе моноцитов, NK-клеток и T-клеток, также оценивали с помощью проточной цитометрии.

Отмечали временные, зависимые от дозы снижения общего числа CD14+ моноцитов, начиная со дня 2 (через 24 ч после SOI), у большинства животных во всех получавших дозу группах (группах 3-6). Дополнительные изменения CD14+ моноцитов также наблюдали у большинства животных во всех получавших дозу группах в дни 9 и 16, и значения были высоко вариабельными.

Наблюдали временные, зависимые от дозы снижения числа всех T-лимфоцитов, регуляторных T-лимфоцитов (CD4+/CD25+/FoxP3+), CD4+ T-лимфоцитов, CD8+ T-лимфоцитов и подгрупп NK-клеток, при этом наибольшие снижения для всех групп (групп 3-6), как правило, отмечали в день 2 (через 24 ч после SOI). Подгруппы T-лимфоцитов быстро восстанавливались после каждой инфузии и при всех дозах, как правило, достигали уровней до исследования или превышали таковые перед следующей инфузией во всех группах. Также наблюдали дополнительные снижения CD4+, CD8+ и регуляторных T-лимфоцитов в дни 9 и 16 (через 24 ч после SOI) у получавших дозы 50 нг/кг (группа 4), 500 нг/кг (группа 5) и несколько доз по 500 нг/кг (группа 6) животных, однако, снижения, наблюдаемые в эти моменты времени, были ниже по абсолютной величине по сравнению с наблюдаемыми в день 2 после первой дозы DART-A. В подгруппах NK-клеток, как правило, наблюдали тенденцию к восстановлению после первого дня инфузии и к присутствию с переменными значениями во все остальные моменты времени.

Популяции CD4+ и CD8+ T-лимфоцитов оценивали на предмет активации маркеров активации PD-1, TIM-3, CD25 и CD69 с целью определения статуса активации клеток после введения дозы DART-A. Относительные процентные доли CD25+/CD69+ (только для CD4+ T-лимфоцитов), TIM-3+ и PD-1+/TIM3+ в популяциях CD4+ и CD8+ T-лимфоцитов, как правило, составляли < 1% всех популяций CD4+ и CD8+ T-лимфоцитов, что затрудняет оценку любых связанных с DART-A изменений. Наблюдали повышения частоты PD-1+ и CD69+ в CD4+ и CD8+ T-лимфоцитах на протяжении нескольких моментов времени у получавших 500 нг/кг/доза животных в группах 5 и 6, начиная со дня 2 (через 24 ч после SOI). В качестве дополнения, наблюдали более умеренные повышения частоты CD25+ в CD4+ и CD8+ T-лимфоцитах у получавших 500 нг/кг/доза животных (группы 5 и 6), начиная со дня 2 (через 24 ч после SOI), а также повышения относительных процентных долей CD25+/CD69+ в CD8+ T-лимфоцитах у получавших несколько доз по 500 нг/кг/доза животных (группа 6). Также наблюдали повышения абсо-

лютной величины по сравнению с наблюдаемыми в день 2, как правило, в дни 9 и 16 (через 24 ч после SOI), после последовательных доз. В совокупности эти данные показывают, что введение DART-A приводило к тенденции повышения экспрессии PD-1, CD69 и CD25 в CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитах.

b. Оценивание цитокинов.

Уровни IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF-α и IFN-γ в сыворотке крови определяли (анализом EMD Millipore) до введения дозы в дни -7, 8 и 15 и через 4 и 24 ч после начала инфузий в дни 1, 8 и 15. Наблюдали временные, коррелирующиеся с дозой повышения уровней IL-10 (до 173 пг/мл) через 4 ч после начала 1-ой инфузий DART-A, при которой яванским макакам вводили дозы DART-A 5, 50 или 500 нг/кг (группы 3-6); при этом уровни, как правило, возвращались к исходным в пределах 24 ч после начала инфузий. Повышения в IL-10 оказались более выраженными во всех группах после 1-ой дозы DART-A по сравнению с повышениями IL-10 после 2-ой и 3^{ей} доз (<22 пг/мл у всех животных за исключением животного 5001, описываемого ниже), что подтверждает или "десенсибилизацию" высвобождения цитокина, и/или быстрое снижение/устранение популяции мишеневых клеток, отвечающей за Т-клеточную активацию, после 1-ой дозы. Временные повышения уровней IL-6 (до 162 пг/мл) попеременно наблюдали у некоторых животных во всех получающих дозы групп через 4 ч после начала каждой инфузий DART-A, при этом уровни, как правило, возвращались к исходным уровням или приближались к таковым в пределах 24 ч. Однако на основании данных, полученных при введении среды в фазе А, при котором наблюдали повышения уровней IL-6 до 190 пг/мл, можно заключить, что уровни колебания IL-6 в фазе В (<162 пг/мл) не обязательно отражают зависимые от лекарственного средства ответы. На протяжении исследования не наблюдали никаких устойчивых изменений в уровнях IL-5, IL-4, IL-2, IFNγ или TNF-α.

Один яванский макак (животное 5001) испытывал повышенные уровни IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-5 и IL-10 в день 8 перед 2-ой инфузией DART-A. Уровни цитокинов далее повышались (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN-γ и TNF-α) или оставались стабильными (IL-2) через 4 ч после 2-ой инфузии в день 8. Уровни цитокинов начинали снижаться через 24 ч после 2-ой дозы с переменными повышениями некоторых цитокинов после 3-ей инфузий DART-A в день 15. Хотя уровни всех цитокинов падали ниже их пиковых значений, уровни цитокинов продолжали превышать исходные уровни в последний момент времени оценивания (день 16) у данного яванского макака. Не наблюдали явных клинических показаний, ассоциирующихся с повышенными уровнями цитокинов.

Пример 12.

Подобный Ig период полувыведения у трансгенных с помощью FcRn человека мышей.

Выполняли фармакокинетическое (PK) исследование на трансгенной с помощью FcRn человека мыши с использованием трансгенной с помощью FcRn человека мыши штамма B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr} (CAG-FCGRT)276Dcr/DcrJ (Stock Number 004919), доступной из Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, США, для оценивания DART-A и контрольного DART 1 (фиг. 22). Конечный период полувыведения составлял 85,6 и 92,1 ч соответственно. Также на одной и той же тест-системе для сравнения оценивали три человеческих mAb, которые характеризовались конечными периодами полувыведения, варьирующими от 58,7 до 102,7 ч.

Пример 13.

Эффективность на диссеминированных моделях клеток лейкоза/лимфомы Raji у восстановленных с помощью PBMC человека мышей.

Диссеминированные модели опухоли создавали с использованием трансдуцированных люциферазой клеток лимфомы Raji (Raji.luc) у самок мышей NSG B2m-/-, восстановленных с помощью PBMC человека, при этом мышей обрабатывали средой, контрольным DART 1 или DART-A, либо через один день после инъекции опухолевых клеток ("ранняя обработка" или парадигма лейкоза), либо по меньшей мере через две недели роста in vivo ("развившаяся опухоль" или модель лимфомы).

Модель ранней обработки.

После восстановления с помощью PBMC человека в день исследования -14 клетки лимфомы Raji.luc инъецировали в день исследования 0, а на следующий день начинали обработку (день исследования 1). Инъецировали среду в качестве контроля, 0,5 мг/кг контрольного DART 1 или 0,5 мг/кг DART-A IV один раз каждые 3-4 дня в общей сложности 12 дозами (т.е. в дни исследования 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25 и 27). Мышей наблюдали на предмет выживаемости в день исследования 54 или день исследования 56.

В группах, получающих среду или контрольное DART 1, диффузные профили диссеминированных опухолевых клеток быстро сливались и расширялись у большинства мышей в течение недель 2 и 3. Смерти животных в этих двух контрольных группах отмечали уже через две недели после имплантации опухолевых клеток. Все мыши в получавших среду или контрольное DART 1 группах умирали или были гуманно умерщвлены (т.е. если животные агонизировали или теряли более 15% массы своего тела) в дни исследования 40 или 53 соответственно. Кривые выживаемости изображены на фиг. 23. Напротив, группа, получавшая обработку с помощью DART-A, не показывала роста опухолевых клеток в какой-либо момент времени, и смерти животных не наблюдали в конце исследования. Кривая выживаемости изображена на фиг. 23.

Исследование подбора диапазона доз проводили в рамках эксперимента с последующим наблюдением при тех же экспериментальных условиях, описанных выше, за исключением того, что инъецировали 0,16 мкг/кг, 0,8 мкг/кг, 4 мкг/кг, 20 мкг/кг, 0,1 мг/кг или 0,5 мг/кг DART-A IV один раз каждые 3-4 дня в общей сложности 12 дозами (т.е. в дни исследования 1, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25 и 27). Среду и контрольное DART 1 вводили, как описывается выше, в те же дни исследования. Наблюдали быстрое прогрессирование роста опухоли Raji.luc у мышей, обработанных средой или контрольным DART 1. DART-A демонстрировало эффективность при всех тестируемых дозах, при этом большинство мышей выживало (>8%), а опухоли отсутствовали в конце исследования (день 56) при дозах ниже 20 мкг/кг (фиг. 24).

Модель установленной опухоли.

Способность CD19 x CD3 контролировать опухолевую нагрузку клеток Raji.luc при задержке лечения тестировали в отдельном наборе экспериментов. Для такой модели установленной опухоли восстановленных с помощью человеческих PBMC мышей инокулировали IV клетками Raji.luc в день исследования 0 (приблизительно через одну неделю после инъекции PBMC) и обеспечивали рост в течение 14 дней до начала обработки.

Мышей рандомизировали в день исследования 12 на 3 группы на основании опухолевой нагрузки, а затем обрабатывали с помощью среды, 0,1 мг/кг DART-A или 0,5 мг/кг DART-A начиная в день исследования 14 (через 2 недели после инокуляции клеток Raji.luc) в общей сложности 10 дозами (т.е. в дни исследования 14, 15, 16, 19, 21, 23, 30, 33, 35 и 37). В получавшей среду в качестве контроля группе начальные очаги заметно увеличивались в размере к концу первой недели обработки, и 5/7 мышей умирали в течение 2 недель после начала обработки (фиг. 25). Напротив, опухолевая нагрузка у большинства животных в обеих получавших обработку с помощью DART-A группах сильно снижалась или исчезала в течение первой недели обработки. Только одно животное в каждой получавшей обработку с помощью DART-A группе, каждое с относительно высокой опухолевой нагрузкой, присутствующей при рандомизации, умирало в течение первой недели обработки (фиг. 25). Ко дню исследования 50 только у 2 мышей в получающей обработку с помощью 0,1 мг/кг DART-A группе сохранялись периферические опухоли.

Исследование подбора диапазона доз на модели задержки лечения выполняли при обычных экспериментальных условиях, описанных выше. В данном эксперименте восстановленным с помощью PBMC человека мышам инокулировали IV клетки Raji.luc в день исследования 0 (через 5 дней после инъекции PBMC) и обеспечивали рост до дня исследования 14 перед рандомизацией. Обработку начинали в день исследования 15 с помощью среды, 0,1 мг/кг контрольного DART 1 или 0,16 мкг/кг, 0,8 мкг/кг, 4 мкг/кг, 20 мкг/кг, 0,1 мг/кг или 0,5 мг/кг DART-A в общей сложности 9 дозами (т.е. в дни исследования 15, 17, 21, 23, 25, 28, 30, 32 и 35).

В получавшей среду в качестве контроля группе опухолевая нагрузка постепенно повышалась, и все мыши умерали или были умерщвлены к концу второй недели обработки (фиг. 26). Мыши, обрабатываемые 0,1 мг/кг контрольного DART 1, демонстрировали слегка замедленное прогрессирование опухоли по сравнению с обрабатываемыми средой мышами (фиг. 26). Напротив, опухолевая нагрузка у животных, обрабатываемых с помощью DART-A, как правило, демонстрировала со временем зависимое от дозы снижение (фиг. 26).

Пример 14.

Фармакокинетические показатели DART-A у яванских макаков.

Яванского макака выбирали в качестве подходящей фармакологической модели для анализа DART-A на основе эквивалентного распределения обоих мишеневых антигенов у данного вида по сравнению людьми на основании иммуногистохимии с предшествующими mAb.

Исследование, выполняемое в соответствии с настоящим изобретением, предусматривало 5 получавших обработку групп, состоящих из 10 яванских макаков на группу (5 самцов, 5 самок). Группы обрабатывали путем IV инфузии в течение 2 ч со средой в качестве контроля для первой инфузии в день 1 с последующей обработкой средой в качестве контроля (группа 1) или DART-A (группы 2-5) один раз в неделю в течение четырех недель. Тогда как группа 1 животных продолжала получать среду в качестве контроля при всех 4 последующих инфузиях, животные из групп 2-5 получали DART-A при 0,2 мкг/кг, 2 мкг/кг, 5 мкг/кг или 10 мкг/кг при всех последующих инфузиях в дни 8, 15, 22 и 29 (табл. 12). Трех самцов и 3 самок подвергали эвтаназии и некропсии в день 37, тогда как остальных восстановившихся обезьян группы (2 самцов и 2 самок) подвергали эвтаназии и некропсии в день 121 после 12-недельного восстановительного периода.

Таблица 12

№ инфузии исследования	№ инфузии DART-A (только группы 2-5)	День исследования	DART-A (мкг/кг), введенное в виде 2-часовой IV инфузии				
			Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
1	Не применимо	1	0	0	0	0	0
2	1	8	0	0,2	2	5	10
3	2	15	0	0,2	2	5	10
4	3	22	0	0,2	2	5	10
5	4	29	0	0,2	2	5	10

Анализ концентрации DART-A в сыворотке крови, собранной в разные моменты времени, проводили с помощью ELISA. Профиль концентрации DART-A в сыворотке крови в зависимости от времени для типичного животного из группы 5 показан на фиг. 27. PK параметры (двухкомпонентная модель) оценивали в соответствии с дозами 0,2, 2, 5 и 10 мкг/кг (табл. 13). Как правило, наблюдали пропорциональные дозе повышения максимальных концентраций в сыворотке крови (Cmax) и AUC_{inf} по всему оцениваемому диапазону дозы. Несмотря на существующие при некоторых парных сравнениях доз различия первичных PK параметров, в целом, не наблюдали постоянные тенденции к изменениям клиренса (CL), межкамерного клиренса (CLD2) и объемов распределения (V_1 и V_2) для DART-A по оцениваемым дозам, что указывает на линейную PK. Значения CL у животных групп 2-5 ниже скорости клубочковой фильтрации (GFR) для яванских макаков (~125 мл/ч/кг), что указывает на то, что практически выведение не происходит путем почечной фильтрации, как и ожидалось, для белка с такой молекулярной массой (109,3 кДа). Средние начальные объемы распределения (V_1) для животных из групп 2, 3, 4 и 5 подобны объему в плазме или превышают таковой у яванских макаков (~45 мл/кг), что указывает на небольшое истощение DART-A в центральном компартменте в результате связывания с мишеневыми клетками. Средние периоды полувыведения в бета-фазе и MRT показывали тенденцию к увеличению с повышением дозы, при этом средний период полувыведения в бета-фазе (t1/2, β) составлял 161 час (6,7 суток), а среднее время удержания (MRT) составляло 191 час (8 суток). Следует отметить, что только трое животных в соответствующем требованиям GLP исследовании (n=1 в получавшей дозу 2 мкг/кг группе; n=2 в получавшей дозу 5 мкг/кг группе) характеризовались аберрантными PK профилями после 2-ой и последующих инфузий DART-A (n=2) или после четвертой инфузий DART-A (n=1), а впоследствии были подтверждены как положительные по ADA. Таким образом, данные концентрации в сыворотке крови после затронутых циклов инфузий исключали из PK моделирования для этих 3 животных.

Таблица 13

Двухкомпонентный анализ PK параметров DART-A у яванских макаков

Признак	0,2 мкг/кг/сутки (среднее ± SD)	2 мкг/кг/сутки (среднее ± SD)	5 мкг/кг/сутки (среднее ± SD)	10 мкг/кг/сутки (среднее ± SD)
C_{max} (нг/мл)	3,18 ± 0,46	31,9 ± 3,0	82,9 ± 5,6	166,6 ± 11,0
AUC_{inf} (час*нг/мл)	155 ± 37	2258 ± 634	6714 ± 1846	13756 ± 2534
CL (мл/час/кг)	0,95 ± 0,17	0,80 ± 0,22	0,73 ± 0,24	0,70 ± 0,13
CLD_2 (мл/час/кг)	0,87 ± 0,15	1,65 ± 0,36	1,70 ± 0,74	1,40 ± 0,40
V_1 (мл/кг)	43,4 ± 5,8	50,9 ± 5,1	52,3 ± 3,5	54,5 ± 4,5
V_2 (мл/кг)	65,3 ± 17,5	77,9 ± 17,9	93,4 ± 33,3	105,3 ± 33,0
V_{ss} (мл/кг)	108,7 ± 16,6	128,8 ± 17,2	145,8 ± 34,6	159,8 ± 36,0
$t_{1/2}$ (часы)	14,0 ± 1,5	11,0 ± 2,2	12,3 ± 3,8	15,0 ± 4,4
$t_{1/2,\beta}$ (часы)	119,1 ± 27,6	143,4 ± 43,4	184,9 ± 72,0	205,6 ± 66,9
MRT (часы)	116,3 ± 20,3	173,0 ± 54,5	221,2 ± 86,5	235,9 ± 72,0

Высвобождение цитокина у обработанных с помощью DART-A яванских макаков.

Собирали образцы сыворотки крови для оценивания уровней цитокинов до инфузии и через 2 и 22 ч после окончания инфузии в дни 1, 8, 15, 22 и 29. Оцениваемыми цитокинами были TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 и IL-10.

Наблюдали повышение уровней IL-6, IL-10, IFN-γ и TNF-α после первой инфузии DART-A (день 8), при этом наибольшее повышение уровней цитокинов происходило через 2 ч после окончания инфузии. Зависимое от дозы DART-A повышение наблюдали для IL-10 и IFN-γ при уровнях дозы >2 мкг/кг, тогда как повышение IL-6 наблюдали при уровнях дозы ≥5 мкг/кг. Изменения в уровнях TNF-α были неболь-

шими, и их наблюдали только при наибольшем уровне дозы (10 мкг/кг). Изменения в уровнях цитокинов были временными и возвращались к исходному значению или приближались к таковому в пределах 24 ч после начала инфузии, и не наблюдали клинических показаний, ассоциирующихся с этими повышенными уровнями цитокинов. Последующие инфузии DART-A в дни 15, 22 и 29 приводили к меньшим повышениям уровней цитокинов, как правило, сопоставимым с наблюдаемыми после инфузии контрольного продукта. Средние уровни IL-2, IL-4 и IL-5 демонстрировали переменные и изолированные изменения у отдельных животных, но сохранялись в пределах <20 пг/мл у всех групп на протяжении исследования и не считались токсикологически значимыми.

Уровни цитокинов у животных, получавших 0,2 мкг/кг DART-A, были сопоставимыми с вариациями, наблюдаемыми после инфузии контрольного продукта (группа 1).

Опосредованное DART-A истощение циркулирующих B-клеток у яванских макаков.

Циркулирующие абсолютные уровни B-клеток, T-клеток, в том числе подгрупп T-клеток (CD4 против CD8), маркеров активации (CD25, CD69, PD-1 и TIM-3) и NK-клеток измеряли в исследовании в качестве фармакодинамической конечной точки. Образцы собирали до инфузии и через 2, 22 и 70 ч после окончания инфузии в дни 1, 8, 22 и 29 перед конечной некропсией в день 37, а затем один раз в неделю или два раза в неделю на протяжении восстановительного периода в дни 36, 43, 50, 57, 64, 78, 92, 106 и 119.

На фиг. 28 показано, что обработка с помощью DART-A приводила к зависимому от дозы истощению CD20+ B-клеток - предполагаемой мишеневой популяции. Полное или близкое к полному истощение CD20+ клеток наблюдали через 24 ч после начала первой инфузии DART-A при уровнях дозы ≥2 мкг/кг. Истощение CD20+ B-клеток было устойчивым на протяжении периода обработки и длилось в течение 3-5 недель после конечной дозы. Наблюдали зависимое от дозы возвращение к уровням до введения дозы у CD20+ B-клеток на протяжении нескольких последних недель 12-недельного восстановительного периода.

Пример 15.

Аутологичное истощение злокачественных B-клеток в первичных образцах больных CLL.

Для оценивания опосредованной DART-A цитолитической активности в первичных образцах больных CLL PBMC больных инкубировали с DART-A или контрольным DART 1. Из-за ограниченной доступности образца больного тестировали только 2 концентрации (50 нг/мл и 200 нг/мл). Процентные доли злокачественных CLL B-клеток (CD19+/CD5+ или CD20+/CD5+) и T-клеток (CD19-/CD5+ или CD4+ и CD8+) измеряли с помощью проточной цитометрии до лечения и после лечения в течение 3 и 6 суток. DART-A при тестируемых CLL частично блокирует окрашивание антитела против CD19, поэтому, было нецелесообразно использовать CD19+/CD5+ для гейтирования злокачественных B-клеток после лечения с помощью DART-A. Таким образом, истощение злокачественных B-клеток определяли с помощью гейтирования в CD20+/CD5+ клетках после лечения с помощью DART-A.

Отношение E:T, определяемое по частоте злокачественных CLL B-клеток и T-клеток, как правило, составляло ≤1:10. В показанном типичном эксперименте с CLL донора отношение E:T-клетки составляло приблизительно 1:23 до лечения на основе CD19-/CD5+ T-клеток, составляющих только 4% всех PBMC и приблизительно 90% PBMC, идентифицированных как CD19+/CD5+ злокачественные B-клетки. На фиг. 29A -29I и в табл. 14 показаны эффекты лечения с помощью DART-A по сравнению с образцом больного CLL. Инкубация DART-A с PBMC CLL приводила к зависимому от времени истощению злокачественных B-клеток при обеих оцениваемых концентрациях DART-A, что сопровождалось сопутствующим увеличением T-клеток (CD4 и CD8), наблюдаемым в день 6. Кроме того, маркер T-клеточной активации CD25 был активирован после лечения с помощью DART-A в течение 6 суток, указывая на то, что DART-A индуцирует T-клеточную активацию в процессе перенаправленного киллинга злокачественных B-клеток. В отличие от этого, B-клеточный киллинг или активацию CD25 не наблюдали с контрольным DART 1 ко дню 6.

Следует отметить, что DART-A опосредовало одинаковый уровень киллинга при обеих оцениваемых концентрациях, но уровень киллинга повышался в зависимости от времени, при этом приблизительно 40 и 85% злокачественных B-клеток погибали в день 3 и день 6, соответственно, что указывает на то, что время является критическим фактором для эффективного устранения мишеневых клеток при низких отношениях T-клеток к мишеням при присутствии достаточного количества DART-A.

Таблица 14

Процентные доли злокачественных B-клеток (CD20+/CD5+), Т-клеток (CD4, CD8+) и активированных Т-клеток (CD25+/CD4+ и CD25+/CD8+) в PBMC CLL (E:T=1:23) после лечения с помощью DART-A или контрольного DART 1 в течение 3 и 6 суток

Момент времени	**Процентные доли (%)**				
	CD20+/CD5+	**CD4+**	**CD8+**	**CD25+/CD4+**	**CD25+/CD8+**
День 0					
Предварительное лечение	70,7	нет данных[1]		Подгруппу CD4+ и CD8+ Т-клеток не измеряли в день 0. CD19-/CD5+ использовали для определения Т-клеточной популяции в день 0 (4%), как описывается выше.	
День 3					
DART-A (50 нг/мл)	40,5	1,01	1,78	Суммарные процентные доли Т-клеток были слишком низкими (< 5%) для оценивания маркера Т-клеточной активации CD25 в день 0 или день 3.	
Контрольное DART 1 (50 нг/мл)	73,5	3,08	1,81		
DART-A (200 нг/мл)	42,3	1,61	1,68		
Контрольное DART 1 (200 нг/мл)	72,9	3,23	1,62		
День 6					
DART-A (50 нг/мл)	11,3	57,4	22,2	87,7	82,8
Контрольное DART 1 (50 нг/мл)	74,9	3,54	2,26	1,4	20,6
DART-A (200 нг/мл)	12,3	65,2	20,9	91,6	90,7
Контрольное DART 1 (200 нг/мл)	73,4	2,79	1,82	1,4	14,3

Все публикации и патенты, упоминаемые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация или заявка на выдачу патента была специально и индивидуально включена посредством ссылки во всей своей полноте. Несмотря на то что настоящее изобретение описано с использованием конкретных вариантов его осуществления, следует понимать, что возможны дальнейшие модификации, и настоящая заявка предназначена охватывать любые вариации, применения или варианты настоящего изобретения, соответствующие, как правило, принципам настоящего изобретения и включающие в себя такие отступления от настоящего раскрытия, которые находятся в пределах известной или общепринятой практики в области, к которой относится настоящее изобретение, и которые могут быть применимы к существенным признакам, изложенным выше.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое моновалентное Fc-диателo к CD19 x CD3, способное специфически связываться с CD19 и с CD3, при этом диателo содержит первую, вторую и третью полипептидные цепи, при этом указанные полипептидные цепи образуют ковалентно связанный комплекс, а также при этом:

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

A) домен IA, содержащий:

(1) субдомен (IA1), который содержит домен VL, способный связываться либо с CD19 (VL_{CD19}), либо с CD3 (VL_{CD3}); и

(2) субдомен (IA2), который содержит домен VH, способный связываться либо с CD19 (VH_{CD19}), либо с CD3 (VH_{CD3});

при этом указанные субдомены IA1 и IA2 отделяются друг от друга полипептидным линкером и представляют собой либо

(a) VL_{CD19} и VH_{CD3}; либо

(b) VL_{CD3} и VH_{CD19};

B) домен IB, содержащий положительно или отрицательно заряженный спиральный домен, при этом указанный домен IB отделен от указанного домена IA полипептидным линкером;

C) домен IC, содержащий домен CH2-CH3 антитела; и

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

A) домен IIA, содержащий:

(1) субдомен (IIA1), который содержит домен VL, способный связываться либо с CD19 (VL_{CD19}), либо с CD3 (VL_{CD3}); и

(2) субдомен (IIA2), который содержит домен VH, способный связываться либо с CD19 (VH_{CD19}), либо с CD3 (VH_{CD3});

при этом указанные субдомены IIA1 и IIA2 отделяются друг от друга полипептидным линкером и представляют собой:

(a) VL_{CD19} и VH_{CD3}, если указанными субдоменами IA1 и IA2 являются VL_{CD3} и VH_{CD19}; или

(b) VL_{CD3} и VH_{CD19}, если указанными субдоменами IA1 и IA2 являются VL_{CD19} и VH_{CD3};

B) домен IIB, содержащий положительно или отрицательно заряженный спиральный домен, при этом указанный домен IIB отделен от указанного домена IIA полипептидным линкером, и при этом указанный заряженный спиральный домен указанного домена IB и указанный заряженный спиральный домен указанного домена IIB имеют противоположные заряды, при этом один из указанных заряженных спиральных доменов указанного домена IB и указанного домена IIB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, а другой из указанных заряженных спиральных доменов указанного домена IB и указанного домена IIB содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и

III) указанная третья полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу домен IIIC, который содержит домен CH2-CH3 антитела;

при этом указанный домен VL_{CD19} и указанный домен VH_{CD19} образуют CD19-связывающий домен, и указанные домены VL_{CD3} и VH_{CD3} образуют CD3-связывающий домен; и указанные домены CH2-CH3 указанных первой и третьей полипептидных цепей образуют Fc-домен, способный связываться с Fc-рецептором с образованием тем самым указанного биспецифического моновалентного Fc-диателa к CD19 x CD3.

2. Биспецифическое моновалентное Fc-диателo к CD19 x CD3 по п.1, в котором:

(A) каждый из указанных доменов IB и IIB содержит цистеиновый остаток, который ковалентно связывает указанную первую полипептидную цепь с указанной второй полипептидной цепью с помощью дисульфидной связи; и

(B) каждый из указанных доменов IC и IIIC содержит цистеиновый остаток, который ковалентно связывает указанную первую полипептидную цепь с указанной третьей полипептидной цепью с помощью дисульфидной связи.

3. Биспецифическое моновалентное Fc-диателo к CD19 x CD3 по любому из пп.1 и 2, в котором указанный VL_{CD19} содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и указанный VH_{CD19} содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

4. Биспецифическое моновалентное Fc-диателo к CD19 x CD3 по любому из пп.1-3, в котором указанный VL_{CD3} содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, и указанный VH_{CD3} содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

5. Биспецифическое моновалентное Fc-диателo к CD19 x CD3 по любому из пп.1-4, в котором указанный домен CH2-CH3 указанного домена IC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и указанный домен CH2-CH3 указанного домена IIIC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

6. Биспецифическое моновалентное Fc-диателo к CD19 x CD3 по любому из пп.1-5, в котором указанный полипептидный линкер, который отделяет указанный домен IB от указанного домена IA, содер-

жит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и указанный полипептидный линкер, который отделяет указанный домен IIB от указанного домена IIA, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

7. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело к CD19 x CD3 по любому из пп.1-5, в котором указанный полипептидный линкер, который отделяет указанный домен IB от указанного домена IA, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и указанный полипептидный линкер, который отделяет указанный домен IIB от указанного домена IIA, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

8. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело к CD19 x CD3 по любому из пп.1-6, в котором:

(A) указанная первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;

(B) указанная вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; и

(C) указанная третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

9. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело к CD19 x CD3 по любому из пп.1-8, которое способно перекрестно реагировать с CD19 как человека, так и примата и с CD3 как человека, так и примата.

10. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией CD19, содержащая биспецифическое моновалентное Fc-диатело к CD19 x CD3 по любому из пп.1-9 и физиологически приемлемый носитель.

11. Применение биспецифического моновалентного Fc-диатела к CD19 x CD3 по любому из пп.1-9 в качестве фармацевтического средства для лечения заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией CD19.

12. Применение биспецифического моновалентного Fc-диатела к CD19 x CD3 по любому из пп.1-9 в лечении заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией CD19.

13. Применение фармацевтической композиции по п.10 в лечении заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией CD19.

14. Применение по любому из пп.12, 13, при этом указанным заболеванием или состоянием, характеризующимся экспрессией CD19, является злокачественная опухоль.

15. Применение по п.14, при этом указанная злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), хронического миелогенного лейкоза (CML), бластного криза CML, онкогена Абельсона, ассоциирующегося с CML (транслокация Bcr-ABL), миелодиспластического синдрома (MDS), острого B-клеточного лимфобластного лейкоза (B-ALL), диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), синдрома Рихтера, трансформации Рихтера CLL, волосатоклеточного лейкоза (HCL), новообразования из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток (BPDCN), неходжкинских лимфом (NHL), лейкоза из клеток мантийной зоны (MCL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL), лимфомы Ходжкина, системного мастоцитоза и лимфомы Беркитта.

16. Диатело, содержащее первую полипептидную цепь, содержащую отрицательно заряженный спиральный домен, и вторую полипептидную цепь, содержащую положительно заряженный спиральный домен, указанные отрицательно и положительно заряженные спиральные домены для обеспечения гетеродимеризации, при этом указанные первая и вторая полипептидные цепи образуют ковалентно связанный комплекс, при этом:

(A) указанная первая полипептидная цепь содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, связанную с указанным отрицательно заряженным спиральным доменом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и

(B) указанная вторая полипептидная цепь содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, связанную с указанным положительно заряженным спиральным доменом, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

при этом указанный отрицательно заряженный спиральный домен указанной первой полипептидной цепи и указанный положительно заряженный спиральный домен указанной второй полипептидной цепи ковалентно связаны друг с другом с помощью дисульфидной связи.

17. Диатело, содержащее первую полипептидную цепь, содержащую отрицательно заряженный спиральный домен, и вторую полипептидную цепь, содержащую положительно заряженный спиральный домен, указанные отрицательно и положительно заряженные спиральные домены для обеспечения гетеродимеризации, при этом указанные первая и вторая полипептидные цепи образуют ковалентно связанный комплекс, при этом:

(A) указанная первая полипептидная цепь содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, связанную с указанным отрицательно заряженным спиральным доменом, содержащим аминокислотную последовательностью SEQ ID NO: 12; и

(B) указанная вторая полипептидная цепь содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, связанную с указанным положительно заряженным спиральным доме-

ном, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

при этом указанный отрицательно заряженный спиральный домен указанной первой полипептидной цепи и указанный положительно заряженный спиральный домен указанной второй полипептидной цепи ковалентно связаны друг с другом с помощью дисульфидной связи.

18. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания или состояния, характеризующегося экспрессией CD19, содержащая диатело по любому из пп.16, 17 и физиологически приемлемый носитель.

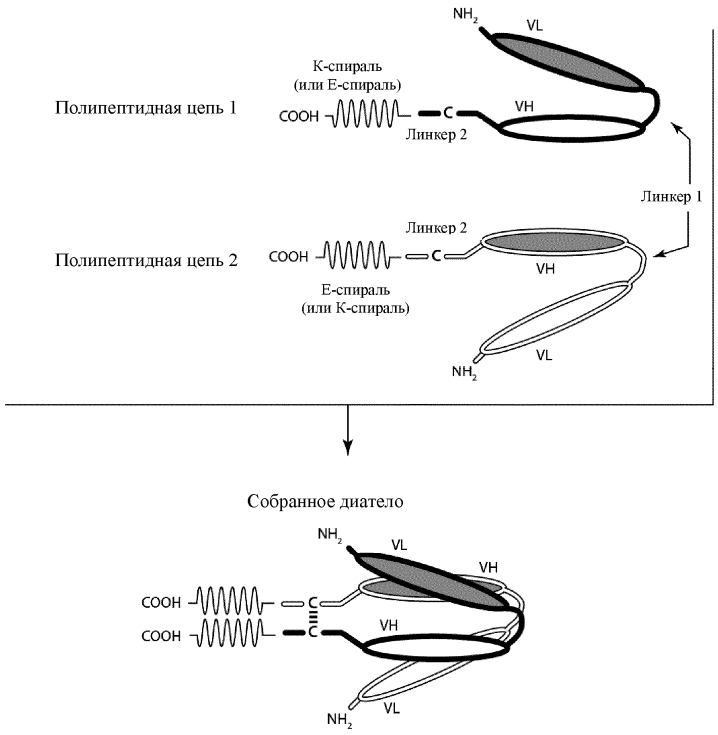
19. Полинуклеотид, кодирующий первую полипептидную цепь биспецифического моновалентного Fc-диатела к CD19 x CD3 по любому из пп.1-6, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35.

20. Полинуклеотид, кодирующий вторую полипептидную цепь биспецифического моновалентного Fc-диатела к CD19 x CD3 по любому из пп.1-6, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

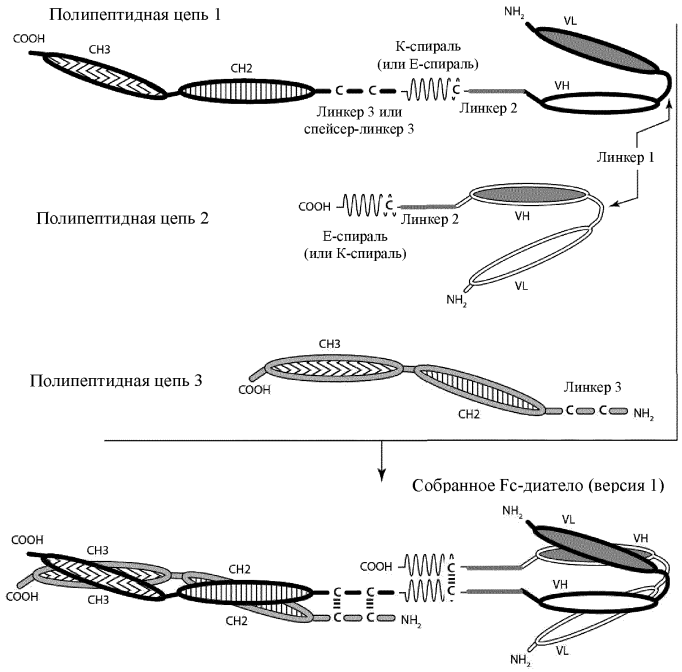
21. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по любому из пп.19, 20.

22. Полинуклеотид по п.19, который содержит последовательность SEQ ID NO: 36.

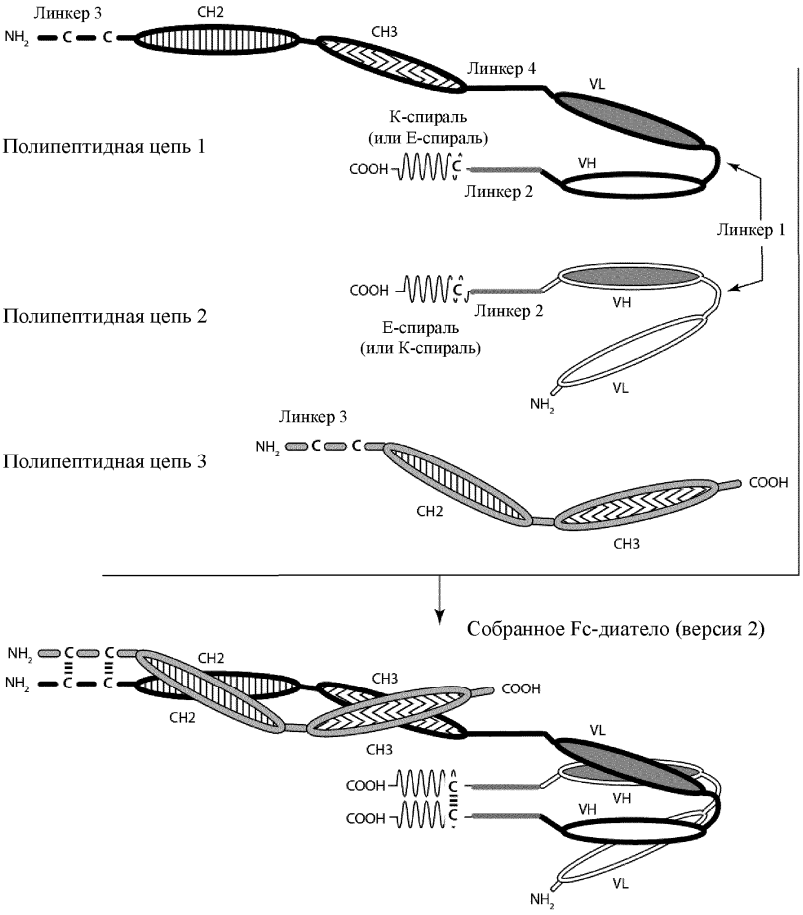
23. Полинуклеотид по п.20, который содержит последовательность SEQ ID NO: 38.



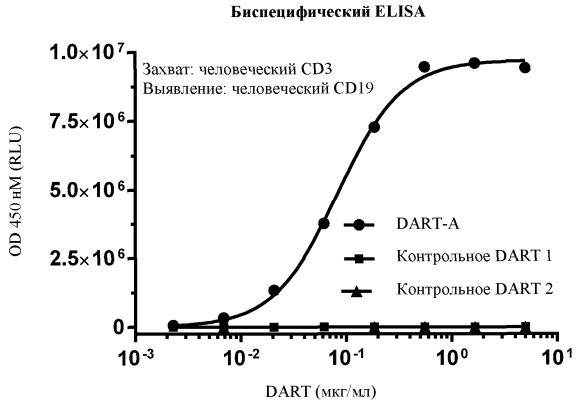
Фиг. 1


Полипептидная цепь 1
COOH
CH3
CH2
C C
Линкер 3 или
спейсер-линкер 3
К-спираль
(или Е-спираль)
Линкер 2
NH2
VL
VH
Линкер 1
Полипептидная цепь 2
COOH
Линкер 2
VH
Е-спираль
(или К-спираль)
NH2
VL
Полипептидная цепь 3
CH3
COOH
Линкер 3
CH2
C C NH2
Собранное Fc-диатело (версия 1)
COOH
CH3
CH2
COOH
CH3
CH2
C C NH2
COOH
NH2
VL
VH
VH
NH2
VL

Фиг. 2А


Линкер 3
NH2 C C
CH2
CH3
Линкер 4
VL
Полипептидная цепь 1
К-спираль
(или Е-спираль)
COOH
VH
Линкер 2
Линкер 1
Полипептидная цепь 2
COOH
Линкер 2
VH
Е-спираль
(или К-спираль)
NH2
VL
Полипептидная цепь 3
Линкер 3
NH2 C C
CH2
COOH
CH3
Собранное Fc-диатело (версия 2)
NH2 C C
NH2 C C
CH2
CH2
CH3
COOH
CH3
VL
COOH
VH
COOH
VH
NH2
VL

Фиг. 2В



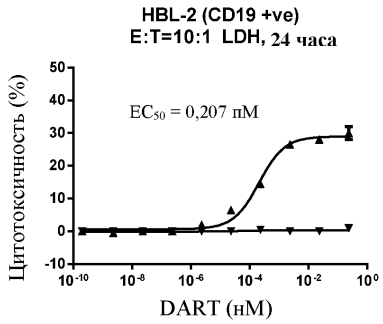
Фиг. 3

Фиг. 4A

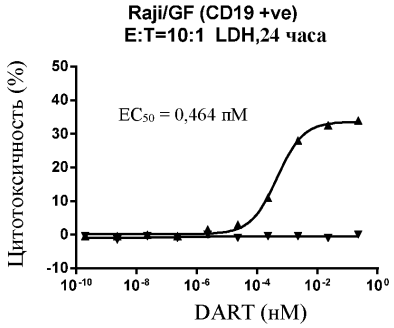
Фиг. 4B

Фиг. 5A

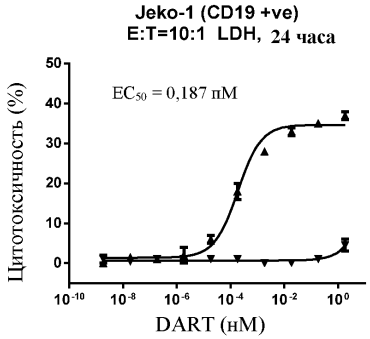
Фиг. 5B



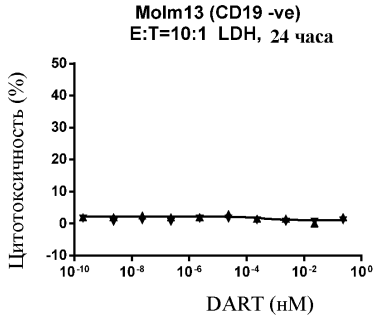
Фиг. 6A



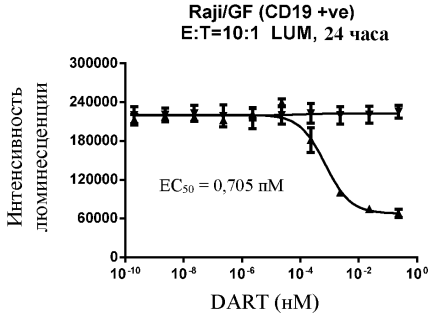
Фиг. 6B



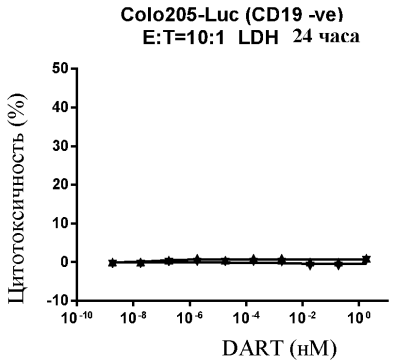
Фиг. 6C



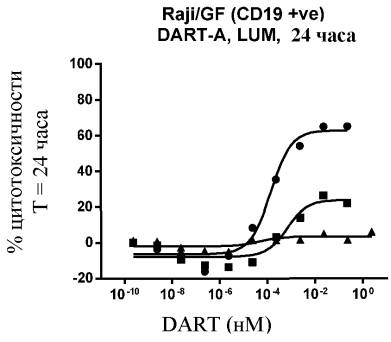
Фиг. 6D



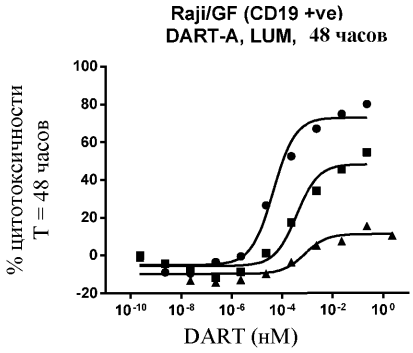
Фиг. 6E



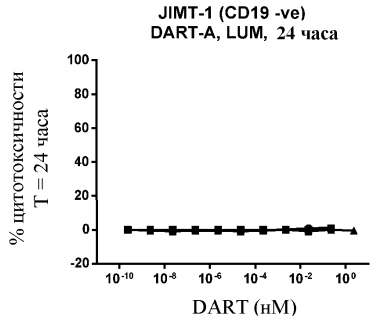
Фиг. 6F



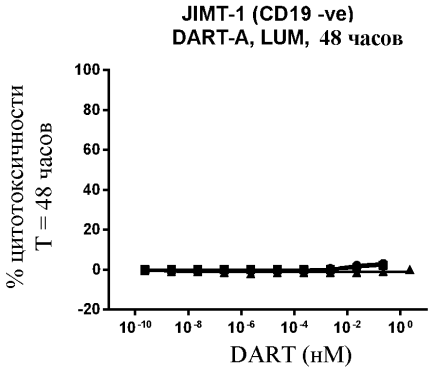
Фиг. 7A



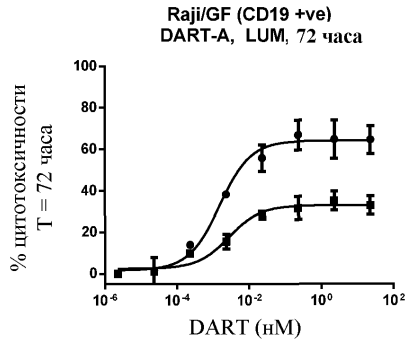
Фиг. 7B



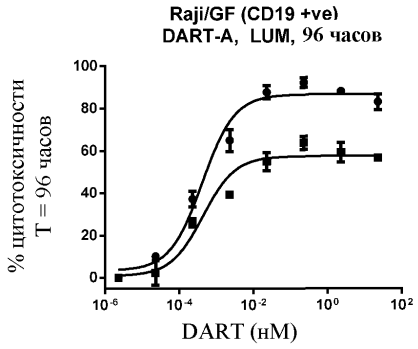
Фиг. 7C



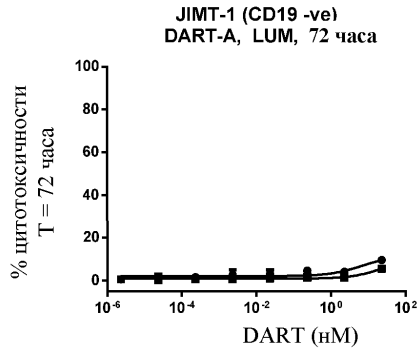
Фиг. 7D



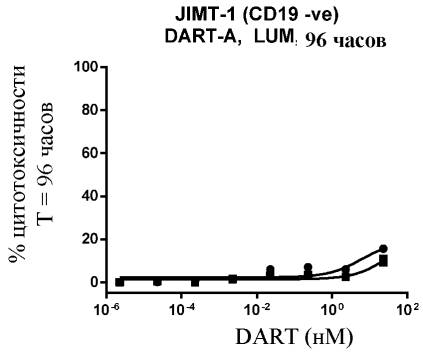
Фиг. 8A



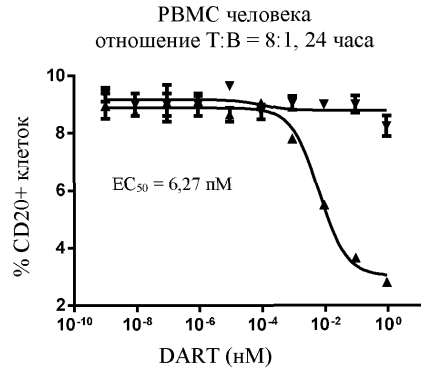
Фиг. 8B



Фиг. 8C

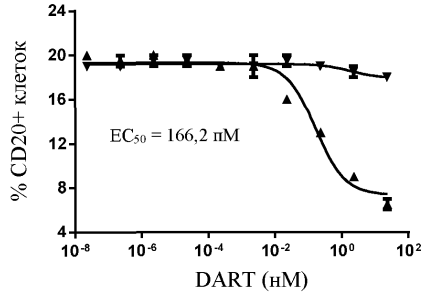


Фиг. 8D



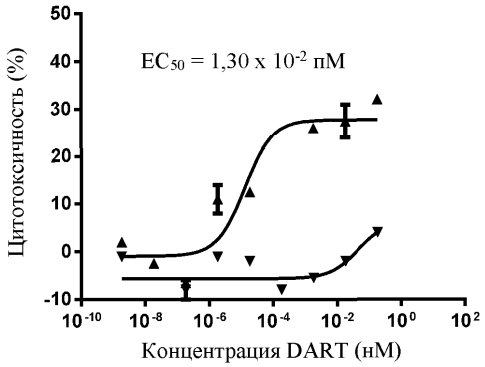
Фиг. 9A

PBMC яванского макака
отношение T:B = 3:1, 24 часа



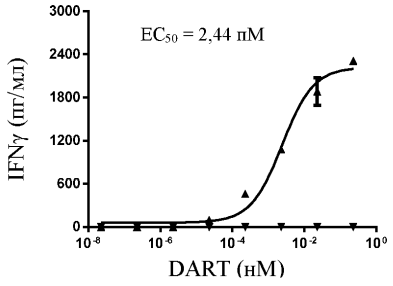
Фиг. 9B

Raji/GF (CD19+ ve) + PBMC яванского макака C20142
E:T = 30:1 LDH, 24 часа



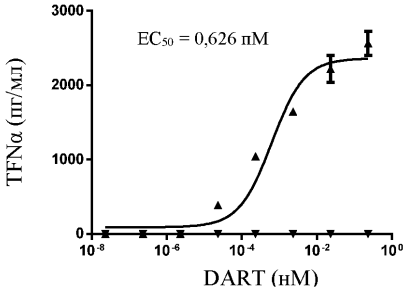
Фиг. 10

Raji/GF (CD19+ ve) + T-клетки Pan D44284
E:T = 10:1 IFNγ, 24 часа

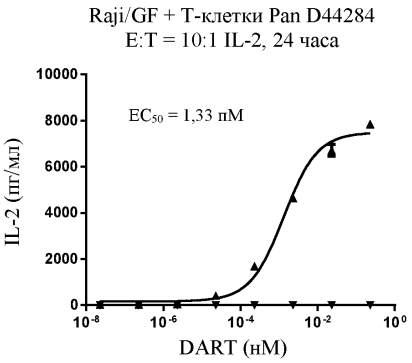


Фиг. 11A

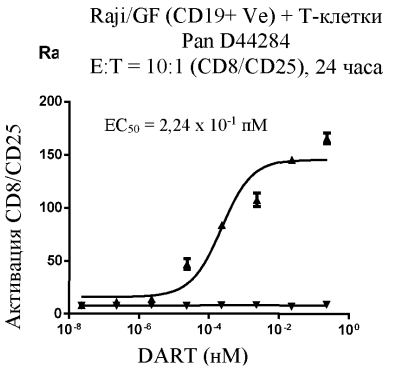
Raji/GF + T-клетки Pan D44284
E:T = 10:1 TFNα, 24 часа



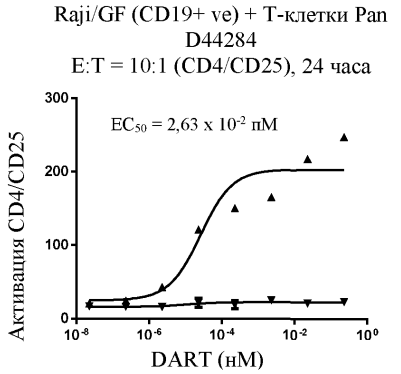
Фиг. 11B



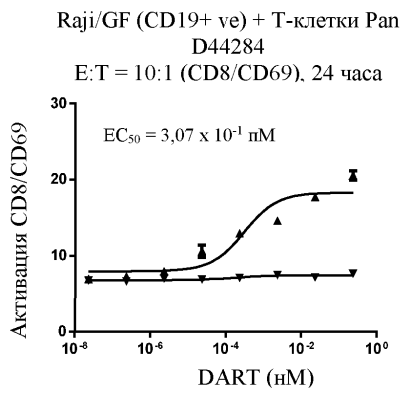
Фиг. 11C



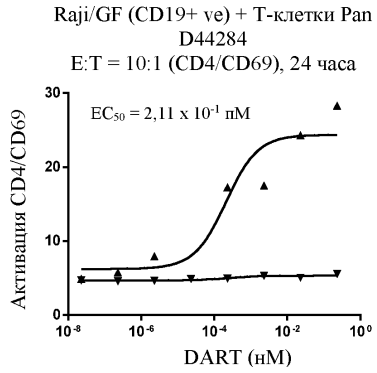
Фиг. 12A



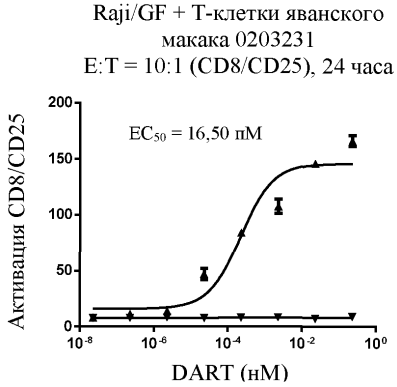
Фиг. 12B



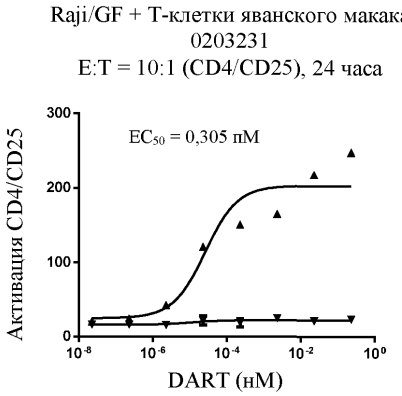
Фиг. 12C



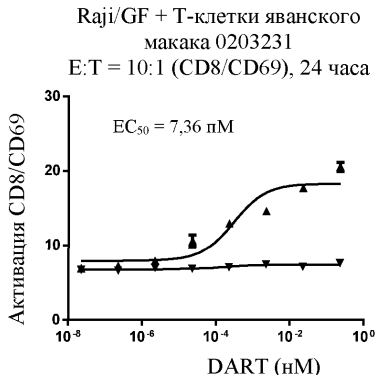
Фиг. 12D



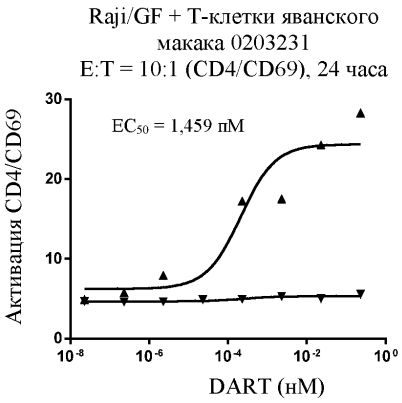
Фиг. 13A



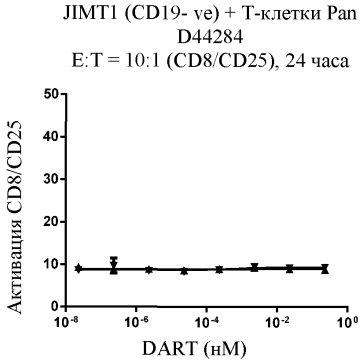
Фиг. 13B



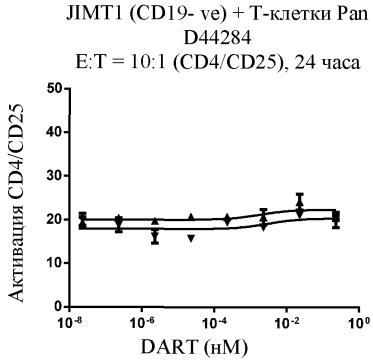
Фиг. 13C



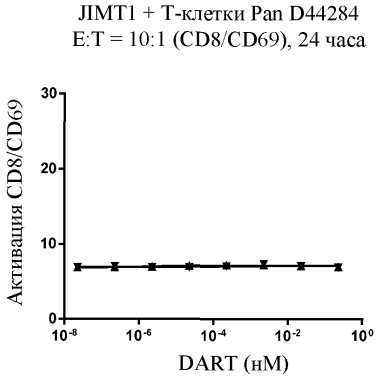
Фиг. 13D



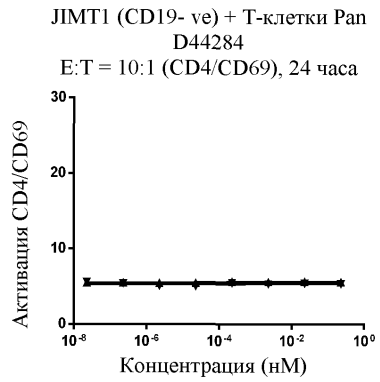
Фиг. 14A



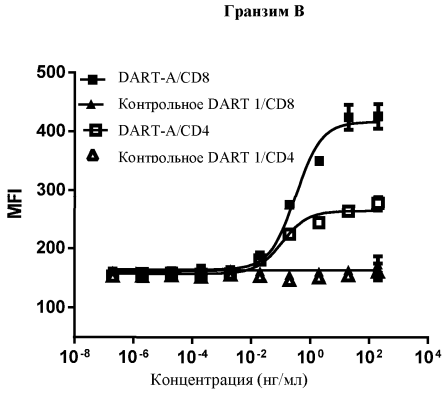
Фиг. 14B



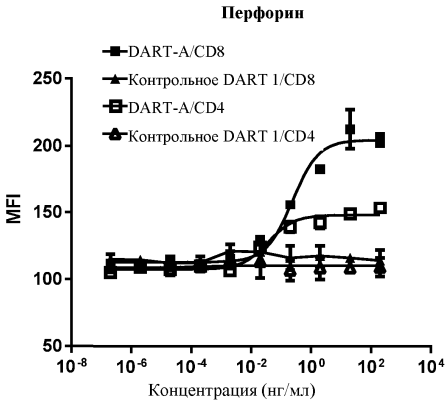
Фиг. 14C



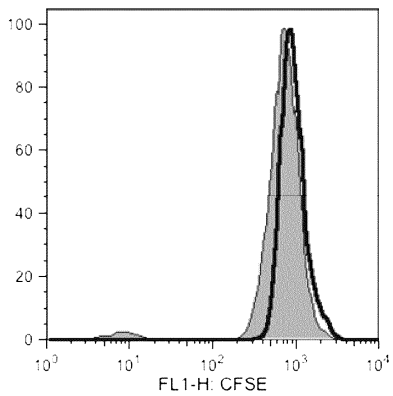
Фиг. 14D



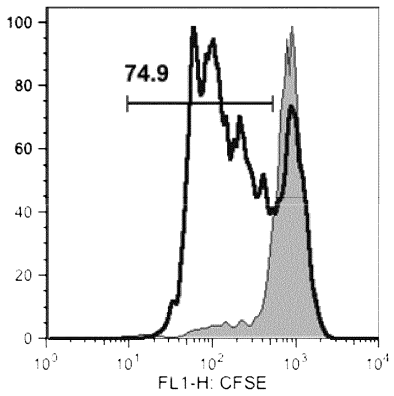
Фиг. 15A



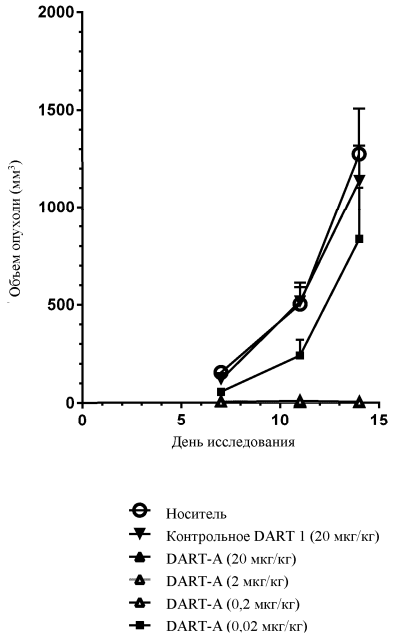
Фиг. 15B



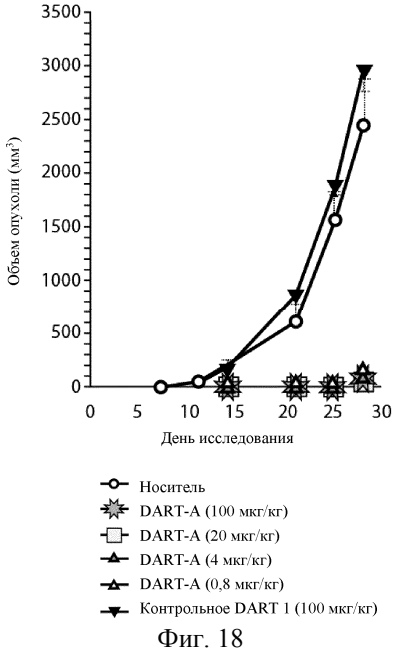
Фиг. 16A



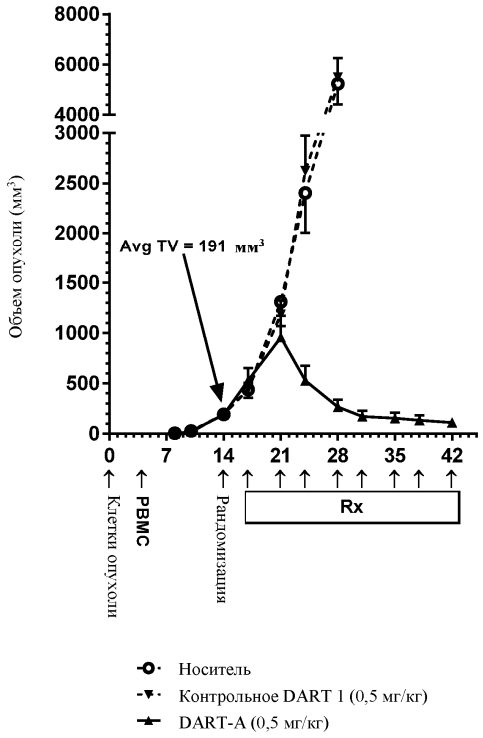
Фиг. 16B



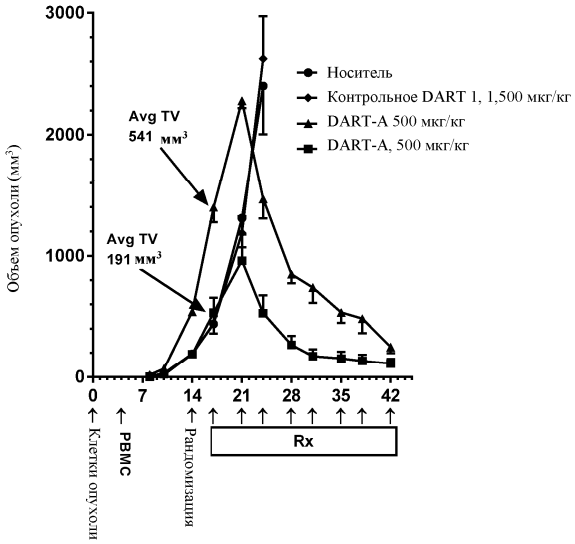
Фиг. 17



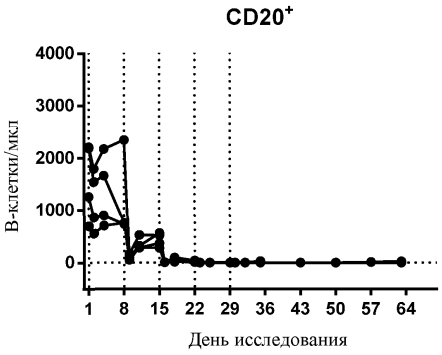
Фиг. 18



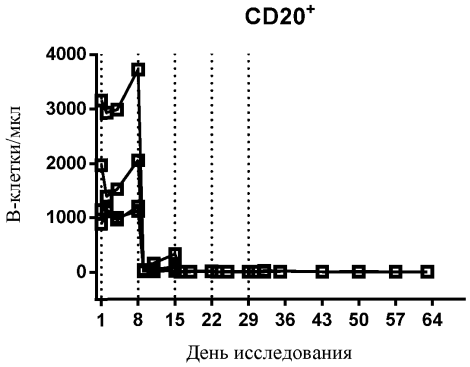
Фиг. 19A



Фиг. 19B

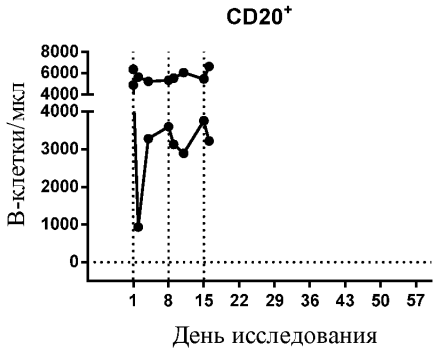


Фиг. 20A



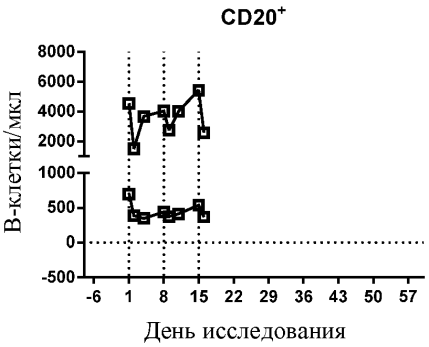
Фиг. 20B

Группа 3



Фиг. 21A

Группа 4

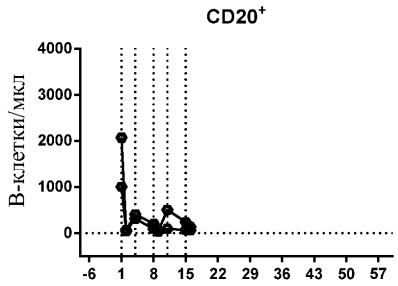


Фиг. 21B

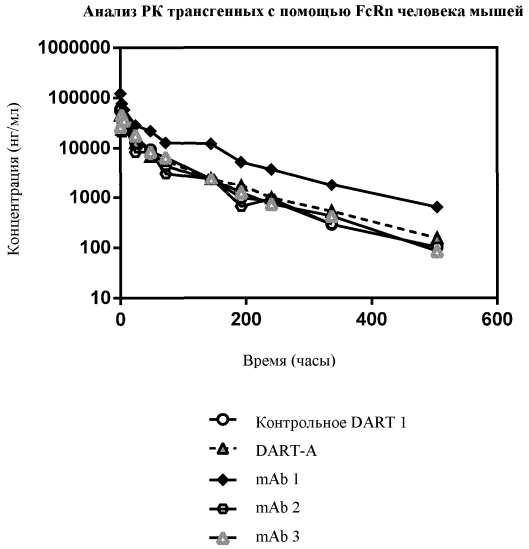
Группа 5

Фиг. 21C

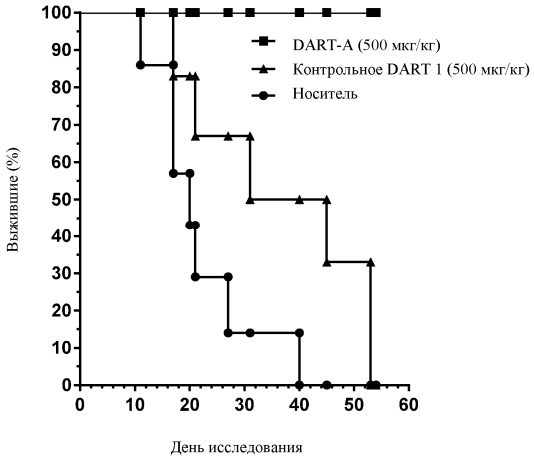
Группа 6



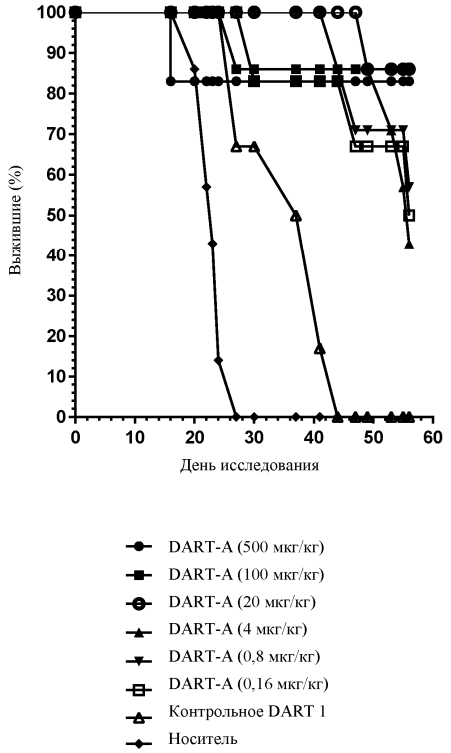
Фиг. 21D



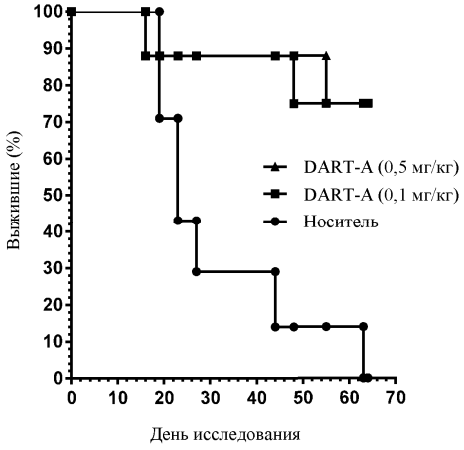
Фиг. 22



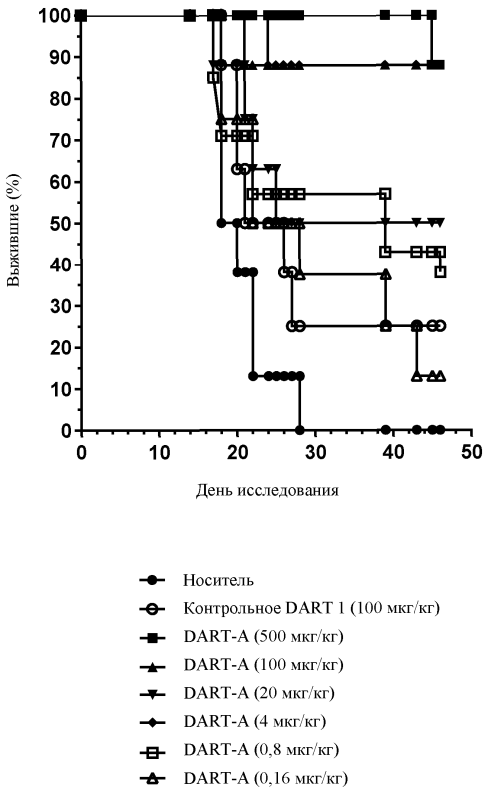
Фиг. 23


Выжившие (%)
День исследования
DART-A (500 мкг/кг)
DART-A (100 мкг/кг)
DART-A (20 мкг/кг)
DART-A (4 мкг/кг)
DART-A (0,8 мкг/кг)
DART-A (0,16 мкг/кг)
Контрольное DART 1
Носитель

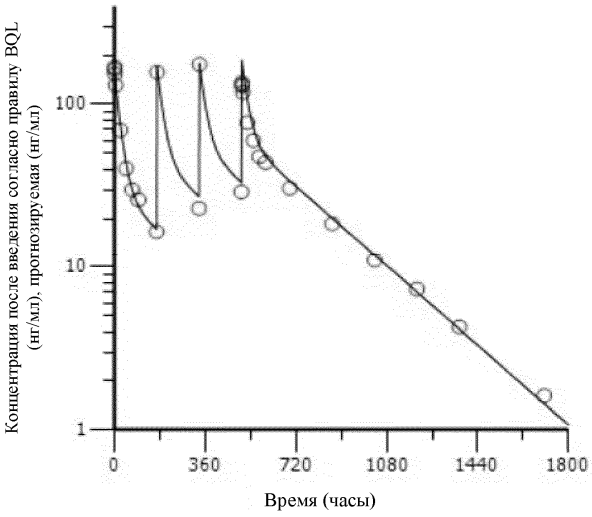
Фиг. 24


Выжившие (%)
День исследования
DART-A (0,5 мг/кг)
DART-A (0,1 мг/кг)
Носитель

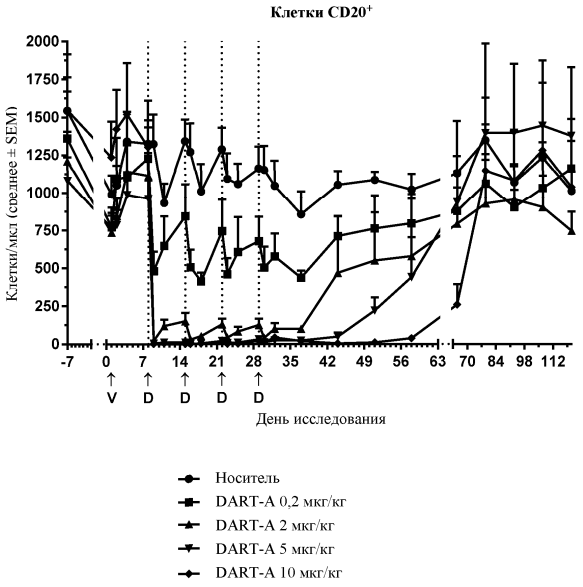
Фиг. 25


Выжившие (%)
День исследования
Носитель
Контрольное DART 1 (100 мкг/кг)
DART-A (500 мкг/кг)
DART-A (100 мкг/кг)
DART-A (20 мкг/кг)
DART-A (4 мкг/кг)
DART-A (0,8 мкг/кг)
DART-A (0,16 мкг/кг)

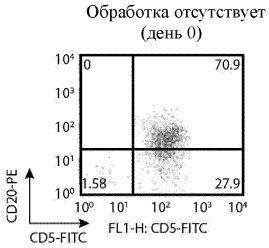
Фиг. 26


Концентрация после введения согласно правилу BQL (нг/мл), прогнозируемая (нг/мл)
Время (часы)

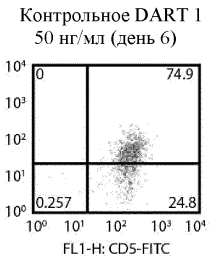
Фиг. 27



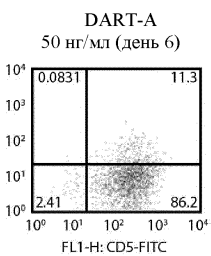
Фиг. 28



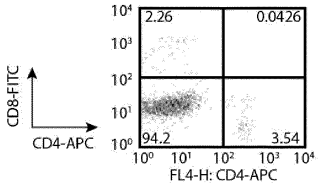
Фиг. 29A



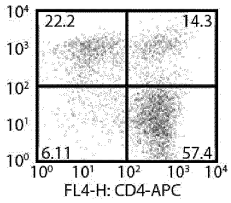
Фиг. 29B



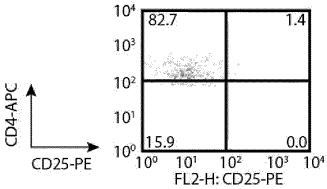
Фиг. 29C



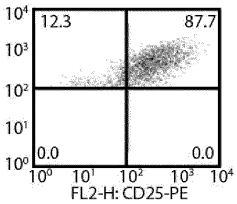
Фиг. 29D



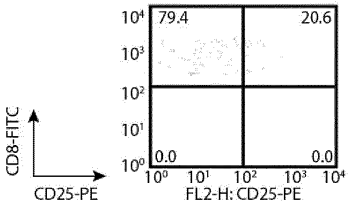
Фиг. 29E



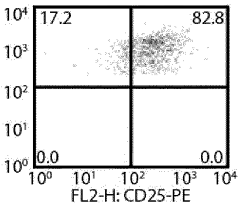
Фиг. 29F



Фиг. 29G



Фиг. 29H



Фиг. 29I