

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(21) Номер заявки
201890785

(22) Дата подачи заявки
2016.09.23

(54) **ОПТИМИЗИРОВАННЫЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИ-CD3 АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/222,605**

(32) **2015.09.23**

(33) **US**

(43) **2018.10.31**

(86) **PCT/US2016/053525**

(87) **WO 2017/053856 2017.03.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Смит Эрик, Абер Лорик, Бабб Роберт,
Чэнь Ган, Макдоналд Дуглас (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2014056783**

WO-A1-2013026839

WO-A1-2014047231

WU ET AL.: "Fab-based bispecific antibody formats with robust biophysical properties and biological activity", 16 March 2015 (2015-03-16), MABS, LANDES BIOSCIENCE, US, PAGE(S) 470-482, XP009185560, ISSN: 1942-0870, the whole document

YU CAO ET AL.: "Multiformat T-Cell-Engaging Bispecific Antibodies Targeting Human Breast Cancers", ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, vol. 54, no. 24, 27 April 2015 (2015-04-27), pages 7022-7027, XP055319131, DE, ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201500799, the whole document

JUNG G. ET AL.: "TARGET CELL-INDUCED T CELL ACTIVATION WITH BI- AND TRISPECIFIC ANTIBODY FRAGMENTS", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY - VCH VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 21, 1 October 1991 (1991-10-01),

pages 2431-2435, XP000647636, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/EJI.1830211020, the whole document

FOSSATI MARCO ET AL.: "Immunological changes in the ascites of cancer patients after intraperitoneal administration of the bispecific antibody catumaxomab (anti-EpCAManti-CD3)", GYNECOLOGIC ONCOLOGY, vol. 138, no. 2, 3 June 2015 (2015-06-03), pages 343-351, XP029249222, ISSN: 0090-8258, DOI: 10.1016/J.YGYNO.2015.06.003, the whole document

W. SCHAEFER ET AL.: "Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 108, no. 27, 20 June 2011 (2011-06-20), pages 11187-11192, XP055241993, US, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1019002108, the whole document

LI LI ET AL.: "A Novel Bispecific Antibody, S-Fab, Induces Potent Cancer Cell Killing", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 38, no. 9, 1 November 2015 (2015-11-01), pages 350-356, XP055319111, US, ISSN: 1524-9557, DOI: 10.1097/CJI.0000000000000099, the whole document

WO-A1-2015091738

WO-A1-2013184761

WO-A1-2010054212

WO-A1-2014051433

WO-A2-03026490

ALMAGRO JUAN C. ET AL.: "Humanization of antibodies", FRONTIERS IN BIOSCIENCE, FRONTIERS IN BIOSCIENCE, ALBERTSON, NY, US, vol. 13, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 1619-1633, XP009126790, ISSN: 1093-9946, page 1624, paragraph 4.1.2 - page 1625

BAEUERLE PATRICK A. ET AL.: "Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy", CANCER RESEARCH, AACR, US, PHILADELPHIA, PA, vol. 69, no. 12, 15 June 2009 (2009-06-15), pages 4941-4944, XP002665118, ISSN: 1538-7445, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0547 [retrieved on 2009-06-09], the whole document

(57) Изобретение относится к антителам, которые связываются с CD3 со слабой или недетектируемой аффинностью связывания, и способам их применения. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по изобретению связывают CD3 человека с низкой аффинностью и индуцируют пролиферацию Т-клеток человека и, следовательно, индуцируют опосредованный Т-клетками лизис опухолевых клеток с высокой эффективностью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данное изобретение предлагает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека со слабой или недетектируемой аффинностью связывания в анализе *in vitro*, и вторую антигенсвязывающую молекулу, которая

специфически связывает опухолеассоциированный антиген человека. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению способны ингибировать рост опухолей, экспрессирующих целевой антиген, такой как PSMA. Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы по изобретению пригодны для лечения заболеваний и расстройств, в которых повышенный или индуцированный целевой иммунный ответ является желательным и/или терапевтически полезным. Например, антитела по изобретению пригодны для лечения различных видов рака или других заболеваний, в которых иммунотерапия, т.е. иммуномодуляция эффекторных клеток, является оправданной.

040594 B1

040594 B1

Ссылка на перечень последовательностей

В данный документ включен посредством ссылки перечень последовательностей, представленный в машиночитаемой форме как файл 10151WO01_ST25.txt, созданный 22 сентября 2016 г., и содержащий 264418 байт.

Область техники

Изобретение относится к биспецифическим антителам, нацеленным на эффекторный антиген, такой как антиген CD3, и связанный с опухолью антиген, и к способам уничтожения опухолей. В данном изобретении предложены биспецифические антитела, содержащие эффекторное плечо, которое связывается с эффекторным антигеном со слабой аффинностью или с отсутствием детектируемой аффинности связывания, например анти-CD3-антигенсвязывающим плечом, которое связывается с CD3 с K_D более чем около 500 нМ, в анализе связывания аффинности *in vitro*.

Уровень техники

Потенциал терапевтических биспецифических антител (bsAb), в частности, в онкологических иммунотерапях направлен на объединение нескольких антигенных мишеней, для вызова более надежного врожденного иммунного ответа на нежелательные клетки-мишени или организм.

В настоящее время хорошо известно, что для опосредования перенаправленного лизиса bsAb должен сгруппировать целевую клетку непосредственно с иницирующей молекулой на эффекторной клетке, такой как Т-клетка. В конструировании bsAb есть много факторов, например размер и состав будут влиять на распределение и стабильность *in vivo* (Segal, D.M., Weiner, G.J., and Weiner, L.M.. *Current Opinion in Immunol.* 1999, 11:558-562; Chames, P. and Baty, D. *MAbs.* 2009, 1(6):539-547). Дифференциальные последствия трудно предсказать в зависимости от подмножества Т-клеток, которые срабатывают для ответа, а также состояния стимулируемой Т-клетки. Хорошо известно, что bsAb не обеспечивают согласованных результатов (Manzke O., et al. *Cancer Immunol. Immunother.* 1997, 45:198-202). Например, без адекватного продуцирования цитокинов перекрестное связывание CD3 может индуцировать апоптотический ответ в Т-клетке (Noel P.J., Boise L.H., Thompson C.B.: *Regulation of T cell activation by CD28 and CTLA4.* *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996, 406:209-217). Подмножество Т-клеток и состояние дифференцировки таких рекрутированных Т-клеток, например наивных Т-клеток, важно для эффективности, поскольку наивные Т-клетки не могут лизировать клетки-мишени без предварительной активации (такой как перекрестное связывание с TCR в присутствии IL-2).

Некоторые биспецифические методы лечения были успешными, однако, как и при многих методах лечения рака, они не обходятся без последствий. Токсичность является основной причиной неудачи среди терапии рака. Хорошо известно, что токсичность так называемых химиотерапевтических препаратов является основной причиной побочных эффектов пациентов и вторичных заболеваний. Акт "клеточного уничтожения" сам по себе связан с неприятностями для пациента. Множество цитотоксических ответов может быть вызвано путем активации эффекторных клеток, например Т-клеток и клеток-мишеней рака, но какой тип ответа наиболее полезен при опухолевой иммунотерапии, еще предстоит выяснить. Предпочтительным будет метод идентификации анти-CD3 антител для использования в биспецифической терапии, имеющей уменьшенные побочные эффекты, при сохранении эффективности и желательных фармакокинетических свойств (ПК).

Были описаны такие методики, как созревание аффинности, которые на основе соотношения структура/активность (SAR) используют мутагенез для оптимизации антител с увеличенной и улучшенной специфичностью связывания или аффинностью к целевому антигену по сравнению с исходным антителом (см., например, WO 2011/056997, опубликованную 12 мая 2011 г.). Были описаны модифицированные антитела ОКТ3, способные связываться и взаимодействовать с CD3 с различной степенью аффинности, при этом проявляя активацию Т-клеток от умеренной до высокой (US 7820166). Однако способы уменьшения аффинности связывания молекул антитела вблизи или за пределами обнаруживаемого уровня связывания не описаны и не продемонстрировано, что они обладают необходимой эффективностью для уменьшения или подавления опухоли.

Таким образом, существует потребность в альтернативных биспецифических антигенсвязывающих молекулах, обладающих контролируемой цитотоксичностью и лучшими ФК свойствами. Такая терапия рака будет весьма полезна в терапевтических условиях.

Краткое изложение сущности изобретения

В первом аспекте в данном изобретении предложены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD3 человека, имеющие слабую или не обнаруживаемую аффинность с CD3 человека и/или яванского макака. Антитела в соответствии с данным аспектом изобретения пригодны, в частности, для нацеливания на Т-клетки, экспрессирующие CD3, и для стимулирования активации Т-клеток, например, в условиях, когда лизис, опосредованный Т-клетками, является полезным или желательным. Анти-CD3 антитела по изобретению или их антигенсвязывающие части могут быть включены как часть биспецифического антитела, которое направляет активацию Т-клеток, опосредованную CD3, к конкретным типам клеток, таким как опухолевые клетки или инфекционные агенты.

Типичные анти-CD3 антитела по данному изобретению приведены в табл. 2 и 3 в данном документе. В табл. 2 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей

тяжелой цепи (HCVR), а также области определения комплементарности тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3). В табл. 3 приведены идентификаторы последовательности молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих области HCVR, HCDR1, HCDR2 и HCDR3 иллюстративных анти-CD3 антител. В табл. 4 и 5 приведены вариабельные области легкой цепи (LCVR), а также области определения комплементарности (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных анти-CD3 антител.

Данное изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 2, или по существу аналогичных им последовательностей, имеющих по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащих любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 2, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 4, или обычной легкой цепью, полученной из когнатной легкой цепи, тяжелой цепи анти-ТАА или полученной из вариабельной области известного или общедоступного домена легкой цепи, полученного из легкой цепи, проявляющей разнородность или способность спариваться с широким разнообразием некогнатных тяжелых цепей, т.е. универсальной или обычной легкой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данное изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных анти-CD3 антител, приведенных в табл. 2, в паре с иллюстративными вариабельными областями легкой цепи, приведенными в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10/162 (например, CD3-VH-G2); 18/162 (например, CD3-VH-G3); 26/162 (например, CD3-VH-G4); 34/162 (например, CD3-VH-G5); 42/162 (например, CD3-VH-G8); 50/162 (например, CD3-VH-G9); 58/162 (например, CD3-VH-G10); 66/162 (например, CD3-VH-G11); 74/162 (например, CD3-VH-G12); 82/162 (например, CD3-VH-G13); 90/162 (например, CD3-VH-G14); 98/162 (например, CD3-VH-G15); 106/162 (например, CD3-VH-G16); 114/162 (например, CD3-VH-G17); 122/162 (например, CD3-VH-G18); 130/162 (например, CD3-VH-G19); 138/162 (например, CD3-VH-G20) и 146/162 (например, CD3-VH-G21).

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в табл. 2, или по существу аналогичных последовательностей, имеющих по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности. Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 178.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в табл. 2, или по существу аналогичных последовательностей, имеющих по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности. Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 179.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в табл. 2, или по существу аналогичных последовательностей, имеющих по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности. Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 180.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в табл. 4, или по существу аналогичных последовательностей, имеющих по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности. Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), полученную из когнатной легкой цепи, тяжелой цепи анти-ТАА или полученную из легкой цепи, проявляющей разнородность или способность спариваться с широким разнообразием неприродных тяжелых цепей, т.е. универсальную или обычную легкую цепь.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в табл. 4, или по существу анало-

гичных последовательностей, имеющих по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности. Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), полученную из когнатной легкой цепи, тяжелой цепи анти-ТАА или полученную из легкой цепи, проявляющей разнородность или способность спариваться с широким разнообразием неприродных тяжелых цепей, т.е. универсальную или обычную легкую цепь.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в табл. 4, или по существу аналогичных последовательностей, имеющих по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности. Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), полученную из когнатной легкой цепи, тяжелой цепи анти-ТАА или полученную из легкой цепи, проявляющей разнородность или способность спариваться с широким разнообразием неприродных тяжелых цепей, т.е. универсальную или обычную легкую цепь.

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCDR3 и пару аминокислотных последовательностей LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в табл. 2, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3 приведенных в табл. 4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данное изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных анти-CD3 антител, приведенных в табл. 2. В некоторых вариантах осуществления пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16/168 (например, CD3-VH-G2); 24/168 (например, CD3-VH-G3); 32/168 (например, CD3-VH-G4); 40/168 (например, CD3-VH-G5); 48/168 (например, CD3-VH-G8); 56/168 (например, CD3-VH-G9); 64/168 (например, CD3-VH-G10); 72/168 (например, CD3-VH-G11); 80/168 (например, CD3-VH-G12); 88/168 (например, CD3-VH-G13); 96/168 (например, CD3-VH-G14); 104/168 (например, CD3-VH-G15); 112/168 (например, CD3-VH-G16); 120/168 (например, CD3-VH-G17); 128/168 (например, CD3-VH-G18); 136/168 (например, CD3-VH-G19); 144/168 (например, CD3-VH-G20) и 152/168 (например, CD3-VH-G21).

Данное изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом из иллюстративных анти-CD3 антител, приведенных в табл. 2 и 4. В некоторых вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12-14-16-164-166-168 (например, CD3-VH-G2); 20-22-24-164-166-168 (например, CD3-VH-G3); 28-30-32-164-166-168 (например, CD3-VH-G4); 36-38-40-164-166-168 (например, CD3-VH-G5); 44-46-48-164-166-168 (например, CD3-VH-G8); 52-54-56-164-166-168 (например, CD3-VH-G9); 60-62-64-164-166-168 (например, CD3-VH-G10); 68-70-72-164-166-168 (например, CD3-VH-G11); 76-78-80-164-166-168 (например, CD3-VH-G12); 84-86-88-164-166-168 (например, CD3-VH-G13); 92-94-96-164-166-168 (например, CD3-VH-G14); 100-102-104-164-166-168 (например, CD3-VH-G15); 108-110-112-164-166-168 (например, CD3-VH-G16); 116-118-120-164-166-168 (например, CD3-VH-G17); 124-126-128-164-166-168 (например, CD3-VH-G18); 132-134-136-164-166-168 (например, CD3-VH-G19); 140-142-144-164-166-168 (например, CD3-VH-G20) и 148-150-152-164-166-168 (например, CD3-VH-G21).

В связанном варианте осуществления данное изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено любым из иллюстративных анти-CD3 антител, приведенных в табл. 2 и 4. Например, данное изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10/162 (например, CD3-VH-G2); 18/162 (например, CD3-VH-G3); 26/162 (например, CD3-VH-G4); 34/162 (например, CD3-VH-G5); 42/162 (например, CD3-VH-G8); 50/162 (например, CD3-VH-G9); 58/162 (например, CD3-VH-G10); 66/162 (например, CD3-VH-G11); 74/162 (например, CD3-VH-G12); 82/162 (например, CD3-VH-G13); 90/162 (например, CD3-VH-G14); 98/162 (например, CD3-VH-G15); 106/162 (например, CD3-VH-G16); 114/162 (например, CD3-VH-G17); 122/162 (например, CD3-VH-G18); 130/162 (например, CD3-VH-G19); 138/162 (например, CD3-VH-G20) и 146/162 (например, CD3-VH-G21).

Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут быть использованы для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в данном документе. Типичные правила, которые могут использоваться для идентификации границ CDR, включают, например, определение по Kabat, определение по Chothia и определение по AbM. В общем случае определение по

Kabat основано на изменчивости последовательности, определение по Chothia основано на местоположении структурных петлевых областей, а определение по AbM является компромиссом между подходами Kabat и Chothia. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989). Публичные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR внутри антитела.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим анти-CD3 антитела или их части. Например, данное изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 3; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, приведенных в табл. 3, или по существу аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 4; или LCVR, полученную из когнатной легкой цепи, тяжелой цепи анти-ТАА или полученную из легкой цепи, проявляющей разнородность или способность спариваться с широким разнообразием неприродных тяжелых цепей, т.е. универсальную или обычную легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, приведенных в табл. 5, или по существу аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в табл. 2; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR1, приведенных в табл. 3, или по существу аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в табл. 2; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR2, приведенных в табл. 3, или по существу аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в табл. 2; в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR3, приведенных в табл. 3, или по существу аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в табл. 4; или LCDR1, полученную из когнатной легкой цепи, тяжелой цепи анти-ТАА или полученную из легкой цепи, проявляющей разнородность или способность спариваться с широким разнообразием неприродных тяжелых цепей, т.е. универсальную или обычную легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR1, приведенных в табл. 5, или по существу аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в табл. 4; или LCDR2, полученную из когнатной легкой цепи, тяжелой цепи анти-ТАА или полученную из легкой цепи, проявляющей разнородность или способность спариваться с широким разнообразием неприродных тяжелых цепей, т.е. универсальную или обычную легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR2, приведенных в табл. 5, или по существу аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в табл. 4; или LCDR3, полученную из когнатной легкой цепи анти-ТАА тяжелой цепи или полученную из легкой цепи, проявляющей разнородность или способность спариваться с широким разнообразием неприродных тяжелых цепей, т.е. универ-

сальную или обычную легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR3, приведенных в табл. 5, или по существу аналогичной последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, причем HCVR содержит набор из трех CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3), при этом набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено любым иллюстративным анти-CD3 антителом, приведенным в табл. 2.

В данном изобретении также представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, причем LCVR содержит набор из трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3), при этом набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено любым из примеров универсального антитела легкой цепи, приведенных в табл. 4; или LCDR1-LCDR2-LCDR3, полученный из когнатной легкой цепи анти-TAA тяжелой цепи или полученный из легкой цепи, проявляющей разнородность или способность спариваться с широким разнообразием неприродных тяжелых цепей, т.е. универсальную или обычную легкую цепь.

Данное изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, причем HCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 2, и при этом LCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 4; или LCVR получают из когнатной легкой цепи анти-TAA тяжелой цепи или получают из легкой цепи, проявляющей разнородность или способность спариваться с широким разнообразием неприродных тяжелых цепей, т.е. универсальную или обычную легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, приведенных в табл. 2, или по существу аналогичной ей последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности и полинуклеотидной последовательности, выбранной из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, приведенных в табл. 5, или по существу подобную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как HCVR, так и LCVR, являются полностью человеческими последовательностями или получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека.

Данное изобретение также относится к рекомбинантным экспрессирующим векторам, способным экспрессировать полипептид, содержащий переменный участок тяжелой или легкой цепи анти-CD3 антитела. Например, данное изобретение включает рекомбинантные экспрессирующие векторы, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, т.е. молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, как указано в табл. 2 или 4. Также в объем данного изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антитела или фрагменты антител, и восстановления антител и фрагментов антител, полученных таким образом.

Данное изобретение включает анти-CD3 антитела и/или анти-TAA антитела, а также биспецифические анти-CD3/анти-TAA антитела, имеющие модифицированный профиль гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования может быть полезна или антитело, лишенное фукозной части, присутствующей в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях можно модифицировать галактозилирование, чтобы модифицировать комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

В одном аспекте в изобретении предложена цитотоксическая композиция, содержащая биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая i) не способна специфически связываться с эффекторной клеткой и ii) специфически связывает целевую опухолевую клетку, причем специфическое связывание измеряется в *in vitro* FACS анализе связывания или *in vitro* анализе связывания на основе плазмонного резонанса. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к цитотоксической композиции, содержащей биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая не обнаруживает детектируемого связывания с эффекторной клеткой и которая специфически связывается с опухолевой клеткой-мишенью с измеряемой аффинностью связывания, причем значение аффинности связывания измеряется в *in vitro* FACS анализе связывания или *in vitro* анализе связывания на основе плазмонного резонанса.

В других вариантах осуществления изобретение относится к цитотоксической композиции, содержащей биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую i) первый антигенсвязывающий фрагмент (Fab1), который не обнаруживает связывания с CD3, и ii) второй антигенсвязывающий фрагмент

мент (Fab2), который специфически связывается с опухолевой клеткой-мишенью с измеримой аффинностью связывания, причем значение аффинности связывания измеряется в *in vitro* FACS анализе связывания или *in vitro* анализе связывания на основе плазмонного резонанса. В некоторых случаях аффинность связывания представляет собой моновалентную аффинность связывания (например, в конструкции биспецифического антитела).

В другом аспекте изобретение относится к цитотоксической композиции, содержащей биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывает эффекторную клетку со слабой аффинностью связывания, например, проявляющуюся значением EC_{50} около или выше чем около 100 нМ, и которая специфически связывает опухолевую клетку-мишень с заметным значением EC_{50} или высоким значением EC_{50} с высокой аффинностью, такой как менее 50 нМ, причем значение аффинности связывания EC_{50} измеряется в *in vitro* FACS анализе связывания. В некоторых аспектах изобретение относится к цитотоксической композиции, содержащей биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывает эффекторную клетку со значением EC_{50} выше чем около 500 нМ и которая специфически связывает опухолевую клетку-мишень с заметным значением EC_{50} или высоким значением EC_{50} с высокой аффинностью, такой как менее 50 нМ, причем значение аффинности связывания EC_{50} измеряется в *in vitro* FACS анализе связывания.

В некоторых примерах биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит Fab1, который специфически связывает CD3 человека с величиной EC_{50} более чем около 40 нМ или более чем около 100 нМ, более чем около 200 нМ, более чем около 300 нМ, более чем около 400 нМ, более чем около 500 нМ или более чем около 1 мкМ (например, в контексте моновалентного связывания). В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит Fab2, полученный из второго антитела, которое специфически связывает целевую опухолевую клетку с высокой аффинностью, например, значение EC_{50} менее чем около 50 нМ, менее чем около 40 нМ, менее чем около 20 нМ, менее чем около 10 нМ или менее чем около 6 нМ (например, в контексте моновалентного связывания). В некоторых случаях Fab1 специфически связывает каждый из CD3 человека и CD3 яванского макака с величиной EC_{50} более чем около 40 нМ или более чем около 100 нМ, более чем около 200 нМ или более чем около 1 мкМ. В некоторых случаях Fab1 специфически связывает каждый из CD3 человека и CD3 яванского макака со слабой или неизмеримой аффинностью.

В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка-мишень представляет собой опухолевую клетку человека. В некоторых вариантах осуществления Fab1 (или биспецифическая антигенсвязывающая молекула) индуцирует опосредованный Т-клетками лизис опухолевых клеток с величиной EC_{50} , равной менее чем около 1,3 нМ, как измерено в анализе опосредованного Т-клетками лизиса опухолевых клеток *in vitro*.

В некоторых применениях Fab1 или биспецифическая антигенсвязывающая молекула специфически связывает CD3 человека с величиной K_D более чем около 11 нМ, как измерено в анализе связывания *in vitro* на основе поверхностного плазмонного резонанса. В других случаях Fab1 или биспецифическая антигенсвязывающая молекула специфически связывает каждый из CD3 человека и CD3 яванского макака с величиной K_D более чем около 15 нМ или более чем около 30 нМ, более чем около 60 нМ, более чем около 120 нМ или более чем около 300 нМ, как измерено в анализе связывания *in vitro* на основе поверхностного плазмонного резонанса. В еще некоторых применениях Fab1 или биспецифическая антигенсвязывающая молекула i) не обнаруживает обнаруживаемого связывания с CD3 человека, как измерено в каждом из анализа связывания *in vitro* на основе поверхностного плазмонного резонанса и FACS анализа связывания, и ii) индуцирует Т-клеточно-опосредованный лизис опухолевых клеток, как измерено в анализе опосредованного Т-клетками лизиса опухолевых клеток *in vitro*.

В некоторых применениях биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первую тяжелую цепь, содержащую область HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12 или 20. В некоторых вариантах осуществления первая тяжелая цепь содержит область HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14 или 54. В других вариантах осуществления первая тяжелая цепь содержит область HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 144 или SEQ ID NO: 152. В других применениях первая тяжелая цепь содержит HCVR, содержащую HCDR1-HCDR2-HCDR3, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 178-179-180. В других вариантах осуществления первая тяжелая цепь содержит CDR1, содержащую аминокислотные остатки 1-7 SEQ ID NO: 178, CDR2, содержащую аминокислотные остатки 1-7 SEQ ID NO: 179, CDR3, содержащую аминокислотные остатки 4-11 SEQ ID NO: 180.

В других вариантах осуществления первая тяжелая цепь содержит каркасные области варибельного домена, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из FR1 (SEQ ID NO: 174), FR2 (SEQ ID NO: 175), FR3 (SEQ ID NO: 176) и FR4 (SEQ ID NO: 177).

Данное изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, содержащим

пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR Fab1 (HCVR/LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10/162; 18/162; 26/162; 34/162; 42/162; 50/162; 58/162; 66/162; 74/162; 82/162; 90/162; 98/162; 106/162; 114/162; 122/162; 130/162; 138/162; 146/162.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты и их биспецифические антитела были получены путем замены аминокислотных остатков родительского антитела поэтапно на основе различий между последовательностью зародышевой линии и последовательностью родительского антитела. Данное изобретение относится к способу получения цитотоксической композиции, включающему (а) идентификацию аминокислотной последовательности первой тяжелой цепи, полученной из первого антитела, которая специфически связывается с CD3 с высокой аффинностью, например имеет значение EC_{50} аффинности связывания менее чем около 40 нМ; (b) модифицирование выбранных аминокислотных остатков в варибельной области тяжелой цепи первого антитела с получением модифицированного антитела; (c) спаривание модифицированного антитела со второй тяжелой цепью, полученной из второго антитела, которое специфически связывает целевой опухолевый антиген для получения биспецифического антитела; (d) тестирование биспецифического антитела в анализе аффинности связывания, и, если аффинность связывания с CD3 имеет значение EC_{50} более чем около 40 нМ, или более чем около 100 нМ или более чем около 300 нМ или более чем около 500 нМ или не обнаруживаемое связывание, затем (e) получение композиции, содержащей биспецифическое антитело и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В дополнение к модификации варибельной области тяжелой цепи выбранных антител для разработки антигенсвязывающих плеч, обладающих слабой или отсутствующей аффинностью, но специально нацеленным на эффекторную клетку, данное изобретение предоставляет способы для модификации константной области тяжелой цепи (например, домена C_{H3}) каждого связывающего плеча связующая для подготовки и выделения биспецифических антител.

Иллюстративный способ обеспечивает способ получения цитотоксического биспецифического антитела, включающий (а) идентификацию первого антитела человека или его антигенсвязывающего фрагмента, который взаимодействует с эффекторным клеточным антигеном от нескольких видов; (b) идентификацию аминокислотных остатков зародышевой линии варибельной области тяжелой цепи (HCVR) антитела человека; (c) сравнение аминокислотной последовательности HCVR первого антитела человека с аминокислотной последовательностью соответствующей зародышевой линии HCVR; (d) идентификацию аминокислот в модифицированной области HCVR первого антитела, при этом модифицированная область в первом антителе проявляет по меньшей мере одну аминокислотную модификацию путем замещения, делеции или добавления одного аминокислотного остатка по сравнению с той же областью в зародышевой линии HCVR; (e) продуцирование множества модифицированных антител, каждое из которых содержит по меньшей мере одну модифицированную область HCVR; (f) скрининг каждого из множества модифицированных антител на моновалентную аффинность к антигену эффекторной клетки; (g) выбор тех модифицированных антител, которые проявляют более слабую аффинность связывания или не обнаруживают аффинность связывания с антигеном эффекторной клетки по сравнению с первым антителом; и (h) спаривание выбранного первого антитела со вторым антителом, которое взаимодействует с опухолеассоциированным антигеном с получением цитотоксического биспецифического антитела.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантное биспецифическое антитело человека или его фрагмент, который специфически связывает CD3, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-CD3 антитела и второго терапевтического агента. В одном варианте осуществления второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который преимущественно объединяется с анти-CD3 антителом. Типичные агенты, которые могут быть выгодно объединены с анти-CD3 антителом, включают, без ограничения, другие агенты, которые связывают и/или активируют сигналинг CD3 (включая другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и т.д.) и/или агенты, которые непосредственно не связывают CD3, но тем не менее активируют или стимулируют активацию иммунных клеток. Дополнительные комбинированные способы лечения и совместные препараты, включающие анти-CD3 антитела по данному изобретению, раскрыты в данном документе в другом месте.

В еще одном аспекте изобретение предлагает терапевтические способы стимуляции активации Т-клеток с использованием анти-CD3 антитела или антигенсвязывающей части антитела по изобретению, причем терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент субъекту, нуждающемуся в этом. Нарушение, подвергнутое лечению, представляет собой любое заболевание или состояние, которое улучшается, облегчается, ингибируется или предотвращается посредством цитотоксической терапии, нацеленной на опухолеассоциированный антиген, такое как рак.

В соответствии с другим аспектом данное изобретение относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые связывают CD3 и целевой антиген, особенно опухолеассоциированный антиген (ТАА).

Данное изобретение также включает применение анти-CD3/анти-ТАА биспецифической антигенсвязывающей молекулы по изобретению при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией ТАА или вызванного его экспрессией. Данное изобретение также относится к применению анти-CD3/анти-ТАА биспецифической антигенсвязывающей молекулы, проявляющей слабую аффинность к CD3-экспрессирующим эффекторным клеткам и уменьшенный клиренс при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с или вызванного экспрессией ТАА, по сравнению с анти-CD3/анти-ТАА биспецифической антигенсвязывающей молекулы, проявляющей, высокую аффинность к CD3-экспрессирующим эффекторным клеткам.

Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлено выравнивание аминокислот следующих последовательностей варибельной области тяжелой цепи (HCVR) антитела: зародышевая линия hIgHV (SEQ ID NO: 181); CD3-VH-P (SEQ ID NO: 154); CD3-VH-G (SEQ ID NO: 2); CD3-VH-G2 (SEQ ID NO: 10); CD3-VH-G3 (SEQ ID NO: 18); CD3-VH-G4 (SEQ ID NO: 26); CD3-VH-G5 (SEQ ID NO: 34); CD3-VH-G8 (SEQ ID NO: 42); CD3-VH-G9 (SEQ ID NO: 50); CD3-VH-G10 (SEQ ID NO: 58); CD3-VH-G11 (SEQ ID NO: 66); CD3-VH-G12 (SEQ ID NO: 74); CD3-VH-G13 (SEQ ID NO: 82); CD3-VH-G14 (SEQ ID NO: 90); CD3-VH-G15 (SEQ ID NO: 98); CD3-VH-G16 (SEQ ID NO: 106); CD3-VH-G17 (SEQ ID NO: 114); CD3-VH-G18 (SEQ ID NO: 122); CD3-VH-G19 (SEQ ID NO: 130); CD3-VH-G20 (SEQ ID NO: 138) и CD3-VH-G21 (SEQ ID NO: 146). Каждую производную HCVR сравнивают с исходным антителом и аминокислотными остатками зародышевой линии, с прямоугольными блоками, обозначающими мутации в CDR.

На фиг. 2A-2C представлены средние концентрации общего IgG в сыворотке после однократной внутривенной инъекции 0,4 мг/кг BSMUC16/CD3-001, BSMUC16/CD3-005 и антител изотипического контроля у мышей дикого типа (фиг. 2A), CD3 гуманизированных мышей (фиг. 2B) и MUC16хCD3 гуманизированных мышей (фиг. 2C).

Подробное описание

До того, как будет описано данное изобретение, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Следует также понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем данного изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Используемый в данном документе термин "около" при использовании в отношении конкретного указанного числового значения означает, что значение может отличаться от указанного значения не более чем на 1%. Например, используемое в данном документе выражение "около 100" включает в себя 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы в практике или испытаниях данного изобретения, далее описаны предпочтительные способы и материалы.

Определения

Выражение "CD3" относится к антигену, который экспрессируется на Т-клетках как часть многомолекулярного рецептора Т-клеток (TCR) и который состоит из гомодимера или гетеродимера, образованного из ассоциации двух из четырех рецепторных цепей: CD3-эпсилон, CD3-дельта, CD3-дзета и CD3-гамма.

CD3-эпсилон человека (hCD3ε) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 169 (UniProtKB/Swiss-Prot: P07766.2). CD3-дельта человека (hCD3δ) содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 170 (UniProtKB/Swiss-Prot: P04234.1). Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в данном документе предназначены для обозначения человеческой версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они относятся к видам, отличным от человека. Таким образом, выражение "CD3" означает CD3 человека, если не указано, что оно относится к видам, отличным от человека, например "CD3 мыши", "CD3 обезьяны" и т.д.

Фраза "антитело, которое связывает CD3" или "анти-CD3 антитело" включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают и связываются с одной субъединицей CD3 (например, эпсилон, дельта, гамма или дзета), а также антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически распознают и связываются с димерным комплексом двух субъединиц CD3 (например, димеры эпсилон/дельта, эпсилон/гамма и дзета/дзета CD3). Антитела и антигенсвязывающие

вающие фрагменты по данному изобретению могут связывать растворимый CD3, связанный CD3 и/или клеточную поверхность, экспрессирующую CD3. Растворимый CD3 включает природные белки CD3, а также варианты рекомбинантного белка CD3, такие как, например, мономерные и димерные конструкции CD3, которые не имеют трансмембранного домена или иначе не связаны с клеточной мембраной. Данное изобретение относится к антителам, которые связывают и активируют CD3 человека и яванского макака со слабой или недетектируемой аффинностью связывания. "Связывание с CD3 с недетектируемой аффинностью связывания" означает, что взаимодействие антитела и/или антигенсвязывающего фрагмента с мишенью CD3 может не поддаваться измерению или обнаружению с помощью известного анализа для определения, такого как FACS анализ связывания (на основе клеток), описанный в данном документе, или анализ связывания на основе поверхностного плазмонного резонанса, описанный в данном документе и хорошо известный в данной области техники. Другие анализы связывания хорошо известны в данной области техники. Антитело и/или антигенсвязывающий фрагмент могут распознавать мишень CD3 посредством очень слабого белок-белкового биохимического взаимодействия, однако определение конкретного значения K_D или EC_{50} не может быть измерено, так как взаимодействие выходит за пределы обнаружения анализа, например не может быть проведено измерение. В другом случае "отсутствие определяемой аффинности связывания" определяется, если аффинность антитела, соответствующая значению K_D , равна или меньше чем в 10 раз ниже, чем неспецифический антиген, такой как БСА, казеин или т.п. "Связывание с CD3 со слабой аффинностью связывания" включает взаимодействия, в которых измерение аффинности связывания находится на уровне или немного превышает предел обнаружения анализа или эквивалентно аффинности связывания с неспецифическим антигеном.

Выражение "CD3, экспрессируемый на поверхности клетки" означает один или более белков CD3, которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo*, так что по меньшей мере часть белка CD3 располагается на внеклеточной стороне клеточной мембраны и доступна для антигенсвязывающей части антитела. "CD3, экспрессируемый на поверхности клетки" включает белки CD3, содержащиеся в контексте функционального рецептора Т-клеток в мембране клетки. Выражение "CD3, экспрессируемый на поверхности клетки" включает белок CD3, экспрессируемый как часть гомодимера или гетеродимера на поверхности клетки (например, димеры CD3 дельта/эпсилон, гамма/эпсилон и дзета/дзета). Выражение "CD3, экспрессируемый на поверхности клетки" также включает цепь CD3 (например, CD3-дельта, CD3-эпсилон или CD3-гамма), которая экспрессируется сама по себе без других типов цепи CD3 на поверхности клетки. "CD3, экспрессируемый на поверхности клетки" может содержать или состоять из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок CD3. В качестве альтернативы "CD3, экспрессируемый на поверхности клетки" может содержать или состоять из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно не экспрессирует CD3 человека на своей поверхности, но искусственно сконструирована для экспрессии CD3 на ее поверхности.

К эффекторным клеткам относятся эффекторные Т-клетки (Т-лимфоциты), например $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, Th1, Th2 и регуляторные Т-клетки (Tregs). Эффекторные клетки могут также включать клетки естественных киллеров (NK), макрофаги, гранулоциты, плазматические клетки или В-клетки (лимфоциты). Понятно, что терапия может опосредовать множество клеточных иммунных реакций или эффекторных функций посредством взаимодействия Ig с эффекторными поверхностными рецепторами, такими как CD3 (рецептор поверхности Т-клеток), CD28 (Т-клетки), рецепторы Fc γ (Fc γ Rs) (NK-клетки, активированные макрофаги и т.п.). В результате этих взаимодействий активируются эффекторные функции, такие как лизис клеток, активация комплемента, фагоцитоз и опсонизация. Связывание с эффекторной клеткой и клеткой-мишенью опухоли позволяет получить ценный и эффективный дизайн иммунотерапии, который распространяется на лизис опухолевых клеток и индуцирует эндогенные иммунные функции для борьбы с опухолью или раком.

Выражение "анти-CD3 антитело" включает как одновалентные антитела с одной специфичностью, так и биспецифические антитела, содержащие первое плечо, которое связывает CD3, и второе плечо, которое связывает второй (целевой) антиген, в которых плечо анти-CD3 содержит любые последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленные в табл. 2-4 и/или 5 в данном документе. Примеры биспецифических анти-CD3 антител описаны в других местах в данном документе. Термин "антигенсвязывающая молекула" включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифические антитела.

Термин "антитело" включает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну область определения комплементарности (CDR), которая специфически связывается с определенным антигеном или взаимодействует с ним (например, CD3). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь включает переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов - C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи (сокращенно обозначенный как LCVR или V_L) и константную область лег-

кой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_L1). Области V_H и V_L могут быть далее подразделены на области с гипервариабельностью, называемые областями, определяющими комплементарность ("CDR"), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями ("FR"). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения FR анти-CD3 антитела (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным путем или искусственно. Консенсусная последовательность аминокислот может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

Термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой природный, ферментативно доступный синтетический или генетически модифицированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген, чтобы образовать комплекс. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генной инженерии, включающие манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаговых антител) или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с использованием методик молекулярной биологии, например, для организации одного или более вариабельных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты $F(ab')_2$; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную область определения комплементарности (CDR), такую как CDR3-пептид) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как специфичные для домена антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленными доменами, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, мини-антитела, наночастицы (например, моновалентные наночастицы, двухвалентные наночастицы и т.д.), небольшие модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP) и вариабельные акульи домены IgNAR, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", используемый в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или аминокислотную композицию и, как правило, содержать по меньшей мере один CDR, который примыкает или находится в связке с одной или более последовательностями каркаса. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любой подходящей компоновке. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный, по меньшей мере, с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые могут быть найдены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по данному изобретению, включают (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая любую из приведенных выше иллюстративных конфигураций, вариабельные и константные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые приводят к гибкой или полугибкой связи между соседними вариабельными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по данному изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций вариабельных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной связи(ей)).

Как и в случае с полными молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими).

Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере два разных вариабельных домена, причем каждый вариабельный домен способен специфиче-

ски связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на том же антигене. Любой формат мультиспецифических антител, включая описанные в данном документе иллюстративные форматы биспецифических антител, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по данному изобретению с использованием обычных методик, доступных в данной области техники.

Антитела по данному изобретению могут функционировать через комплементзависимую цитотоксичность (CDC) или антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ). "Комплементзависимая цитотоксичность" (CDC) относится к лизису экспрессирующих антиген клеток антителом по изобретению в присутствии комплемента. "Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" (АЗКЦ) относится к реакции, опосредованной клетками, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, клетки естественные киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и, таким образом, приводит к лизису клетки-мишени. CDC и АЗКЦ могут быть измерены с использованием анализов, которые хорошо известны и доступны в данной области техники. (См., например, патенты США № 5500362 и 5821337 и Clynes et al. (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 95:652-656). Константная область антитела имеет важное значение в способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточно-зависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основе того, желательно ли, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-CD3 антитела по изобретению (моноспецифическое или биспецифическое) представляют собой антитела человека.

Используемый в данном документе термин "антитело человека" предназначен для включения антител, имеющих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человека зародышевой линии (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин "антитело человека", используемый в данном документе, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR получены из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на последовательности каркаса человека.

Термин "рекомбинантное антитело человека" предназначен для включения всех антител человека, которые получены, экспрессируются, создаются или выделяются рекомбинантными средствами, такими как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (описанную далее), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека (описанную далее), антитела, выделенные от животного (например, мыши), который является трансгенным для генов иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992), Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используется трансгенное животное для человеческих Ig-последовательностей, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, следовательно, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантного антитела представляют собой последовательности, которые, будучи производными и связанными с последовательностями V_H и V_L зародышевой линии человека, необязательно естественным образом существуют в репертуаре зародышевой линии антитела человека *in vivo*.

Антитела человека могут существовать в двух формах, которые связаны с неоднородностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию, содержащую приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью. Во второй форме димеры не связаны через межцепочечные дисульфидные связи, и образуется молекула около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанной легкой и тяжелой цепи (полуантитела). Эти формы чрезвычайно трудно отделить даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена, но не ограничивается ими, структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Единственное замещение аминокислоты в шарнирной области шарнира IgG4 человека может значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al. (1993), Molecular Immunology, 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнира IgG1 человека. Данное изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнирной области, C_H2 или C_H3 , которая может быть желательной, например, в производстве, для улучшения выхода желаемой формы антитела.

Антитела по изобретению могут представлять собой выделенные антитела. "Изолированное антитело", используемое в данном документе, означает антитело, которое было идентифицировано и выделено и/или восстановлено по меньшей мере из одного компонента его естественной среды. Например, ан-

титело, которое было выделено или удалено по меньшей мере из одного компонента организма или из ткани или клетки, в которой антитело естественным образом существует или является естественно продуцированным, является "выделенным антителом" для целей данного изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенное антитело может быть по существу свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Данное изобретение также включает одноплечевые антитела, которые связывают CD3. Фраза "одноплечевое антитело" означает антигенсвязывающую молекулу, содержащую тяжелую цепь одного антитела и легкую цепь одного антитела. Одноплечевые антитела по данному изобретению могут содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, указанных в табл. 2 в данном документе.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания антигена в варибельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой тот, что получен смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может содержать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда речь идет о нуклеиновой кислоте или ее фрагменте, указывает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными инсерциями или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) существует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере около 95% и более предпочтительно по меньшей мере около 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, как измерено любым известным алгоритмом идентичности последовательности, таким как FASTA, BLAST или Gap, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, в некоторых случаях может кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу подобную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

В применении к полипептидам термин "существенное сходство" или "по существу аналогичный" означает, что две последовательности пептидов при оптимальном выравнивании, таком как программы GAP или BESTFIT с использованием разностных масс по умолчанию, имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности, еще более предпочтительно не менее 98 или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не идентичны, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой ту, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена не будет существенно изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентная идентичность последовательности или степень сходства могут быть скорректированы вверх, чтобы исправить консервативный характер замещения. Средства для осуществления этой регулировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994), *Methods Mol. Biol.* 24:307-331. Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и (7) серосодержащие боковые цепи представляют собой цистеин и метионин. Предпочтительными консервативными аминокислотными замещающими группами являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992), *Science*, 256:1443-1445. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также упоминается как идентичность последовательности, обычно измеряется с использованием программного обеспечения для анализа последовательности. Программное обеспечение для анализа белка соответствует аналогичным последовательностям, используя меры сходства, назначенные для различных замещений, делеций и других модификаций, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG включает такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут использоваться с параметрами по умолча-

нию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательностей между близкими родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнить с использованием FASTA с применением стандартных или рекомендованных параметров, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между поисковыми последовательностями (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности изобретения с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997), *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

Мутации зародышевой линии.

Представленные в данном документе анти-CD3 антитела содержат одну или более аминокислотных замен, инсерций и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела.

Данное изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, причем одна или более аминокислот в одной или более каркасных и/или CDR-областях является мутированной в соответствующем остатке(ах) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующем остатке(ах) другой последовательности зародышевой линии человека или в консервативной аминокислотной замене соответствующего зародышевого остатка(ов) (такие изменения последовательности упоминаются в данном документе в совокупности как "зародышевые мутации") и со слабым или отсутствующим детектируемым связыванием с антигеном CD3. Несколько таких иллюстративных антител, которые распознают CD3, описаны в табл. 2 в данном документе.

Кроме того, антитела по данному изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в рамках каркасных и/или CDR-областей, например, где определенные отдельные остатки мутируют в соответствующем остатке определенной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые различаются из исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или мутируют с соответствующим остатком другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть испытаны на одно или более желаемых свойств, таких как улучшенная связывающая специфичность, слабая или уменьшенная аффинность связывания, улучшенные или повышенные фармакокинетические свойства, снижение иммуногенности и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные в этом общем виде, с учетом руководства данного изобретения охватываются в данном изобретении.

Данное изобретение также включает анти-CD3 антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе, имеющих одну или более консервативных замен. Например, данное изобретение включает анти-CD3 антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами по сравнению с любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в табл. 2 в данном документе. Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению включают одну или более аминокислотных замен, инсерций и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены индивидуальные антигенсвязывающие домены, при сохранении или улучшении желаемого обнаруживаемого связывания с антигеном CD3. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой ту, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная замена аминокислоты не будет существенно изменять функциональные свойства белка, т.е. аминокислотная замена поддерживает или улучшает желаемую слабую и не обнаруживаемую аффинность связывания в случае анти-CD3-связывающих молекул. Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспарат и глутамат и (7) серосодержащие боковые цепи представляют собой цистеин и метионин. Предпочтительными консервативными аминокислотными замещающими группами являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспарат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al.

(1992), *Science*, 256:1443-1445. "Умеренно консервативной" заменой является любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Данное изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен с HCVR и/или CDR-аминокислотной последовательностью, которая по существу идентична любой из аминокислотных последовательностей HCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, при сохранении или улучшении желаемого слабого сродства к антигену CD3. Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда речь идет об аминокислотной последовательности, означает, что две аминокислотные последовательности при оптимальном выравнивании, таком как программы GAP или BESTFIT с использованием разностных масс по умолчанию, имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности, еще более предпочтительно не менее 98 или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не идентичны, отличаются консервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, процентная идентичность последовательности или степень сродства могут быть скорректированы вверх, чтобы исправить консервативный характер замещения. Средства для осуществления этой регулировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994), *Methods Mol. Biol.* 24:307-331.

Сходство последовательностей для полипептидов, которое также упоминается как идентичность последовательности, обычно измеряется с использованием программного обеспечения для анализа последовательности. Программное обеспечение для анализа белка соответствует аналогичным последовательностям, используя меры сходства, назначенные для различных замещений, делеций и других модификаций, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG включает такие программы, как Gap и Bestfit, которые могут использоваться с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательности или идентичности последовательностей между близкими родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнить с использованием FASTA с применением стандартных или рекомендованных параметров, программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между поисковыми последовательностями (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности изобретения с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997), *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

После получения антигенсвязывающие домены, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, испытывали на снижение аффинности связывания с использованием одного или более анализов *in vitro*. Хотя антитела, которые распознают конкретный антиген, обычно скринируют путем тестирования на высокую (т.е. сильную) аффинность связывания с антигеном, антитела по данному изобретению проявляют слабое связывание или отсутствие обнаружимого связывания. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученных в этом общем способе, также охватываются в рамках данного изобретения и, как было установлено, являются предпочтительными, как терапия опухолей, вызванная авидностью.

Неожиданные преимущества, например улучшенные фармакокинетические свойства и низкая токсичность для пациента, могут быть реализованы из описанных в данном документе способов.

Связывающие свойства антител.

Используемый в данном документе термин "связывание" в контексте связывания антитела, иммуноглобулина, связывающего фрагмента антитела или Fc-содержащего белка с любым, например с заданным, антигеном, таким как белок клеточной поверхности или его фрагмент, обычно относится к взаимодействию или ассоциации минимум между двумя объектами или молекулярными структурами, такими как взаимодействие антитело-антиген.

Например, аффинность связывания обычно соответствует значению K_D около 10^{-7} М или менее, например, около 10^{-8} М или менее, например, около 10^{-9} М или менее, когда определяется, например, поверхностным плазмонным резонансом (SPR) на приборе Biacore 3000 с использованием антигена в качестве лиганда и антитела, Ig, связывающего антитело фрагмента или Fc-содержащего белка в качестве аналита (или антилиганда). Также широко используются стратегии связывания на основе клеток, такие как анализы связывания с помощью проточной цитометрии (FACS), и данные FACS хорошо коррелируют с другими методами, такими как связывание с радиолигандами и SPR (Benedict, C.A., *J. Immunol. Methods.* 1997, 201(2):223-31; Geuijjen, C.A., et al. *J. Immunol. Methods.* 2005, 302(1-2):68-77).

Соответственно, антитело или антигенсвязывающий белок по изобретению могут связываться с предопределенным антигеном или молекулой поверхности клетки (рецептором, таким как CD3), имеющим сродство, соответствующее значению K_D , которое по меньшей мере в 10 раз ниже его аффинности связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеин). В соответствии с данным изобретением, если аффинность антитела, соответствующая значению K_D , равна или менее чем в 10 раз ниже, чем

неспецифический антиген, это можно рассматривать как не подлежащее определению связывание, однако такое антитело может быть спаренным со вторым антигенсвязывающим плечом для получения биспецифического антитела по изобретению.

Термин " K_D " (M) относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или константе равновесия диссоциации антитела или фрагмента связывающего антитело, связывающегося с антигеном. Существует обратная связь между K_D и аффинностью связывания, поэтому чем меньше значение K_D , тем выше, т.е. сильнее, сродство. Таким образом, термины "более высокая аффинность" или "более сильная аффинность" относятся к более высокой способности образовывать взаимодействие и, следовательно, к меньшему значению K_D , и, наоборот, термины "низкая аффинность" или "более слабая аффинность" относятся к более низкой способности образовывать взаимодействие и, следовательно, большему значению K_D . В некоторых случаях более высокая аффинность связывания (или K_D) конкретной молекулы (например, антитела) к ее интерактивной молекуле партнеру (например, антиген X) по сравнению с аффинностью связывания молекулы (например, антителом) с другой интерактивной молекулой партнером (например, антиген Y) можно выразить как коэффициент связывания, определяемый делением большего значения K_D (более низкой или более слабой аффинности) на меньший K_D (более высокую или более сильную аффинность), например, выраженное как 5-кратное или 10-кратное большее связывание в зависимости от обстоятельств. Например, "низкая аффинность" относится к менее сильному связыванию. В некоторых вариантах осуществления низкая аффинность связывания соответствует большей чем около 1 нМ K_D , большей чем около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 или большей чем около 40 нМ K_D , причем такие K_D аффинности связывания измеряются в анализе *in vitro* связывания на основе плазмонного резонанса или в анализе чувствительности к биомолекулярному взаимодействию. В некоторых вариантах осуществления низкая аффинность связывания соответствует более чем около 10 нМ EC_{50} , более чем около 15 нМ EC_{50} , 20 нМ EC_{50} , более чем около 25 нМ EC_{50} , 30 нМ EC_{50} , более чем около 35 нМ EC_{50} или более чем около 40 нМ EC_{50} , причем такое значение аффинности связывания EC_{50} измеряется в *in vitro* FACS анализе связывания или эквивалентном анализе связывания на основе клеток. "Слабая аффинность" относится к слабому связывающему взаимодействию. В некоторых вариантах осуществления слабая аффинность связывания соответствует более чем около 100 нМ K_D или EC_{50} , более чем около 200, 300 или более чем около 500 нМ K_D или EC_{50} , причем такое значение аффинности связывания K_D измеряется в *in vitro* анализе на основе поверхностного плазмонного резонансного связывания или эквивалентном анализе чувствительности к биомолекулярному взаимодействию, и такое значение аффинности связывания с EC_{50} измеряют в FACS анализе связывания *in vitro* или в эквивалентном анализе обнаружения взаимодействия на основе клеток для обнаружения моновалентного связывания. Недетектируемое связывание означает, что аффинность между двумя биомолекулами, например особенно между связывающим плечом моновалентного антитела и его целевым антигеном, превышает пределы обнаружения используемого анализа.

Термин " k_d " (s^{-1} или $1/s$) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или константе скорости диссоциации антитела или фрагмента связывающего антитела. Указанное значение также упоминается как значение k_{off} .

Термин " k_a " ($M^{-1} \times s^{-1}$ или $1/M$) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или константе скорости ассоциации антитела или фрагмента связывающего антитела.

Термин " k_a " (M^{-1} или $1/M$) относится к равновесной константе ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или равновесной константе ассоциации антитела или фрагмента связывающего антитела. Константа равновесия ассоциации получается путем деления k_a на k_d .

Термин " EC_{50} " относится к половине максимальной эффективной концентрации, которая включает концентрацию антитела, которая вызывает ответ на полпути между базовой линией и максимумом после определенного времени воздействия. EC_{50} по существу представляет концентрацию антитела, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта. В некоторых вариантах осуществления значение EC_{50} равно концентрации антитела по изобретению, которая обеспечивает полумаксимальное связывание с клетками, экспрессирующими CD3 или ассоциированный с опухолью антиген, как определено, например, в FACS анализе связывания.

Таким образом, сниженное или более слабое связывание наблюдается с увеличенным значением EC_{50} или половинной максимальной эффективной концентрационной величиной, так что 500 нМ EC_{50} указывает на более слабую аффинность связывания, чем 50 нМ EC_{50} .

В одном варианте осуществления снижение связывания может быть определено как повышенная концентрация EC_{50} антитела, которая позволяет связываться с полумаксимальным количеством клеток-мишеней.

В других экспериментальных измерениях значение EC_{50} представляет собой концентрацию антитела по изобретению, которая вызывает полумаксимальное истощение клеток-мишеней посредством цитотоксической активности Т-клеток. Таким образом, повышенная цитотоксическая активность (например, лизис опухолевых клеток, опосредуемый Т-клетками) наблюдается с уменьшением значения EC_{50} или половиной максимальной эффективной концентрации.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы.

Антитела по данному изобретению могут быть биспецифическими или мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфическими для одной эффекторной молекулы, такой как CD3, в комбинации с различными эпитопами одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные для более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Анти-CD3 антитела по данному изобретению могут быть связаны или ко-экспрессированы с другой функциональной молекулой, например, с другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, посредством химической связи, генетического синтеза, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другим молекулярным объектом, такими как другое антитело или фрагмент антитела для получения биспецифического или мультиспецифического антитела со второй связывающей специфичностью.

Используемое в данном документе выражение "анти-CD3 антитело" предназначено для включения как моноспецифических анти-CD3 антител, так и биспецифических антител, содержащих CD3-связывающее плечо и второе плечо, которое связывает целевой антиген. Таким образом, данное изобретение включает биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывается с CD3 человека, а другое плечо иммуноглобулина является специфичным для целевого антигена. Целевым антигеном, который связывается с другим плечом биспецифического анти-CD3 антитела, может быть любой антиген, экспрессируемый на или вблизи клетки, ткани, органа, микроорганизма или вируса, против которого требуется целевой иммунный ответ. CD3-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR или CDR, указанных в табл. 2 в данном документе. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо слабо связывается с CD3 человека и индуцирует активацию Т-клеток человека. В других вариантах осуществления CD3-связывающее плечо слабо связывается с CD3 человека и индуцирует опухолеассоциированный антиген-экспрессирующий клеточный лизис в контексте биспецифического или мультиспецифического антитела. В других вариантах осуществления CD3-связывающее плечо связывается или ассоциируется слабо с CD3 человека и яванского макака (обезьяна), но взаимодействие связывания не обнаруживается с помощью анализов *in vitro*, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления изобретения CD3-связывающее плечо не связывает или ассоциируется с CD3 человека и яванского макака (обезьяна), но биспецифическая молекула все еще вызывает опухолеассоциированный лизис клеток.

В контексте биспецифических антител по данному изобретению, в которых одно плечо антитела связывает CD3, а другое плечо связывает целевой антиген, целевой антиген может представлять собой опухолеассоциированный антиген (ТАА). Неограничивающие примеры специфических опухолеассоциированных антигенов включают, например, AFP, ALK, белки BAGE, BIRC5 (сурвивин), BIRC7, β -катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразу IX, каспазу-8, CALR, CCR5, CD19, CD20 (MS4A1), CD22, CD30, CD40, CDK4, CEА, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, белки GAGE (например, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, белки MAGE (например, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 и -12), MART-1, мезотелин, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), белки RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, антиген "Thompson-nouvelle" (Tn), TRP-1, TRP-2, тирозиназу и уроплакин-3.

Изобретатели предполагают, что данное изобретение включает многочисленные примеры биспецифических антител, имеющих слабое анти-CD3-связывающее плечо, изготовленных в соответствии с изобретением.

Согласно некоторым иллюстративным вариантам осуществления данное изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают CD3 и PSMA. Такие молекулы могут упоминаться в данном документе, как, например, "анти-CD3/анти-PSMA", или "анти-CD3хPSMA", или "CD3хPSMA" биспецифические молекулы и т.д. Используемый в данном документе термин "PSMA" относится к белку PSMA человека, если не указано, что он относится к видам, отличным от человека (например, "PSMA мыши", "PSMA обезьяны" и т.д.).

Термин "PSMA" относится к простат-специфическому мембранному антигену, также известному как фолатная гидролаза 1 (FOLH1) (UniProtKB/Swiss-Prot. No. Q04609; SEQ ID NO: 171). PSMA представляет собой интегральный, не шеддируемый (non-shedd) мембранный гликопротеин, который высокоэкспрессирован в эпителиальных клетках предстательной железы и является маркером клеточной поверхности для рака предстательной железы.

Согласно другим иллюстративным вариантам осуществления данное изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают CD3 и EGFRvIII. Такие молекулы могут упоминаться в данном документе, как, например, "анти-CD3/анти-EGFRvIII", или "анти-CD3хEGFRvIII", или "CD3хEGFRvIII" биспецифические молекулы и т.д. Термин "EGFRvIII" относится к

белку EGFRvIII человека, если не указано, что он относится к видам, отличным от человека (например, "EGFRvIII мыши", "EGFRvIII обезьяны" и т.д.).

Термин "EGFRvIII" относится к варианту III класса рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII, SEQ ID NO: 172), который является наиболее часто встречающимся вариантом EGFR в глиобластоме (Bigner et al., 1990, *Cancer Res.* 50:8017-8022; Humphrey et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4207-4211; Yamazaki et al., 1990, *Jap. J. Cancer Res.* 81:773-779; Ekstrand et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4309-4313; Wikstrand et al., 1995, *Cancer Res.* 55:3140-3148 и Frederick et al., 2000, *Cancer Res.* 60:1383-1387). EGFRvIII характеризуется делецией экзонов 2-7 гена EGFR, что приводит к делеции внутри рамки считывания 801 пары оснований кодирующей области, т.е. делеции 6-273 аминокислотных остатков (в зависимости от количества вычетов зрелых EGFR, см. UniProtKB/Swiss-Prot. No. P00533), а также генерации нового глицина на стыке слияния (Humphrey et al., 1988, *Cancer Res.* 48:2231-2238; Yamazaki et al., 1990, выше). Было показано, что EGFRvIII обладает лиганд-независимой, слабой, но конститутивно активной киназной активностью, а также повышенной онкогенностью (Nishikawa et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:7727-7731 и Batra et al., 1995, *Cell Growth and Differentiation*, 6:1251-1259). В дополнение к глиомам EGFRvIII был обнаружен при проточной и внутрикожной карциноме молочной железы (Wikstrand et al., 1995, *Cancer Res.* 55:3140-3148), немелкоклеточных карциномах легкого (Garcia de Palazzo et al., 1993, *Cancer Res.* 53:3217-3220), карциномах яичника (Moscatello et al., 1995, *Cancer Res.* 55:5536-5539), раке простаты (Olapade-Olaopa et al., 2000, *British J. Cancer*, 82:186-194) и плоскоклеточной карциноме головы и шеи (Tinhofer et al., 2011, *Clin. Cancer Res.* 17(15):5197-5204).

Согласно еще одним иллюстративным вариантам осуществления данное изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают CD3 и MUC16. Такие молекулы могут упоминаться в данном документе, как, например, "анти-CD3/анти-MUC16", или "анти-CD3xMUC16", или "CD3xMUC16" биспецифические молекулы и т.д. Термин "MUC16" относится к белку MUC16 человека, если не указано, что он относится к видам, отличным от человека (например, "MUC16 мыши", "MUC16 обезьяны" и т.д.).

Муцин 16 (MUC16; Справочная последовательность NCBI: NP_078966.2, SEQ ID NO: 173), иначе известный как раковый антиген 125 (CA-125), представляет собой муцин, кодируемый геном MUC16 у людей. Известно, что семейство белков муцина защищает организм от инфекции путем связывания патогена с олигосахаридами во внеклеточном домене, предотвращая образование патогенной формы на поверхности клетки. В течение многих лет сверхэкспрессия MUC16/CA125 использовалась в качестве прогностического и диагностического маркера рака яичника (Yin and Lloyd, 2001, *J. Biol. Chem.* 276(29), 27371-27375; O'Brien, T.J., et al., 2001, *Tumour Biol.* 22(6), 348-366; Leggieri, C. et al., 2014, *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 35 (4), 438-441). Было показано, что MUC16 защищает опухолевые клетки от иммунной системы с его сильно гликозилированным тандемным повторным доменом, который может связываться с галактином-1 (иммунодепрессивным белком) (Seelenmeyer, C., et al., 2003, *J. Cell. Sci.* 116 (Pt 7):1305-18; O'Brien, T.J., et al., 2002, *Tumour Biol.* 23(3), 154-169). Природные киллерные клетки и моноциты не способны атаковать опухолевые клетки, экспрессирующие высокие уровни MUC16. В своей нормальной физиологической роли взаимодействие MUC16-галактин служит барьером для бактериальной и вирусной инфекции, однако считается, что MUC16 является иммунопротекторным в контексте опухолевых клеток, тем самым предотвращая цитолиз раковых клеток (Felder, M. et al., 2014, *Molecular Cancer*, 13:129). Таким образом, MUC16 является желательной мишенью для иммунотерапевтических биспецифических молекул антител, вводимых для лечения рака яичника путем активации иммунных эффекторных клеток.

Согласно еще одним иллюстративным вариантам осуществления данное изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают CD3 и STEAP2. Такие молекулы могут упоминаться в данном документе, как, например, "анти-CD3/анти-STEAP2", или "анти-CD3xSTEAP2", или "CD3xSTEAP2" биспецифические молекулы и т.д. Термин "STEAP2" относится к белку STEAP2 человека, если не указано, что он относится к видам, отличным от человека (например, "STEAP2 мыши", "STEAP2 обезьяны" и т.д.). Шестой трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2 (STEAP2; UniProtKB/Swiss-Prot: Q8NFT2.3) представляет собой 490-аминокислотный белок, кодируемый геном STEAP2, расположенный в хромосомной области 7q21 у людей.

Вышеупомянутые биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают опухолеассоциированный антиген, содержат анти-CD3-антигенсвязывающую молекулу, которая связывается с CD3 со слабой или недетектируемой аффинностью связывания, такой как проявление K_D более чем около 100, 300 или 500 нМ, как измерено с помощью *in vitro* анализа связывания аффинности.

Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий или состоящий по меньшей мере из одной определенной комплементарности области (CDR), которая одна или в сочетании с одной или более дополнительными CDR и/или каркасными областями (FR) специфически связывается с определенным антигеном. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или

фрагмент антитела в том виде, в котором данные термины определены в тексте данного документа.

Используемый в данном документе термин "биспецифическая антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в биспецифической антигенсвязывающей молекуле содержит по меньшей мере одну CDR, которая сама по себе или в сочетании с одной или более дополнительными CDR и/или FR специфически связывается с определенным антигеном. В контексте данного изобретения первый антигенсвязывающий домен специфически связывает первый антиген (например, CD3), а второй антигенсвязывающий домен специфически связывает второй, отличный антиген (например, PSMA, MUC16, EGFRvIII или STEAP2).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения биспецифическая антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифического антитела содержит вариабельный домен тяжелой цепи (HCVR) и вариабельный домен легкой цепи (LCVR). В контексте биспецифической антигенсвязывающей молекулы, содержащей первый и второй антигенсвязывающие домены (например, биспецифическое антитело), CDR первого антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом "A1", а CDR второго антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом "A2". Таким образом, CDR первого антигенсвязывающего домена могут упоминаться в данном документе как A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3; а CDR второго антигенсвязывающего домена могут упоминаться в данном документе как A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3. Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть прямо или косвенно связаны друг с другом с образованием биспецифической антигенсвязывающей молекулы по данному изобретению. Альтернативно, первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть связаны с отдельным мультимеризующим доменом. Связь одного мультимеризующего домена с другим мультимеризующим доменом облегчает связь между двумя антигенсвязывающими доменами, тем самым образуя биспецифическую антигенсвязывающую молекулу. Используемый в данном документе термин "мультимеризующий домен" представляет собой любую макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, которая обладает способностью связываться со вторым мультимеризующим доменом той же или подобной структуры или конституции. Например, мультимеризующий домен может представлять собой полипептид, содержащий домен C_{H3} иммуноглобулина. Неограничивающим примером мультимеризующего компонента является часть Fc иммуноглобулина (содержащая домен C_{H2}-C_{H3}), например домен Fc IgG, выбранного из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любого аллотипа в каждой изотипной группе.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению обычно содержат два мультимеризующих домена, например два домена Fc, каждый из которых является индивидуально частью отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй мультимеризующие домены могут иметь один и тот же изотип IgG, такой как, например, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4. Альтернативно, первый и второй мультимеризующие домены могут иметь различные изотипы IgG, такие как, например, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т.д.

В некоторых вариантах осуществления мультимеризующий домен представляет собой фрагмент Fc или аминокислотную последовательность длиной от 1 до около 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. В других вариантах осуществления мультимеризующий домен представляет собой остаток цистеина или короткий цистеинсодержащий пептид. Другие мультимеризующие домены включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой молнии, мотива спиральной петли или мотива спиральной катушки.

Для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул по данному изобретению можно использовать любой формат или технологию биспецифического антитела. Например, антитело или его фрагмент, обладающие первой антигенсвязывающей специфичностью, могут быть функционально связаны (например, путем химической связи, генетического синтеза, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другими молекулярными объектами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, обладающие второй антигенсвязывающей специфичностью для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы. Конкретные иллюстративные биспецифические форматы, которые могут использоваться в контексте данного изобретения, включают, без ограничения, например, scFv-основанные или диательные биспецифические форматы, слитые IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, Quadroma, выступы-во-впадины, общая легкая цепь (например, общая легкая цепь с выступом-во-впадину и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED) тела, лейциновую молнию, Duobody, IgG1/IgG2, Fab двойного действия (DAF)-IgG и Mab² биспецифические форматы (см., например, Klein et al. 2012, mAbs, 4:6, 1-11, и ссылки, приведенные в нем, для обзора вышеперечисленных форматов).

В контексте биспецифических антигенсвязывающих молекул по данному изобретению мультимеризующие домены, например домены Fc, могут содержать одно или более аминокислотных изменений (например, инсерции, делеции или замены) по сравнению со встречающимися в природе версии домена Fc дикого типа. Например, изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или более модификаций в домене Fc, которая приводит к модифицированному домену Fc, имеющему модифицированное связывание (например, усиленное или уменьшенное) между Fc и

FcRn. В одном варианте осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит модификацию в области C_H2 или C_H3, причем модификация увеличивает сродство домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH составляет от около 5,5 до около 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация включает модификации 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификации 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификации 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификации 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификации 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) и модификации 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Данное изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый домен C_H3 и второй домен C_H3 Ig, причем первый и второй домены C_H3 Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и при этом по меньшей мере одно аминокислотное отличие уменьшает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, лишенным аминокислотного отличия. В одном варианте осуществления первый домен C_H3 Ig связывает белок А, а второй домен C_H3 Ig содержит мутацию, которая уменьшает или отменяет связывание с белком А, такую как модификация H95R (посредством нумерации экзонов IMGT, H435R по нумерации EC). Второй C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Дальнейшие модификации, которые могут быть обнаружены во втором C_H3, включают D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (по IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2 и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4.

В некоторых вариантах осуществления домен Fc может быть химерным, объединяющим последовательности Fc, полученные более чем из одного изотипа иммуноглобулина. Например, химерный домен Fc может содержать часть или всю последовательность C_H2, полученную из области C_H2 IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, и часть или всю последовательность C_H3, полученную из IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Химерный домен Fc также может содержать химерную область шарнира. Например, химерный шарнир может содержать последовательность "верхнего шарнира", полученную из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, в сочетании с "нижней петлевой" последовательностью, полученной из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Конкретный пример химерного домена Fc, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, включает от N- до C-конца: [C_H1 IgG4] - [верхний шарнир IgG4] - [нижний шарнир IgG2] - [C_H2 IgG4] [C_H3 IgG4]. Другой пример химерного домена Fc, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе, включает от N- до C-конца: [C_H1 IgG1] - [верхний шарнир IgG1] - [нижний шарнир IgG2] - [C_H2 IgG4] - [C_H3 IgG1]. Эти и другие примеры химерных доменов Fc, которые могут быть включены в любую из антигенсвязывающих молекул по данному изобретению, описаны в международной публикации PCT № WO 2014/121087 A1, опубликованной 7 августа 2014 г., которая включена в данный документ в качестве ссылки во всей своей полноте. Химерные домены Fc, имеющие данные общие структурные механизмы и их варианты, могут изменять связывание рецептора Fc, что, в свою очередь, влияет на функцию эффектора Fc.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к тяжелой цепи антитела, в которой константная область тяжелой цепи (C_H) содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190 или SEQ ID NO: 191. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи (C_H) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 182, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190 и SEQ ID NO: 191.

В других вариантах осуществления изобретение относится к тяжелой цепи антитела, в которой домен Fc содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 200 или SEQ ID NO: 201. В некоторых вариантах осуществления домен Fc содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 200 и SEQ ID NO: 201.

Другие варианты Fc.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения предусмотрены анти-CD3 антитела и анти-CD3/анти-ТАА биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие домен Fc, содержащий одну или более мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, данное изобретение включает антитела, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 домена Fc, причем мутация(и) увеличивает сродство домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH составляет от около 5,5 до около 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полувыведения сыворотки антитела при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация включает модификации 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификации 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификации 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификации 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификации 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) и модификации 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Например, данное изобретение включает анти-CD3 антитела и анти-CD3/анти-ТАА биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие домен Fc, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S) и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации вышеуказанных доменных мутаций Fc и другие мутации внутри вариативных доменов антитела, описанные в данном документе, рассматриваются в рамках данного изобретения.

Биологические характеристики антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул.

Данное изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела), которые способны одновременно связываться с CD3 человека и ТАА человека. Согласно некоторым вариантам осуществления биспецифические антигенсвязывающие молекулы по изобретению специфически взаимодействуют с клетками, которые экспрессируют CD3 и/или ТАА, такие как PSMA, EGFRvIII или MUC16. Связывающее плечо, которое взаимодействует с клетками, которые экспрессируют CD3, может иметь слабое или недетектируемое связывание, измеренное в подходящем анализе связывания *in vitro*. Степень, с которой биспецифическая антигенсвязывающая молекула связывает клетки, которые экспрессируют CD3 и/или ТАА, может быть оценена с помощью проточной цитометрии (FACS), как показано в примере 4 в данном документе.

Например, данное изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и их биспецифические антитела, которые специфически связывают линии Т-клеток человека, которая экспрессирует CD3, но не ТАА (например, Jurkat), Т-клетки приматов (например, мононуклеарные клетки периферической крови яванского макака [PBMC]) и/или ТАА-экспрессирующие клетки. Данное изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связывают любую из вышеупомянутых Т-клеток и Т-клеточных линий с величиной EC₅₀ от около 1,8×10⁻⁸ (18 нМ) до около 2,1×10⁻⁷ (210 нМ) или более (т.е. более слабую аффинность) и включает биспецифические антитела, для которых EC₅₀ не обнаруживается, как определено с использованием FACS анализа связывания, как указано в примере 4, или, по существу, аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифические антитела по данному изобретению связывают CD3 с EC₅₀, равной более чем около 30 нМ, более чем около 40 нМ, более чем около 45 нМ, более чем около 50 нМ, более чем около 55 нМ, более чем около 60 нМ, более чем около 65 нМ, более чем около 70 нМ, более чем около 75 нМ, по меньшей мере 80 нМ, более чем около 90 нМ, более чем около 100 нМ, более чем около 110 нМ, по меньшей мере 120 нМ, более чем около 130 нМ, более чем около 140 нМ, более чем около 150 нМ, по меньшей мере 160 нМ, более чем около 170 нМ, более чем около 180 нМ, более чем около 190 нМ, более чем около 200 нМ, более чем около 250 нМ, более чем около 300 нМ, более чем около 500 нМ, более чем около 1 мкМ, более чем около 2 мкМ или более чем около 3 мкМ, или недетектируемую аффинность связывания, измеренную с помощью FACS анализа связывания, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 4 в данном документе, или, по существу, аналогичного анализа.

Данное изобретение также включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и его биспецифические антитела, которые связываются с ТАА-экспрессирующими клетками и клеточными линиями, такими как PSMA-, EGFRvIII-, STEAP2- и MUC16-экспрессирующими клеточными линиями, причем значение EC₅₀ меньше чем около 100 нМ или даже меньше концентрации, необходимой для связывания (т.е. более сильной аффинности), такой как менее 5,6 нМ (5,6×10⁻⁹), как определено с использованием FACS анализа связывания, как указано в примере 4, или, по существу, аналогичного клеточного анализа. Дан-

ное изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связывают любую из вышеупомянутых линий опухолевых клеток со значением EC_{50} , равным менее чем около 50 нМ, менее чем около 45 нМ, менее чем около 40 нМ, менее чем около 35 нМ, менее чем около 30 нМ, менее чем около 25 нМ, менее чем около 20 нМ, менее чем около 15 нМ, менее чем около 10 нМ, менее чем около 6 нМ, менее чем около 5 нМ или менее чем около 1 нМ, например используя вышеупомянутый анализ.

Данное изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифические антитела, которые связывают CD3 человека с низкой, слабой или даже отсутствующей обнаруживаемой аффинностью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данное изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают CD3 человека (например, при 37°C) с K_D более чем около 11 нМ, включает антитела, которые связывают CD3 с K_D более чем около 100 или 500 нМ, а также включает антитела, не имеющие обнаруживаемой аффинности связывания, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 5 в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению связывают CD3 с K_D , равной более чем около 15 нМ, более чем около 20 нМ, более чем около 25 нМ, более чем около 30 нМ, более чем около 35 нМ, более чем около 40 нМ, более чем около 45 нМ, более чем около 50 нМ, более чем около 55 нМ, по меньшей мере 60 нМ, более чем около 65 нМ, более чем около 70 нМ, более чем около 75 нМ, по меньшей мере 80 нМ, более чем около 90 нМ, более чем около 100 нМ, более чем около 110 нМ, по меньшей мере 120 нМ, более чем около 130 нМ, более чем около 140 нМ, более чем около 150 нМ, более чем около 160 нМ, более чем около 170 нМ, более чем около 180 нМ, более чем около 190 нМ, более чем около 200 нМ, более чем около 250 нМ, более чем около 300 нМ, более чем около 1 мкМ, более чем около 2 мкМ или более чем около 3 мкМ, или недетектируемую аффинность связывания, измеренную с анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 5 в данном документе (например, формат mAb-захвата или захвата антигена), или, по существу, аналогичного анализа.

Данное изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифические антитела, которые связывают CD3 обезьяны (яванского макака) с низкой, слабой или даже отсутствующей обнаруживаемой аффинностью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данное изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, и их биспецифические антитела, которые связывают CD3 человека (например, при 37°C) с K_D более чем около 10 нМ, включает антитела, которые связывают CD3 с K_D более чем около 100 или 500 нМ, а также включает антитела, не имеющие обнаруживаемой аффинности связывания, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 5 в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению связывают CD3 с K_D , равной более чем около 15 нМ, более чем около 20 нМ, более чем около 25 нМ, более чем около 30 нМ, более чем около 35 нМ, более чем около 40 нМ, более чем около 45 нМ, более чем около 50 нМ, более чем около 55 нМ, по меньшей мере 60 нМ, более чем около 65 нМ, более чем около 70 нМ, более чем около 75 нМ, по меньшей мере 80 нМ, более чем около 90 нМ, более чем около 100 нМ, более чем около 110 нМ, по меньшей мере 120 нМ, более чем около 130 нМ, более чем около 140 нМ, более чем около 150 нМ, более чем около 160 нМ, более чем около 170 нМ, более чем около 180 нМ, более чем около 190 нМ, более чем около 200 нМ, более чем около 250 нМ, более чем около 300 нМ, более чем около 1 мкМ, более чем около 2 мкМ или более чем около 3 мкМ, или недетектируемую аффинность связывания, измеренную с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 5 в данном документе (например, формат mAb-захвата или захвата антигена), или, по существу, аналогичного анализа.

Данное изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифические антитела, которые связывают CD3 человека и индуцируют активацию Т-клеток. Например, данное изобретение включает анти-CD3 антитела, которые индуцируют активацию Т-клеток человека с величиной EC_{50} менее чем около 113 пМ, как измерено с помощью анализа активации Т-клеток *in vitro*, например используя формат анализа, как определено в примере 6 в данном документе [например, оценку процентных активированных ($CD69^+$) клеток из общих Т-клеток ($CD2^+$) в присутствии анти-CD3 антител], или, по существу, аналогичного анализа, который оценивает Т-клетку в их активированном состоянии. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению индуцируют активацию Т-клеток человека (например, процент активированных ($CD69^+$) Т-клеток] с величиной EC_{50} , равной менее чем около 100 пМ, менее чем около 50 пМ, менее чем около 20 пМ, менее чем около 19 пМ, менее чем около 18 пМ, менее чем около 17 пМ, менее чем около 16 пМ, менее чем около 15 пМ, менее чем около 14 пМ, менее чем около 13 пМ, менее чем около 12 пМ, менее чем около 11 пМ, менее чем около 10 пМ, менее чем около 9 пМ, менее чем около 8 пМ, менее чем около 7 пМ, менее чем около 6 пМ, менее чем около 5 пМ, менее чем около 4 пМ,

менее чем около 3 пМ, менее чем около 2 пМ или менее чем около 1 пМ, как измерено с помощью анализа активации Т-клеток *in vitro*, например используя формат анализа, как определено в примере 6 в данном документе, или, по существу, аналогичного анализа. Анти-CD3 антитела, которые обладают слабым или недетектируемым связыванием с CD3, обладают способностью индуцировать активацию Т-клеток с высокой эффективностью (т.е. пМ-диапазон), несмотря на то, что они имеют слабую или недетектируемую аффинность связывания с CD3, как показано в примере 6 в данном документе.

Данное изобретение также включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифические антитела, которые связывают CD3 человека и индуцируют опосредованный Т-клетками лизинг опухолевых антиген-экспрессирующих клеток. Например, данное изобретение включает анти-CD3 антитела, которые индуцируют опосредованный Т-клетками лизинг опухолевых клеток с EC_{50} , равной менее чем около 1,3 нМ, как измерено в анализе лизиса опухолевых клеток, опосредуемый Т-клетками, например, с использованием анализа, как определено в примере 6 в данном документе (например, оценка степени опухолевых антиген-экспрессирующих клеток, таких как экспрессия PSMA, экспрессия EGFRvIII или экспрессия MUC16 клеточное число РВМС человека в присутствии анти-CD3 антител), или, по существу, аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению индуцируют Т-клеточное опосредованный лизис опухолевых клеток (например, РВМС-опосредованный лизис клеток OVCAR3) со значением EC_{50} , равным менее чем около 1 нМ, менее чем около 400 пМ, менее чем около 250 пМ, менее чем около 100 пМ, менее чем около 50 пМ, менее чем около 40 пМ, менее чем около 30 пМ, менее чем около 20 пМ, менее чем около 10 пМ, менее чем около 9 пМ, менее чем около 8 пМ, менее чем около 7 пМ, менее чем около 6 пМ, менее чем около 5 пМ, менее чем около 4 пМ, менее чем около 3 пМ, менее чем около 2 пМ или менее чем около 1 пМ, как измерено в *in vitro* анализе лизиса опухолевых опосредованного Т-клетками, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 6 в данном документе, или, по существу, аналогичного анализа.

Данное изобретение также включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и биспецифические антитела, которые связывают CD3 с диссоциативным периодом полувыведения ($t_{1/2}$) менее чем около 10 мин, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 5 данного изобретения, или, по существу, аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению связывают CD3 с $t_{1/2}$ менее чем около 9 мин, менее чем около 8 мин, менее чем около 7 мин, менее чем около 6 мин, менее чем около 5 мин, менее чем около 4 мин, менее чем около 3 мин, менее чем около 2 мин, менее чем около 1,9 мин или менее чем около 1,8 мин или проявляют очень слабое или недетектируемое связывание, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например используя формат анализа, как определено в примере 5 в данном документе (например, формат захвата mAb или антигена), или, по существу, аналогичный анализ.

Анти-CD3/анти-ТАА биспецифические антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению могут дополнительно демонстрировать одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) индуцирования РВМС-пролиферации *in vitro*;
- (b) активации Т-клеток путем индуцирования высвобождения IFN-гамма и регуляции воспаления CD25 в цельной крови человека и
- (c) индуцирования цитотоксичности, опосредуемой Т-клеткой, на анти-ТАА-резистентных клеточных линиях.

Данное изобретение включает анти-CD3/анти-ТАА биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые способны разрушать опухолевые антиген-экспрессирующие клетки у субъекта (см., например, пример 7). Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления предложены анти-CD3/анти-PSMA, анти-CD3/анти-MUC16 или анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы, причем однократное введение 1, или 10, или 100 мкг биспецифической антигенсвязывающей молекулы субъекту (например, в дозе около 0,1 мг/кг, около 0,08 мг/кг, около 0,06 мг/кг, около 0,04 мг/кг, около 0,04 мг/кг, около 0,02 мг/кг, около 0,01 мг/кг или менее) вызывает снижение количества опухолевых антиген-экспрессирующих клеток у субъекта (например, рост опухоли у субъекта подавляется или ингибируется) ниже определяемых уровней. В некоторых вариантах осуществления однократное введение анти-CD3/анти-PSMA биспецифической антигенсвязывающей молекулы в дозе около 0,4 мг/кг приводит к уменьшению роста опухоли у субъекта, находящегося ниже уровня обнаружения, на около 7 суток, около 6 суток, около 5 суток, около 4 суток, около 3 суток, около 2 суток или около 1 суток после введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления однократное введение анти-CD3/анти-PSMA биспецифической антигенсвязывающей молекулы по изобретению в дозе, равной по меньшей мере около 0,01 мг/кг, приводит к тому, что количество опухолевых клеток, экспрессирующих PSMA, остается ниже определяемых уровней по меньшей мере до 7 суток, 8 суток, 9 суток, 10 суток, 11 суток, 12 суток, 13 суток, 14 суток, 15 суток, 16 суток, 17 суток и более после введения. Используемое в данном документе выражение "ни-

же детектируемых уровней" означает, что никакие опухолевые клетки не могут быть обнаружены прямо или косвенно, при подкожном росте у субъекта, с использованием стандартных приборов и методов измерения, например, как указано в примере 7. В некоторых вариантах осуществления одно введение анти-CD3/анти-MUC16 биспецифической антигенсвязывающей молекулы в дозе около 10 мкг приводит к подавлению роста опухоли у субъекта на около 6 суток и поддерживает подавление опухолей по меньшей мере до 26 суток после введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы субъекту. У субъектов, получающих однократное введение анти-CD3/анти-MUC16 биспецифической антигенсвязывающей молекулы в дозе около 10 мкг, по меньшей мере через 7 суток после имплантации опухоли, биспецифическая антигенсвязывающая молекула проявляет эффективность в подавлении роста развившихся опухолей у субъекта на около 26 суток после имплантации опухоли субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления однократное введение анти-CD3/анти-MUC16 биспецифической антигенсвязывающей молекулы по изобретению в дозе по меньшей мере около 0,1 мг/кг ингибирует рост опухолевых клеток, экспрессирующих MUC16, по меньшей мере на около 7 суток, 8 суток, 9 суток, 10 суток, 11 суток, 12 суток, 13 суток, 14 суток, 15 суток, 16 суток, 17 суток, 18 суток, 19 суток, 20 суток и более после введения биспецифической молекулы. См., например, пример 8.

В некоторых вариантах осуществления однократное введение анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифической антигенсвязывающей молекулы в дозе около 0,1 или 0,01 мг/кг поддерживает подавление роста опухоли по меньшей мере до 46 суток после введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы и опухоли субъекту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления однократное введение анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифической антигенсвязывающей молекулы по изобретению в дозе, равной по меньшей мере около 0,1 мг/кг, около 0,08 мг/кг, около 0,06 мг/кг, около 0,05 мг/кг, около 0,04 мг/кг, около 0,03 мг/кг, около 0,02 мг/кг, около 0,01 мг/кг или менее ингибирует рост STEAP2-экспрессирующих опухолевых клеток в течение по меньшей мере около 20 суток, 30 суток, 35 суток, 40 суток, 45 суток и более после введения биспецифической молекулы. См., например, пример 10.

В других вариантах осуществления анти-CD3/анти-TAA биспецифические антигенсвязывающие молекулы, имеющие целевое CD3-связывающее плечо, имеющее слабую аффинность связывания с эффекторными клетками, демонстрируют снижение скорости элиминации лекарственного средства по сравнению с биспецифическими антителами, содержащими одно и то же анти-TAA-связывающее плечо и сильное CD3-связывание, введенное в фармакокинетическом исследовании *in vivo*. Результаты демонстрируют, что биспецифические молекулы, содержащие более слабое связывание плеча с плечом, нацеливающим на CD3, могут проявлять благоприятные уровни воздействия лекарственного средства (AUC_{last}) и профили элиминации лекарственных средств (клиренс антител). См., например, пример 9.

В данном изобретении предложены анти-CD3/анти-PSMA, анти-CD3/анти-MUC16 и анти-CD3/анти-STEAP2 биспецифические антигенсвязывающие молекулы (т.е. анти-CD3/анти-TAA биспецифические антигенсвязывающие молекулы), которые проявляют одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) ингибирования роста опухоли у иммунокомпрометированных мышей, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека;
- (b) ингибирования роста опухоли у иммунокомпрометированных мышей, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека;
- (c) подавления роста опухоли развившихся опухолей у мышей с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека; и
- (d) снижение роста опухоли у развившихся опухолей у иммунокомпрометированных мышей, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека (см., например, примеры 7, 8 и 10).

В данном изобретении также представлены биспецифические анти-CD3 /анти-PSMA, анти-CD3/анти-MUC16 и анти-CD3/анти-STEAP2 антитела (т.е. биспецифические анти-CD3/анти-TAA антитела), содержащие i) первую тяжелую цепь, направленную на эффекторную T-клетку (т.е. CD3); и ii) вторую тяжелую цепь, направленную на целевую опухолевую клетку, причем биспецифические антитела проявляют слабое связывание или недетектируемое связывание с эффекторными клетками и проявляют подавление роста опухоли и снижение клиренса антител (т.е. устранение) из организма по сравнению с биспецифическими антителами, которые проявляют сильное связывание с эффекторными клетками.

Картирование эпитопов и связанные с ними технологии.

Эпитоп на CD3, с которым связываются антигенсвязывающие молекулы данного изобретения, может состоять из одной непрерывной последовательности 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка CD3. Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) CD3. Антитела по изобретению могут взаимодействовать с аминокислотами, содержащимися в одной цепи CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма), или могут взаимодействовать с аминокислотами на двух или более различных цепях CD3. Используемый в данном документе термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания антигена в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного

эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой тот, что получен смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может содержать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

Различные методики, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для определения того, взаимодействует ли антигенсвязывающий домен антитела с одной или более аминокислотами внутри полипептида или белка. Иллюстративные методики включают, например, стандартный эпитоп перекрестный конкурентный анализ, такой как описанный в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), мутационный анализ аланинового сканирования, анализ пептидных блотов (Reineke, 2004, *Methods Mol. Biol.* 248:443-463) и анализ расщепления пептида. Кроме того, могут быть использованы такие методы, как удаление эпитопа, экстракция эпитопов и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science*, 9:487-496). Другим методом, который может быть использован для идентификации аминокислот внутри полипептида, с которым взаимодействует антигенсвязывающий домен антитела, является водород-дейтериевый обмен, обнаруженный с помощью масс-спектрометрии. В общем, метод водород-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы можно было осуществлять обмен водорода с дейтерием во всех остатках, за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазы и анализу масс-спектрометрии, тем самым выявляя меченые дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999), *Analytical Biochemistry*, 267(2):252-259; Engen and Smith (2001), *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Рентгеновская кристаллография комплекса антиген/антитело также может быть использована для целей картирования эпитопов.

Данное изобретение дополнительно включает анти-PSMA антитела, которые связываются с одним и тем же эпитопом, как и любое конкретное иллюстративное антитело, описанное в данном документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, как указано в табл. 6 в данном документе). Подобным же образом данное изобретение также включает анти-PSMA антитела, которые конкурируют за связывание с PSMA с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, как указано в табл. 6 в данном документе). Анти-PSMA антитела, раскрытые в заявке США № 15/223434, включены в данный документ посредством ссылки.

Данное изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека и/или CD3 яванского макака с низкой или обнаруживаемой аффинностью связывания, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает опухолеассоциированный антиген человека (ТАА), причем первый антигенсвязывающий домен связывается с одним и тем же эпитопом на CD3, как любой из конкретных иллюстративных CD3-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе.

Кроме того, данное изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека и/или CD3 яванского макака с низкой или обнаруживаемой аффинностью связывания, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает опухолеассоциированный антиген человека (ТАА), причем первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 с любым из конкретных иллюстративных CD3-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе.

Можно легко определить, связывается ли конкретная антигенсвязывающая молекула (например, антитело) или ее антигенсвязывающий домен с тем же эпитопом или конкурирует за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой по данному изобретению, используя обычные методы, известные из уровня техники. Например, чтобы определить, связывается ли тестовое антитело с одним и тем же эпитопом на CD3 (или ТАА) в качестве эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулы по данному изобретению, эталонная биспецифическая молекула сначала связывается с белком CD3 (или белком ТАА). Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой CD3. Если тестируемое антитело может связываться с CD3 (или ТАА) после связывания насыщения с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом CD3 (или ТАА), чем контрольная биспецифическая антигенсвязывающая молекула. С другой стороны, если тестируемое антитело не может связываться с молекулой CD3 (или ТАА) после связывания насыщения с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, тогда тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом CD3 (или ТАА), что и эпитоп, связанный эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой по изобретению. Затем могут быть

проведены дополнительные стандартные эксперименты (например, пептидная мутация и анализ связывания), чтобы подтвердить, является ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела на самом деле связанным со связыванием с тем же эпитопом, что и эталонная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, или стерическое блокирование (или другое явление) несет ответственность за отсутствие наблюдаемого связывания. Если контрольное антитело представляет собой такое, которое не имеет измеримого связывания, как показано в данном документе в качестве примера, то эталонное антитело может быть мутировано обратно к последовательности зародышевой линии, чтобы определить связывание с CD3 с целью сравнения взаимодействия эпитопов или сравнения его связывающих свойств с тестируемым антителом, как описано в данном документе. Эксперименты такого типа могут быть выполнены с использованием ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания с антителом, доступного в данной области техники. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антигенсвязывающего белка ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже на 99%, как измерено в конкурентном анализе связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990, 50:1495-1502). Альтернативно, считается, что два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же эпитопом, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или устраняют связывание другого. Два антигенсвязывающих белка считаются "перекрывающимися эпитопами", если только подмножество аминокислотных мутаций, которые уменьшают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или устраняют связывание другого.

Чтобы определить, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий домен за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, описанная выше методика связывания выполняется в двух направлениях: В первой ориентации типичная антигенсвязывающая молекула может связываться с белком CD3 (или белком TAA) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой CD3 (или TAA). Во второй ориентации тестируемому антителу позволено связываться с молекулой CD3 (или TAA) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонной антигенсвязывающей молекулы с молекулой CD3 (или TAA). Если в обеих ориентациях только первая (насыщающая) антигенсвязывающая молекула способна связываться с молекулой CD3 (или TAA), то делается вывод, что тестовое антитело и эталонная антигенсвязывающая молекула конкурируют за связывание с CD3 (или TAA). Как будет понятно специалисту в данной области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и контрольное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела посредством связывания перекрывающегося или смежного эпитопа. Если контрольное антитело представляет собой такое, которое не имеет измеримого связывания, как показано в данном документе в качестве примера, то эталонное антитело может быть мутировано обратно к последовательности зародышевой линии, чтобы определить связывание с CD3 с целью сравнения взаимодействия эпитопов или сравнения его связывающих свойств или блокирования взаимодействия с тестируемым антителом, как описано в данном документе.

Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифических молекул.

Антигенсвязывающие домены, специфичные для конкретных антигенов, могут быть получены любой технологией генерирования антител, известной в данной области техники. После получения два различных антигенсвязывающих домена, специфичные для двух разных антигенов (например, CD3 и TAA), могут быть соответствующим образом расположены относительно друг друга для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы по данному изобретению с использованием обычных методов. (Обсуждение иллюстративных биспецифических форматов антител, которые могут быть использованы для конструирования биспецифических антигенсвязывающих молекул по данному изобретению, приводится в данном документе в другом месте). В некоторых вариантах осуществления один или более отдельных компонентов (например, тяжелых и легких цепей) мультиспецифических антигенсвязывающих молекул по изобретению получают из химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области. Например, одна или более тяжелых и/или легких цепей биспецифических антигенсвязывающих молекул по данному изобретению могут быть получены с использованием технологии VELOCIMMUNE™. При использовании технологии VELOCIMMUNE™ (или любой другой технологии генерирования антител человека) высокоаффинные химерные антитела к определенному антигену (например, CD3 или TAA) изначально выделены с вариабельной областью человека и константной областью мыши. Антитела характеризуются и отбираются по желательным характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Константные области мыши заменяются требуемой константной областью человека для генерации полностью тяжелых и/или легких цепей человека, которые могут быть включены в биспецифические антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению.

Генетически модифицированные животные могут быть использованы для создания биспецифических антигенсвязывающих молекул человека. Например, может быть использована генетически модифицированная мышь, которая не способна перегруппировать и экспрессировать вариabельную последовательность эндогенной легкой цепи иммуноглобулина мыши, причем мышь экспрессирует только один или два вариabельных домена легкой цепи человека, кодируемых последовательностями иммуноглобулина человека, функционально связанными с константными генами каппа (κ) мыши в эндогенном локусе каппа (κ) мыши. Такие генетически модифицированные мыши могут быть использованы для получения полностью биспецифических антигенсвязывающих молекул человека, содержащих две различные тяжелые цепи, которые ассоциируются с идентичной легкой цепью, которая содержит вариabельный домен, полученный из одного из двух разных сегментов генов вариabельной области легкой цепи человека. (См., например, US 2011/0195454 для детального обсуждения таких модифицированных мышей и их использования для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул). Антитела по изобретению могут содержать тяжелые цепи иммуноглобулина, связанные с общей легкой цепью. Обычная легкая цепь может быть получена из когнатной легкой цепи, тяжелой цепи анти-ГАА или получена из известной вариabельной области легкой цепи или общедоступного домена, полученной из легкой цепи, проявляющей разнородность или способность спариваться с широким спектром некогнатных тяжелых цепей, т.е. универсальную или обычную легкую цепь. Антитела по изобретению могут содержать тяжелые цепи иммуноглобулина, связанные с одной реаранжированной легкой цепью. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь представляет собой вариabельный домен, полученный из сегмента гена V κ 1-39 или сегмента гена V κ 3-20 человека. В других вариантах осуществления легкая цепь содержит вариabельный домен, полученный из сегмента гена V κ 1-39 человека, реаранжированного с помощью сегмента J κ 5 человека или J κ 1 гена человека или сегмента гена V κ 3-20, реаранжированного с помощью сегмента гена J κ 1 человека, или V κ 1-39, реаранжированного с помощью сегмента гена J κ 1 человека.

Биоэквиваленты.

Данное изобретение охватывает антигенсвязывающие молекулы, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от тех, которые описаны в раскрытых в данном документе примерах молекулах, но которые сохраняют способность связывать или взаимодействовать с CD3 и/или ГАА. Такие варианты молекул могут содержать одну или более инсерций, делеций или замещений аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая по существу эквивалентна биологической активности описанных биспецифических антигенсвязывающих молекул.

Данное изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, которые биоэквивалентны любой из иллюстративных антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе. Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, чья скорость и степень абсорбции не демонстрируют существенной разницы при введении в той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, в виде единичных доз или множественной дозы. Некоторые антигенсвязывающие белки будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их поглощения, и все же могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражаются как не имеющие существенного значения для достижения эффективных концентраций лекарственного средства для тела, например при хроническом применении, и считаются физически незначимыми для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и активности.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может переключаться один или более раз между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска неблагоприятных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или уменьшенное эффективность по сравнению с продолжающейся терапией без такого переключения.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если оба они действуют по общему механизму или механизмам действия для условия или условий использования в той мере, в которой известны такие механизмы.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована методами *in vivo* и *in vitro*. Меры биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в которых концентрация антитела или его метаболитов измеряется в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости в зависимости от времени; (b) тест *in vitro*, который был коррелирован с данными и достоверно прогнозирует данные биодоступности человека *in vivo*; (c) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в которых соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется как функция времени; и (d) в хорошо контролируемое клиническое исследование, которое устанавливает безопасность, эффективность, или биодоступность, или биоэквивалентность антигенсвязывающих молекул.

вающего белка.

Биоэквивалентные варианты иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, изложенные в данном документе, могут быть сконструированы, например, путем осуществления различных замещений остатков или последовательностей или удаления терминальных или внутренних остатков или последовательностей, не необходимых для биологической активности. Например, остатки цистеина, которые не являются существенными для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами, чтобы предотвратить образование ненужных или некорректных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антигенсвязывающие белки могут включать варианты приведенных в данном документе иллюстративных биспецифических антигенсвязывающих молекул, включающих аминокислотные изменения, которые изменяют характеристики гликозилирования молекул, например мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Селективность по видам и видовая кросс-реактивность.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения предложены антигенсвязывающие молекулы, которые проявляют слабое или вообще не взаимодействуют с CD3 человека и слабое или отсутствующее взаимодействия с CD3 других видов, такими как CD3 яванского макака. Также представлены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с ТАА человека, но не с ТАА других видов. Данное изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека и CD3 от одного или более видов, отличных от человека; и/или антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с ТАА человека и с ТАА из одного или более видов, отличных от человека.

В соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления изобретения предложены антигенсвязывающие молекулы, которые слабо связываются с CD3 человека и/или ТАА человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от случая, с одной или более CD3 и/или ТАА мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макака резус или шимпанзе. Например, в некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения предложены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который слабо связывает CD3 человека и CD3 яванского макака, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает PSMA, MUC16, EGFRvIII или STEAP2 человека.

Иммуноконъюгаты.

Данное изобретение охватывает антигенсвязывающие молекулы, конъюгированные с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как цитотоксин, химиотерапевтический препарат, иммунодепрессант или радиоизотоп. Цитотоксические агенты включают любой агент, который вреден для клеток. Примеры пригодных цитотоксических агентов и химиотерапевтических агентов для формирования иммуноконъюгатов известны в данной области техники (см., например, WO 05/103081).

Терапевтический препарат и введение.

Данное изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению. Фармацевтические композиции по изобретению составлены с пригодными носителями, эксципиентами и другими агентами, которые обеспечивают улучшенную передачу, доставку, переносимость и т.п. Множество пригодных составов можно найти в формуляре, известном всем фармацевтическим химикам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, штат Пенсильвания. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, (катионные или анионные) липиды, содержащие везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA (1998), J. Pharm. Sci. Technol. 52:238-311.

Доза антигенсвязывающей молекулы, вводимая пациенту, может варьировать в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п. Предпочтительная доза обычно рассчитывается в соответствии с массой тела или площадью поверхности тела. Когда биспецифическая антигенсвязывающая молекула по данному изобретению используется для терапевтических целей у взрослого пациента, может быть выгодным внутривенно вводить биспецифическую антигенсвязывающую молекулу по данному изобретению, как правило, в разовой дозе от около 0,01 до около 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от около 0,02 до около 7, от около 0,03 до около 5 или от около 0,05 до около 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния можно отрегулировать частоту и продолжительность лечения. Эффективные дозы и графики для введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы могут быть определены эмпирически; например, прогресс пациента может контролироваться путем периодической оценки, и корректировать дозу соответствующим образом. Кроме того, межвидовое масштабирование доз может быть выполнено с использованием хорошо известных в данной области техники методов (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения фармацевтической композиции по изобретению, например инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы,

рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредуемый рецептором эндцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, но не ограничиваются ими, внутрикожные, внутримышечные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и пероральные пути. Композицию можно вводить любым удобным способом, например путем инфузии или болюсной инъекции путем абсорбции через эпителиальные или слизистые подкладки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.), и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может быть введена подкожно или внутривенно стандартной иглой и шприцем. Кроме того, в отношении подкожной доставки шприцевое устройство для доставки легко может иметь приложения для доставки фармацевтической композиции по данному изобретению. Такое шприцевое устройство для доставки может быть многоразовым или одноразовым. Многоразовое шприцевое устройство доставки обычно использует сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Как только вся фармацевтическая композиция внутри картриджа была введена, а картридж опустел, пустой картридж можно легко отбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем шприцевое устройство для доставки может быть повторно использовано. В одноразовом шприцевом устройстве для доставки нет сменного картриджа. Скорее, одноразовое шприцевое устройство для доставки заполняется фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар опустеет от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывается.

Многочисленные повторно используемые шприцевые устройства для доставки и автоинъекторы имеют функцию для подкожной доставки фармацевтической композиции по данному изобретению. Примеры включают, но не ограничиваются ими, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бергдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, штат Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклинг лейке, штат Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Франкфурт, Германия), названы лишь несколько. Примеры одноразовых шприцевых устройств для доставки, имеющих функцию для подкожной доставки фармацевтической композиции по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), SURECLICK™ Autoinjector (Amgen, Саузенд окс, штат Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), названы лишь несколько.

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может поставляться в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления может использоваться насос (см. Langer, ранее; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте могут быть использованы полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В еще одном варианте осуществления система контролируемого высвобождения может быть расположена вблизи мишени композиции, что требует лишь доли системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, p. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science, 249:1527-1533.

Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты могут быть получены общеизвестными способами. Например, инъекционные препараты могут быть получены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или маслянистой среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существуют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т.д., которые могут быть использованы в комбинации с подходящим солюбилизирующим агентом, таким как спирт (например, этанол) (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтилен (50 моль) аддукт гидрированного касторового масла) и т.д. В качестве маслянистой среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые могут использоваться в комбинации с солюбилизирующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученную таким образом инъекцию предпочтительно помещают в соответствующую ампулу.

Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде лекарственных форм с единичной дозой, пригодных для дозирования активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество вышеуказанного антитела обычно составляет от 5 до 500 мг на лекарственную форму в стандартной дозе; особенно в форме инъек-

ции, предпочтительно, чтобы вышеуказанное антитело содержалось в количестве от около 5 до около 100 мг и от около 10 до около 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтическое применение антигенсвязывающих молекул.

Данное изобретение включает способы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтической композиции, содержащей противоопухолевое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывается слабо или имеет недетектируемое связывание с CD3, и связывает опухолеассоциированный антиген. Терапевтическая композиция может содержать любое из антител или биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Используемый в данном документе термин "субъект, нуждающийся в этом" означает человека или животное, отличное от человека, которое проявляет один или более симптомов или признаков рака (например, субъект, экспрессирующий опухоль или страдающий любым из видов рака, упомянутых ниже) или которое в противном случае выиграет от ингибирования или уменьшения активности опухолей или истощения опухолевых клеток (например, клеток рака простаты PSMA⁺⁺).

Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы по изобретению (и терапевтические композиции, содержащие их) пригодны, среди прочего, для лечения любого заболевания или расстройства, при которых стимуляция, активация и/или нацеливание иммунного ответа были бы полезными. В частности, биспецифические антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению могут быть использованы для лечения, профилактики и/или улучшения любого заболевания или расстройства, ассоциированного или опосредованного клеткой, экспрессирующей ТАА, например экспрессии PSMA или активности или пролиферации клеток PSMA⁺. Механизм действия, посредством которого достигаются терапевтические способы по изобретению, включает лизис клеток, экспрессирующих опухолеассоциированные антигены, в присутствии эффекторных клеток, например CDC, апоптоз, ADCC, фагоцитоз или комбинации двух или более данных механизмов. Клетки, экспрессирующие опухолеассоциированные антигены, такие как PSMA, MUC16, STEAP2 или EGFRvIII, которые могут быть ингибированы или уничтожены с использованием биспецифических антигенсвязывающих молекул по изобретению, включают, например, опухолевые клетки предстательной железы.

Антигенсвязывающие молекулы по данному изобретению могут быть использованы для лечения, например, первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в головном мозге и мозговых оболочках, голове и шее, ротоглотке, легочном и бронхиальном дереве, желудочно-кишечном тракте, мужском и женском репродуктивном тракте, мышцах, кости, коже и придатках, соединительной ткани, селезенке, иммунной системе, кроветворных клетках и костном мозге, печени и мочевыводящих путях, почке, мочевом пузыре и/или специальных сенсорных органах, таких как глаз. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие молекулы по изобретению используются для лечения одного или более из следующих видов рака: карциномы поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, злокачественных глиом, остеосаркомы, колоректального рака, рака молочной железы, рака желудка (например, рак желудка с амплификацией MET), злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичника, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, меланомы, рака молочной железы (например, протоковых или внутриутробных карцином молочной железы), плоскоклеточного рака, рак пищевода, язвенной клеточной карциномы почек, хромофобной карциномы почки, (почечная) онкоцитомы, (почечная) карциномы транзиторных клеток, уротелиальной карциномы (мочевого пузыря), аденокарциномы или мелкоклеточной карциномы (мочевого пузыря). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения биспецифические антитела пригодны для лечения пациента, страдающего рефрактерным или устойчивым к лечению раком, например, устойчивым к кастрации, рак предстательной железы. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления изобретения предлагаются способы, включающие введение анти-CD3/анти-PSMA биспецифической антигенсвязывающей молекулы, раскрытой в данном документе, пациенту, страдающему раком простаты, резистентным к кастрации. Аналитические/диагностические методы, известные в данной области техники, такие как сканирование опухолей и т.д., могут быть использованы для определения того, содержит ли пациент опухоль, устойчивую к кастрации.

Данное изобретение также включает способы лечения остаточного рака у субъекта. Используемый в данном документе термин "остаточный рак" означает существование или персистенцию одной или более раковых клеток у субъекта после лечения противораковой терапией, такой как терапия первой линии или стандартная терапия.

В соответствии с некоторыми аспектами данное изобретение относится к способам лечения рака, связанного с экспрессией ТАА (например, рак предстательной железы, связанный с экспрессией PSMA или экспрессией STEAP2, глиобластома, связанная с экспрессией EGFRvIII, или рак яичника, ассоциированный с экспрессией MUC16), включающим введение одного или более биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в данном документе в другом месте, субъекту после того, как у субъекта было установлено, что он имеет рак. Например, данное изобретение включает способы лечения рака предстательной железы, включающие введение анти-CD3/анти-ТАА биспецифической антигенсвязывающей молекулы.

вающей молекулы пациенту через 1 сутки, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год и более после того, как субъект получил предыдущую терапию.

Комбинированная терапия и составы.

Данное изобретение относится к способам, которые включают введение фармацевтической композиции, содержащей любые из иллюстративных антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в данном документе, в сочетании с одним или более дополнительными терапевтическими агентами. Иллюстративные дополнительные терапевтические агенты, которые могут быть объединены или введены в комбинации с антигенсвязывающей молекулой по данному изобретению, включают, например, антитело против программируемой клеточной смерти 1 (например, анти-PD1 антитело, как описано в публикации заявки на патент США №. US2015/0203579A1), антипрограммированный лиганд смерти клеток-1 (например, анти-PD-L1 антитело, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203580A1), антагонист EGFR (например, анти-EGFR антитело [например, цетуксимаб или панитумумаб] или низкомолекулярный ингибитор EGFR [например, гефитиниб или эрлотиниб]), антагонист другого члена семейства EGFR, такого как Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, анти-ErbB2, анти-ErbB3 или анти-ErbB4 антитело или низкомолекулярный ингибитор активности ErbB2, ErbB3 или ErbB4), антагонист EGFRvIII (например, антитело, которое специфически связывает EGFRvIII), антагонист cMET (например, анти-cMET антитело), антагонист IGF1R (например, анти-IGF1R антитело), ингибитор B-raf (например, вемурафениб, сорафениб, GDC-0879, PLX-4720), ингибитор PDGFR- α (например, анти-PDGFR- α антитело), ингибитор PDGFR- β (например, анти-PDGFR- β антитело), антагонист VEGF (например, VEGF-Trap, см., например, US 7087411 (также упоминается в данном документе как "слитый белок ингибирующий VEGF"), анти-VEGF антитело (например, бевацизумаб), низкомолекулярный ингибитор киназ рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)), антагонист DLL4 (например, анти-DLL4 антитело, раскрытое в US 2009/0142354, такое как REGN421), антагонист Ang2 (например, анти-Ang2 антитело, раскрытое в US 2011/0027286 такое, как H1H685P), антагонист FOLH1 (PSMA), антагонист PRLR (например, анти-PRLR антитело), антагонист STEAP1 или STEAP2 (например, анти-STEAP1 антитело или анти-STEAP2 антитело), антагонист TMPRSS2 (например, анти-TMPRSS2 антитело), антагонист MSLN (например, анти-MSLN антитело), антагонист CA9 (например, анти-CA9 антитело), антагонист уроплакинов (например, антитело против уроплакина) и т.д. Другие агенты, которые могут быть выгодно введены в комбинации с антигенсвязывающими молекулами по изобретению, включают ингибиторы цитокинов, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18 или к их соответствующим рецепторам. Фармацевтические композиции по данному изобретению (например, фармацевтические композиции, содержащие анти-CD3/анти-PSMA биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, описанную в данном документе) также могут быть введены как часть терапевтического режима, включающего одну или более терапевтических комбинаций, выбранных из "ICE": ифосфамид (например, Ifex®), карбоплатин (например, Paraplatin®), этопозид (например, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16); "DHAP": дексаметазон (например, Decadron®), цитарабин (например, Cytosar-U®, цитозин-арабинозид, ara-C), цисплатин (например, Platinol®-AQ) и "ESHAP": этопозид (например, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), метилпреднизолон (например, Medrol®), высокодозовый цитарабин, цисплатин (например, Platinol®-AQ).

Данное изобретение также включает терапевтические комбинации, включающие любую из антигенсвязывающих молекул, упомянутых в данном документе, и ингибитор одного или более из VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, уроплакин или любой из вышеупомянутых цитокинов, причем ингибитор представляет собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, миРНК, пептидное антитело, наночастицу или фрагмент антитела (например, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fd, фрагмент Fv, scFv, dAb фрагмент или другие модифицированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетраатела, мини-антитела и минимальные распознающие единицы). Антигенсвязывающие молекулы по изобретению также могут быть введены и/или объединены в сочетании с противовирусными препаратами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами и/или НПВС. Антигенсвязывающие молекулы по изобретению могут также вводиться как часть схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или обычную химиотерапию.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить непосредственно перед, одновременно с или вскоре после введения антигенсвязывающей молекулы по данному изобретению; (для целей данного раскрытия такие схемы введения считаются введением антигенсвязывающей молекулы "в сочетании с" дополнительным терапевтически активным компонентом).

Данное изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антигенсвязывающая молекула по данному изобретению объединяется с одним или более дополнительным терапевтическим активным компонентом (компонентами), описанным в данном документе в другом месте.

Режимы введения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данного изобретения многократные дозы биспецифической антигенсвязывающей молекулы (например, анти-ТАА антигенсвязывающей молекулы) могут вводиться субъекту в течение определенного времени. Способы в соответствии с данным аспектом изобретения включают последовательное введение субъекту нескольких доз антигенсвязывающей молекулы по изобретению. Используемый в данном документе термин "последовательное введение" означает, что каждая доза антигенсвязывающей молекулы вводится субъекту в другой момент времени, например в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часы, сутки, недели или месяцы). Данное изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту единственной начальной дозы антигенсвязывающей молекулы, за которой следуют одна или более вторичных доз антигенсвязывающей молекулы и необязательно сопровождаемая одной или более третичными дозами антигенсвязывающей молекулы.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антигенсвязывающей молекулы по изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которая вводится в начале режима лечения (также называемая "базовой дозой"); "вторичные дозы" - дозы, вводимые после начальной дозы; а "третичные дозы" - дозы, вводимые после вторичных доз. Начальные, вторичные и третичные дозы могут содержать одинаковое количество антигенсвязывающей молекулы, но обычно могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. Однако в некоторых вариантах осуществления количество антигенсвязывающей молекулы, содержащееся в начальных, вторичных и/или третичных дозах, отличается один от другого (например, скорректировано в большую или меньшую сторону по мере необходимости) в ходе лечения. В некоторых вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале режима лечения в качестве "нагрузочных доз" с последующими дозами, которые вводятся менее часто (например, "поддерживающие дозы").

В одном иллюстративном варианте осуществления данного изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят от 1 до 26 недель (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или более) после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", используемая в данном документе, означает в последовательности множественных введений дозу антигенсвязывающей молекулы, которая вводится пациенту до введения самой следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы в соответствии с данным аспектом изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антигенсвязывающей молекулы (например, биспецифической анти-ТАА антигенсвязывающей молекулы). Например, в некоторых вариантах осуществления пациенту вводится только одна вторичная доза. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичные дозы. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичные дозы.

В вариантах осуществления, включающих множественные вторичные дозы, каждая вторичная доза может вводиться с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может вводиться пациенту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих множественные третичные дозы, каждая третичная доза может вводиться с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. Альтернативно, частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводятся пациенту, может изменяться в течение курса лечения. Частота введения может также регулироваться в ходе лечения врачом в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Примеры

Следующие примеры приведены с тем, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание способов изготовления и применения способов и композиций изобретения и не предназначены для ограничения объема изобретения, которое изобретатели считают в качестве своего изобретения. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых номеров (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура выражена в градусах Цельсия, а давление находится в пределах атмосферного или вблизи него.

Пример 1. Создание анти-CD3 антител.

Следующие процедуры были направлены на выявление антител, которые специфически распознавали CD3 (Т-клеточный ко-рецептор) в качестве антигена.

Пул анти-CD3 антител был получен путем иммунизации генетически модифицированных мышей. Вкратце, мыши, генетически сконструированные для экспрессии обратной химерной (вариабельная область человека, константная область мыши) и тяжелых цепей иммуноглобулина, связанные с одной реаранжированной легкой цепью (например, V κ 1-39/J или V κ 3-20/J), были иммунизированы CD3 антигеном

и произвели В-клетки, которые включали разнообразие реаранжировок V_H человека, чтобы экспрессировать разнообразный репертуар высокоаффинных антигенспецифических антител. Некоторые иллюстративные антитела, описанные в данном документе, были созданы рекомбинантно, и экспрессировали ту же последовательность легкой цепи V_{k1} -39JK5 (LCVR, представленную в SEQ ID NO: 162), тогда как другие антитела, которые рекомбинантно экспрессировали когнатную легкую цепь одного из плеч тяжелой цепи (например, плечо, нацеливающее на опухоль).

Созданные антитела испытывали на аффинность к антигену CD3 человека и яванского макака в анализе связывания *in vitro*, и, например, одно анти-CD антитело, обозначенное CD3-VH-P (HCVR, представленный в SEQ ID NO: 154) было идентифицировано среди нескольких других, которые, как было установлено, связывались с CD3 человека и яванского макака, и имело EC_{50} от 1 до 40 нМ аффинности (+++), как определено в FACS титровании клеток Jurkat и Т-клеток яванского макака соответственно. См., например, эксперименты по FACS связыванию, описанные ниже в примере 4.

Затем были идентифицированы аминокислотные остатки зародышевой линии CD3-VH-P, а антитело, обозначенное как "CD3-VH-G", было сконструировано так, чтобы оно содержало только структуры зародышевой линии. Другие производные антител были разработаны известными методиками молекулярного клонирования для замены аминокислотных остатков поэтапно на основе различий между последовательностью зародышевой линии и последовательностью CD3-VH-P. Каждому производному антитела присваивали указывающий номер "CD3-VH-G". См. табл. 1 и фиг. 1.

Биспецифические антитела, содержащие первый связывающий агент, полученный из сконструированных анти-CD3 антител с обозначениями и описаниями, представленными в табл. 1, и второе связывающее плечо, полученное из анти-ТАА антител, были получены и испытаны на одновалентное сродство к клеткам, несущим CD3 в FACS анализе (как описано в примере 4). Результаты моновалентной аффинности связывания этих биспецифических антител показаны в двух правых столбцах табл. 1. В конкретных примерах биспецифические антитела, имеющие плечо связывания с ТАА и плечо связывания с CD3 с обозначениями "CD3-VH-G", "CD3-VH-G5" и "CD3-VH-G20" соответственно, связывали клетки Jurkat с EC_{50} 2,7 E-08, недетектируемое связывание и 5,5 E-07 соответственно.

Таблица 1

Мутации для CDR на основе последовательности зародышевой линии и соответствующие аффинности FACS связывания для каждого сконструированного антитела

Антитело Обозначение CD3-VH	Описание мутаций по сравнению с антителом CD3-VH-G*	JURKAT	Т-клетки яванского макака
CD3-VH-G	Каркасные области (FR) только зародышевой линии (GL); CDR-CD3-VHP	(+++)	(+++)
CD3-VH-G2	Все GL (FR и CDR).	(-)	(-)
CD3-VH-G3	Все GL (FR и CDR). Добавление A33S.	(-)	(-)
CD3-VH-G4	Все GL (FR и CDR). Добавление Y105K.	(-)	(-)
CD3-VH-G5	Все GL (FR и CDR). Добавление A33S и Y105K.	(-)	(-)
CD3-VH-G8	Каркасные области зародышевой линии. Добавление K58I.	(+++)	(+)
CD3-VH-G9	Каркасные области зародышевой линии. Добавление Y99D	(+)	(-)
CD3-VH-	Каркасные области зародышевой линии.	(+)	(-)

G10	Добавление H108Y.		
CD3-VH-G11	Каркасные области зародышевой линии. Добавление L111M.	(+++)	(+)
CD3-VH-G12	Каркасные области зародышевой линии. Добавление K58I, Y99D	(+ +)	(+/-)
CD3-VH-G13	Каркасные области зародышевой линии. Добавление K58I, H108Y	(+ +)	(+)
CD3-VH-G14	Каркасные области зародышевой линии. Добавление K58I, L111M	(+++)	(+ +)
CD3-VH-G15	Каркасные области зародышевой линии. Добавление Y99D,-H108Y	(+)	(-)
CD3-VH-G16	Каркасные области зародышевой линии. Добавление Y99D, L111M	(+ +)	(+/-)
CD3-VH-G17	Каркасные области зародышевой линии. Добавление H108Y, L111M	(+/-)	(+/-)
CD3-VH-G18	Каркасные области зародышевой линии. Добавление K58I, Y99D, H108Y	(+/-)	(-)
CD3-VH-G19	Каркасные области зародышевой линии. Добавление K58I, Y99D, L111M	(+/-)	(-)
CD3-VH-G20	Каркасные области зародышевой линии. Добавление K58I, H108Y, L111M	(+/-)	(+/-)
CD3-VH-G21	Каркасные области зародышевой линии. Добавление Y99D, H108Y,-L111M	(+/-)	(-)

* Последовательная нумерация на основе зрелого белка 7221G (CD3-VH-G).

В то время как CD3-VH-G и некоторые другие модифицированные антитела сохраняли свою аффинность связывания, как показано в FACS анализах, несколько анти-CD3 антител связывались *in vitro* с CD3 человека или яванского макака с аффинностью от слабой (+/-) до (-) неизмеримой. Аффинности связывания, кинетика связывания и другие биологические свойства для выяснения токсичности и фармакокинетических (PK) профилей были впоследствии исследованы для биспецифических антител, содержащих иллюстративные анти-CD3 антитела, полученные в соответствии с методами данного примера, и подробно описаны в примерах, изложенных ниже.

Пример 2. Варибельные области тяжелой и легкой цепей (аминокислотные и нуклеотидные последовательности CDR).

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности определяли для каждой последовательности тяжелой цепи антитела.

Каждой тяжелой цепи антитела, как производной последовательности зародышевой линииIGHV3-9*01/D5-12*01/J6*02 (SEQ ID NO: 181), было присвоено обозначение номера "G" для согласованной номенклатуры. В табл. 2 приведены идентификаторы аминокислотной последовательности варибельных областей тяжелой цепи и CDR сконструированных анти-CD3 антител по изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательности нуклеиновой кислоты приведены в табл. 3. Идентификаторы последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот варибельной области легкой цепи и CDR для конструирования каждого рекомбинантного антитела также идентифицированы ниже в табл. 4 и 5 соответственно.

Таблица 2

Идентификаторы аминокислотной последовательности тяжелой цепи

Антитело Обозначение CD3-VH	SEQ ID NO:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G	2	4	6	8
CD3-VH-G2	10	12	14	16
CD3-VH-G3	18	20	22	24
CD3-VH-G4	26	28	30	32
CD3-VH-G5	34	36	38	40
CD3-VH-G8	42	44	46	48
CD3-VH-G9	50	52	54	56
CD3-VH-G10	58	60	62	64
CD3-VH-G11	66	68	70	72
CD3-VH-G12	74	76	78	80
CD3-VH-G13	82	84	86	88
CD3-VH-G14	90	92	94	96
CD3-VH-G15	98	100	102	104
CD3-VH-G16	106	108	110	112
CD3-VH-G17	114	116	118	120
CD3-VH-G18	122	124	126	128
CD3-VH-G19	130	132	134	136
CD3-VH-G20	138	140	142	144
CD3-VH-G21	146	148	150	152
CD3-VH-P	154	156	158	160

Таблица 3

Идентификаторы последовательности нуклеиновых кислот тяжелой цепи

Антитело Обозначение CD3-VH	SEQ ID NO:			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3-VH-G	1	3	5	7
CD3-VH-G2	9	11	13	15
CD3-VH-G3	17	19	21	23
CD3-VH-G4	25	27	29	31
CD3-VH-G5	33	35	37	39
CD3-VH-G8	41	43	45	47
CD3-VH-G9	49	51	53	55
CD3-VH-G10	57	59	61	63
CD3-VH-G11	65	67	69	71
CD3-VH-G12	73	75	77	79
CD3-VH-G13	81	83	85	87
CD3-VH-G14	89	91	93	95
CD3-VH-G15	97	99	101	103
CD3-VH-G16	105	107	109	111
CD3-VH-G17	113	115	117	119
CD3-VH-G18	121	123	125	127
CD3-VH-G19	129	131	133	135
CD3-VH-G20	137	139	141	143
CD3-VH-G21	145	147	149	151
CD3-VH-P	153	155	157	159

Таблица 4

Идентификаторы аминокислотной последовательности легкой цепи

Антитело Обозначение ULC	SEQ ID NO:			
	LCVR	CDR1	CDR2	CDR3
Vk1-39JK5	162	164	166	168

Таблица 5

Идентификаторы последовательности нуклеиновых кислот легкой цепи

Антитело Обозначение ULC	SEQ ID NO:			
	LCVR	CDR1	CDR2	CDR3
Vk1-39JK5	161	163	165	167

Контрольное антитело 1, обозначенное как "CD3-L2K", было сконструировано на основе известного анти-CD3 антитела (т.е. анти-CD3 антитела "L2K", как изложено в WO 2004/106380).

Антитело изотипического контроля, указанное в приведенных ниже примерах, представляет собой антитело с идентичным изотипом (модифицированный IgG4), которое взаимодействует с нерелевантным антигеном, т.е. антигеном FeD1.

Пример 3. Создание биспецифических антител ULC, которые связывают CD3 и ассоциированные с опухолью антигены (ТАА).

Биспецифические антитела, содержащие анти-CD3-специфический связывающий домен и анти-ТАА-специфический связывающий домен, такой как PSMA, EGFRvIII, MUC16 или STEAP2, были сконструированы с использованием стандартных методик молекулярной биологии с использованием тяжелой цепи из описанного анти-CD3-антитела в данном случае тяжелой цепью из анти-ТАА антитела и обычной легкой цепью или универсальной легкой цепью (ULC). Анти-ТАА антитела, используемые для конструирования биспецифических антител по данному изобретению, получали путем иммунизации генетически модифицированных мышей.

Краткое изложение составных частей антигенсвязывающих доменов различных биспецифических антител, полученных в соответствии с данным примером, приведено в табл. 6-8. Все биспецифические антитела были изготовлены с модифицированным (химерным) доменом IgG4 Fc, как указано в публикации заявки на патент США № US20140243504A1, опубликованной 28 августа 2014 г. Иллюстративные биспецифические антитела EGFRvIIIхCD3 могут быть получены с использованием любой из переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи (или CDR) любого из антител EGFRvIII, обсуждаемых в публикации заявки на патент США № US20150259423, которая полностью включена в данное описание посредством ссылки в сочетании с переменными областями или CDR любого из анти-CD3 антител, обсуждаемых в данном документе.

Таблица 6

Создание биспецифических антител PSMAхCD3

Идентификатор биспецифического антитела	Антигенсвязывающий домен	Антигенсвязывающий домен	Общая переменная область легкой цепи
	анти-PSMA антитела	анти-CD3 антитела	

	<i>Варибельная область тяжелой цепи</i>	<i>Варибельная область тяжелой цепи</i>	
BSPSMA/CD3-003	PSMA-VH-B	CD3-VH-G	Vκ1-39JK5
BSPSMA/CD3-200		CD3-VH-G2	
BSPSMA/CD3-300		CD3-VH-G3	
BSPSMA/CD3-400		CD3-VH-G4	
BSPSMA/CD3-004		CD3-VH-G5	
BSPSMA/CD3-800		CD3-VH-G8	
BSPSMA/CD3-900		CD3-VH-G9	
BSPSMA/CD3-1000		CD3-VH-G10	
BSPSMA/CD3-1100		CD3-VH-G11	
BSPSMA/CD3-1200		CD3-VH-G12	
BSPSMA/CD3-1300		CD3-VH-G13	
BSPSMA/CD3-1400		CD3-VH-G14	
BSPSMA/CD3-1500		CD3-VH-G15	
BSPSMA/CD3-1600		CD3-VH-G16	
BSPSMA/CD3-1700		CD3-VH-G17	
BSPSMA/CD3-1800		CD3-VH-G18	
BSPSMA/CD3-1900		CD3-VH-G19	
BSPSMA/CD3-005		CD3-VH-G20	
BSPSMA/CD3-2100		CD3-VH-G21	

Таблица 7

Создание биспецифических антител EGFRvIIIхCD3

Идентификатор биспецифического антитела	<i>Антигенсвязывающий домен анти-EGFRvIII антитела</i>	<i>Антигенсвязывающий домен анти-CD3 антитела</i>	Общая варибельная область легкой цепи
	<i>Варибельная область тяжелой цепи</i>	<i>Варибельная область тяжелой цепи</i>	
BSV3/CD3-001	EGFRvIII-VH-A	CD3-VH-G	EGFRvIII-VL-A
BSV3/CD3-002		CD3-VH-G5	
BSV3/CD3-003		CD3-VH-G9	
BSV3/CD3-004		CD3-VH-G10	

Таблица 8

Создание биспецифических антител MUC16xCD3

Идентификатор биспецифического антитела	Антигенсвязывающий домен анти-MUC16 антитела	Антигенсвязывающий домен анти-CD3 антитела	Общая переменная область легкой цепи
	Переменная область тяжелой цепи	Переменная область тяжелой цепи	
BSMUC16/CD3-001	MUC16-VH-A	CD3-VH-G	MUC16-VL-A
BSMUC16/CD3-002		CD3-VH-G5	
BSMUC16/CD3-003		CD3-VH-G9	
BSMUC16/CD3-004		CD3-VH-G10	
BSMUC16/CD3-005		CD3-VH-G20	

Таблица 9

Создание биспецифических антител STEAP2xCD3

Идентификатор биспецифического антитела	Антигенсвязывающий домен анти-STEAP2 антитела	Антигенсвязывающий домен анти-CD3 антитела	Общая переменная область легкой цепи
	Переменная область тяжелой цепи	Переменная область тяжелой цепи	
BSSTEAP2/CD3-001	STEAP2-VH-A	CD3-VH-G	STEAP2-VL-A
BSSTEAP2/CD3-002		CD3-VH-G5	
BSSTEAP2/CD3-003		CD3-VH-G20	

Каждое из иллюстративных биспецифических антител тестировали в различных биоанализах, как описано ниже.

Пример 4. Аффинности связывания иллюстративных биспецифических антител, измеренные с помощью FACS анализа.

В данном примере определяли способность биспецифических антител CD3xTAA к связыванию с CD3-экспрессирующими клеточными линиями человека и яванского макака посредством FACS. Кроме того, была подтверждена способность данных биспецифических антител связываться с конкретными специфическими (TAA-специфическими) клеточными линиями. Как описано выше, различные биспецифические антитела по данному изобретению используют одно специфическое TAA связующее плечо (PSMA, EGFRvIII, MUC16 или STEAP2, см. пример 3, табл. 6-8) в паре с одной из панелей связывающего плеча анти-CD3 (см. примеры 1 и 2 выше) и общую легкую цепь. Как также показано в примере 5 посредством поверхностного плазмонного резонанса, биспецифические антитела CD3xTAA демонстрируют диапазон аффинностей к растворимому гетеродимеру белка hCD3ε/δmFc человека.

Кратко, 2×10^5 клеток/лунка клеток Jurkat, экспрессирующих CD3 человека, клеток яванского макака, специфически экспрессирующих T или TAA, инкубировали с серийными разведениями биспецифических антител в течение 30 мин при 4°C. После инкубации клетки промывали и добавляли к клеткам козы F(ab')₂ античеловеческие Fcγ PE меченые вторичные антитела (Jackson Immunolabs) на дополнительные 30 мин. Затем клетки промывали, повторно суспендировали в холодном PBS+1% BSA и анализировали с помощью проточной цитометрии на BD FACS Canto II.

Для FACS анализа клетки разделяли по высоте прямого рассеяния по сравнению с областью прямого рассеяния путем отбора по единичным событиям, за которыми следуют боковые и передние рассеиватели. EC₅₀ для титрования связывания клеток определяли с использованием программного обеспечения

PRISM™ (GraphPad Software, Inc., Ла Джолла, штат Калифорния). Значения были рассчитаны с использованием 4-параметрического нелинейного регрессионного анализа.

Таблица 10А

FACS связывание на CD3 и PSMA-специфических клеточных линиях

Идентификатор биспецифического антитела	Анти-CD3-связывающее плечо	Jurkat	Т-клетки яванского макака	B16F10.9/PSM A
		EC ₅₀ [M]	EC ₅₀ [M]	EC ₅₀ [M]
BSPSMA/CD3-003	CD3-VH-G	1,65E-08	1,42E-08	2,26E-09
BSPSMA/CD3-200	CD3-VH-G2	HC	HC	1,88E-09
BSPSMA/CD3-300	CD3-VH-G3	HC	HC	1,90E-09
BSPSMA/CD3-400	CD3-VH-G4	HC	HC	1,72E-09
BSPSMA/CD3-004	CD3-VH-G5	Очень слабое	HC	1,31E-09
BSPSMA/CD3-800	CD3-VH-G8	1,93E-08	1,96E-08	1,31E-09
BSPSMA/CD3-900	CD3-VH-G9	2,74E-07	HC	1,43E-09
BSPSMA/CD3-1000	CD3-VH-G10	2,77E-07	HC	1,19E-09
BSPSMA/CD3-1100	CD3-VH-G11	1,83E-08	8,90E-07	1,03E-09
BSPSMA/CD3-1200	CD3-VH-G12	4,72E-08	HC	1,16E-09
BSPSMA/CD3-1300	CD3-VH-G13	1,02E-07	2,17E-06	1,25E-09
BSPSMA/CD3-1400	CD3-VH-G14	3,19E-08	1,70E-07	1,30E-09
BSPSMA/CD3-1500	CD3-VH-G15	9,30E-08	HC	1,21E-09
BSPSMA/CD3-1600	CD3-VH-G16	5,68E-08	HC	1,03E-09
BSPSMA/CD3-1700	CD3-VH-G17	2,00E-07	3,35E-06	1,34E-09
BSPSMA/CD3-1800	CD3-VH-G18	1,26E-07	HC	2,16E-09
BSPSMA/CD3-1900	CD3-VH-G19	6,07E-08	HC	1,35E-09
BSPSMA/CD3-005	CD3-VH-G20	2,10E-07	6,14E-06	2,09E-09
BSPSMA/CD3-2100	CD3-VH-G21	1,06E-07	HC	1,14E-09

Таблица 10В

FACS связывание на CD3 и EGFRvIII-специфических клеточных линиях

Идентификатор биспецифического антитела	Анти-CD3-связывающее плечо	Jurkat	Т-клетки яванского макака	U87/EGFRvIII
		EC ₅₀ [M]	EC ₅₀ [M]	EC ₅₀ [M]
BSV3/CD3-001	CD3-VH-G	1,46E-09	HT	2,40E-09
BSV3/CD3-002	CD3-VH-G5	Очень слабое	HT	5,60E-09

Таблица 10С

FACS связывание на CD3 и MUC16-специфических клеточных линиях

Идентификатор биспецифического антитела	Анти-CD3-связывающее плечо	Jurkat	Т-клетки яванского макака	OVCAR3 (MUC16+)
		EC ₅₀ [M]	EC ₅₀ [M]	EC ₅₀ [M]
BSMUC16/CD3-001	CD3-VH-G	3,21E-09	HT	1,20E-09
BSMUC16/CD3-002	CD3-VH-G5	Очень слабое	HT	2,69E-09

Как показано в табл. 10А, связывающие плечи CD3 каждого биспецифического антитела CD3хPSMA отображают диапазон аффинности связывания с клетками Jurkat, экспрессирующими CD3 человека (диапазон EC₅₀ 15-300 нМ). Важно отметить, что плечи CD3, которые демонстрируют слабое связывание с гетеродимерным белком человека CD3 в поверхностном плазмонном резонансе (см. табл. 11), также коррелируют со слабым и не наблюдаемым связыванием на клетках Jurkat (т.е.

CD3-VH-G2, CD3-VH-G3, CD3-VH-G5). Не обнаруживаемое связывание или отсутствие обнаруживаемого связывания в FACS анализе или эквивалентном анализе означает, что сродство между антителом и его целевым антигеном выходит за пределы обнаружения анализа (например, >1 мкМ). Несколько CD3-связывающих плеч также проявляли перекрестную реактивность с Т-клетками яванского макака. Все тестируемые биспецифические антитела проявляли сходное связывание клеток на соответствующих линиях клеток PSMA, EGFRvIII и MUC16, подтверждающих, что биспецифическое спаривание с отдельными плечами CD3 не влияло или не уменьшало ТАА-специфическое связывание (ТАА-специфическое связывание было меньше или равно 5,6 нМ (высокая аффинность) во всех проверенных примерах).

Антитела, проявляющие слабое или недетектируемое связывание с CD3 человека, а также проявляющие слабое или недетектируемое связывание CD3 яванского макака, считаются выгодными для биспецифического спаривания, вызванного авидностью, в соответствии с данным изобретением и были дополнительно протестированы на цитотоксичность *in vitro* и *in vivo*.

Пример 5. Аффинности связывания иллюстративных биспецифических антител, измеренные с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса.

Аффинности связывания и кинетические константы биспецифических анти-ТАА антител × CD3 к растворимому гетеродимерному белку hCD3ε/δmFc (hCD3ε = UniProtKB/Swiss-Prot: P07766.2; SEQ ID NO: 169; hCD3δ = UniProtKB/Swiss-Prot: P04234.1, SEQ ID NO: 170) определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C с использованием либо формата захвата антигена (табл. 11), либо формата захвата антител (данные не представлены). В данном примере использовали биспецифические антитела BSPSMA/CD3, поскольку эти пары представляли использование более широкой панели антител для связывания CD3. Измерения проводились на приборе Sierra Sensors MASS-1.

В формате захвата антигена поверхность аминного датчика высокой плотности MASS-1 была дериватизирована поликлональным анти-IgG2a антителом мыши (Southern Biotech). Растворимый гетеродимерный белок CD3 захватывали и соответствующие антитела вводили по захваченному антигену.

Константы скорости кинетической ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем обработки и корректировки данных к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения для корректировки кривой MASS-1 AnalyserR2. Константы равновесия диссоциации связывания (K_D) и диссоциативные периоды полураспада ($t_{1/2}$) были рассчитаны по константам кинетической скорости:

$$K_D (M) = k_d/k_a \text{ и } t_{1/2} (\text{мин}) = (\ln 2)/(60 * k_d).$$

Таблица 11

Аффинности биспецифических анти-CD3 антител к растворимому CD3 человека

Идентификатор биспецифического о антитела	Связывание при 37 °C/Формат захват антигена				
	Соответствующий анти-CD3-антигенсвязывающий	k_a ($\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)	$T_{1/2}$ (мин)

	идентификатор HCVR				
BSPSMA/CD3-003	CD3-VH-G	1,32E+0 5	7,62E- 04	5,78E- 09	15,2
BSPSMA/CD3-200	CD3-VH-G2	HC	HC	HC	HC
BSPSMA/CD3-300	CD3-VH-G3	HC	HC	HC	HC
BSPSMA/CD3-400	CD3-VH-G4	HC	HC	HC	HC
BSPSMA/CD3-004	CD3-VH-G5	HC	HC	HC	HC
BSPSMA/CD3-800	CD3-VH-G8	5,95E+0 4	1,15E- 03	1,94E- 08	10,0
BSPSMA/CD3-900	CD3-VH-G9	4,38E+0 4	4,95E- 03	1,13E- 07	2,3
BSPSMA/CD3-1000	CD3-VH-G10	3,44E+0 4	6,37E- 03	1,85E- 07	1,8
BSPSMA/CD3-1100	CD3-VH-G11	9,21E+0 4	1,02E- 03	1,11E- 08	11,3
BSPSMA/CD3-1200	CD3-VH-G12	3,85E+0 4	2,47E- 03	6,42E- 08	4,7
BSPSMA/CD3-1300	CD3-VH-G13	2,03E+0 4	2,48E- 03	1,22E- 07	4,7
BSPSMA/CD3-1400	CD3-VH-G14	6,21E+0 4	3,31E- 03	5,33E- 08	3,5
BSPSMA/CD3-1500	CD3-VH-G15	7,36E+0 4	6,11E- 03	8,29E- 08	1,9
BSPSMA/CD3-1600	CD3-VH-G16	6,43E+0 4	2,43E- 03	3,78E- 08	4,7
BSPSMA/CD3-1700	CD3-VH-G17	4,70E+0 4	3,07E- 03	6,52E- 08	3,8
BSPSMA/CD3-1800	CD3-VH-G18	HC	HC	HC	HC
BSPSMA/CD3-1900	CD3-VH-G19	4,43E+0 4	5,09E- 03	1,15E- 07	2,3
BSPSMA/CD3-005	CD3-VH-G20	1,73E+0 4	5,77E- 03	3,34E- 07	2,0
BSPSMA/CD3-2100	CD3-VH-G21	3,02E+0 4	2,34E- 03	7,75E- 08	4,9
Контроль 1	CD3-L2K	3,68E+0 5	2,66E- 03	7,22E- 09	4,3

HC: Не обнаружено связывания.

Как показано в табл. 11, все полученные биспецифические анти-CD3х-анти-PSMA антитела сохраняют очень слабое связывание с растворимым CD3 в анализе связывания поверхностного плазмонного резонанса, например имея значение K_D от более чем 11 до 334 нМ, которое слабее, чем у биспецифического анти-CD3-плеча, полученного из каркасных областей зародышевой линии -CD3-VH-G.

Несколько биспецифических антител продемонстрировали значение K_D более 50 нМ, а некоторые значения K_D составляли более 100 нМ ($>1 \times 10^{-7}$) (т.е. BSPSMA/CD3-900, BSPSMA/CD3-1000, BSPSMA/CD3-1900), значения K_D более чем 300 нМ ($>3 \times 10^{-7}$) (т.е. BSPSMA/CD3-005) и даже за пределом обнаружения анализа (>500 нМ; $>5 \times 10^{-7}$), т.е. не обнаруживает обнаруживаемого связывания с растворимым CD3 человека (т.е. BSPSMA/CD3-200, BSPSMA/CD3-300, BSPSMA/CD3-400, BSPSMA/CD3-004 и BSPSMA/CD3-1800).

Пример 6. Активация Т-клеток и опухолеспецифическая цитотоксичность, проявляемая биспецифическими антителами по изобретению, умеренные *in vitro*.

В данном примере специфическое уничтожение экспрессирующих PSMA, EGFRvIII или MUC16 целевых клеток ТАА в присутствии биспецифических антител на основе CD3 исследовали с помощью проточной цитометрии. Как сообщалось ранее, биспецифические антитела проявляли диапазон аффинности к белку CD3 и CD3-экспрессирующей клеточные линии (т.е. слабое, умеренное и сильное связывание).

вание). Эта же группа биспецифических антител тестировалась на способность индуцировать наивные человеческие Т-клетки, чтобы перенаправить лизис на клетки, экспрессирующие мишень.

Кратко, PSMA-экспрессирующие (C4-2, 22Rv1 и TRAMPC2_PSMA), EGFRvIII-экспрессирующие (U87/EGFRvIII) или MUC16-экспрессирующие (OVCAR3) клеточные линии были помечены 1 мкМ флуоресцентного отслеживающего красителя Violet Cell Tracker.

После мечения клетки высевали на ночь при 37°C. Отдельно человеческие РВМС высевали в дополненную среду RPMI в количестве 1×10^6 клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37°C с целью обогащения лимфоцитов путем разрушения адгезивных макрофагов, дендритных клеток и некоторых моноцитов. На следующие сутки клетки-мишени были совместно инкубированы с адгезивными истощенными наивными РВМС (соотношение эффекторные/целевые клетки 4:1) и последовательным разведением соответствующих биспецифических антител или изотипического контроля (диапазон концентрации: от 66,7 нМ до 0,25 пМ) в течение 48 ч при 37°C. Клетки удаляли из планшета для культивирования клеток, используя буфер для диссоциации клеток без фермента, и анализировали с помощью FACS.

Для FACS анализа клетки окрашивали дальним красным клеточным трекером на мертвые/живые клетки (Invitrogen). В каждую лунку добавляли 5×10^5 счетных гранул непосредственно перед FACS анализом. Для каждого образца собирали 1×10^4 гранул. Для оценки специфичности лизиса клетки разделяли живые окрашенные фиолетовым популяции. Процент живой популяции регистрировался и использовался для расчета нормализованной выживаемости.

Активацию Т-клеток оценивали путем инкубации клеток с непосредственно конъюгированными антителами к CD2 и CD69 и путем представления процента активированных (CD69⁺) Т-клеток из общих Т-клеток (CD2⁺).

Как демонстрируют результаты в табл. 12А-12С, истощение ТАА-экспрессирующих клеток наблюдалось с использованием анти-PSMA, анти-EGFRvIII или анти-MUC16хCD3 биспецифических антител. Большинство тестируемых биспецифических антител активировали и направили Т-клетки человека, чтобы истощить клетки-мишени с помощью EC₅₀ в пиколярном диапазоне. Кроме того, наблюдаемый лизис (истощение) целевой клетки был связан с повышением регуляции клеток CD69 на CD2⁺ Т-клетках с пиколярной (пМ) EC₅₀.

Важно отметить, что результаты данного примера демонстрируют, что несколько биспецифических антител, которые использовали связывание с CD3, которое проявляло слабое или ненаблюдаемое связывание с CD3-белком или CD3-экспрессирующими клетками (т.е. CD3-VH-G5), все еще сохраняли способность активировать Т-клетки и проявляли сильную цитотоксичность опухолевых антиген-экспрессирующих клеток.

Таблица 12А

Цитотоксичность и свойства активации Т-клеток выбранных биспецифических антител PSMAxCD3

Идентификатор биспецифического антитела	Anti-CD3 связывающее плечо	истощение клеток С4-2 EC ₅₀ [М]	22RV1 истощение клеток EC ₅₀ [М]	TrampC2 . PSMA истощение клеток EC ₅₀ [М]	Активация Т-клеток EC ₅₀ [М]
BSPSMA/CD3-003	CD3-VH-G	1,03E-11	НТ	6,43E-12	1,23E-12
BSPSMA/CD3-200	CD3-VH-G2	НТ	Отсутствие активности	НТ	Отсутствие активности
BSPSMA/CD3-300	CD3-VH-G3	НТ	Очень слабое	НТ	1,85E-11
BSPSMA/CD3-400	CD3-VH-G4	НТ	Очень слабое	НТ	Очень слабое
BSPSMA/CD3-004	CD3-VH-G5	2,15E-11	6,31E-12	1,15E-11	1,34E-11
BSPSMA/CD3-800	CD3-VH-G8	НТ	НТ	9,27E-12	1,76E-12
BSPSMA/CD3-900	CD3-VH-G9	НТ	НТ	3,50E-12	1,12E-12
BSPSMA/CD3-1000	CD3-VH-G10	НТ	НТ	5,97E-12	1,28E-12
BSPSMA/CD3-1100	CD3-VH-G11	НТ	НТ	3,86E-12	1,11E-12
BSPSMA/CD3-1300	CD3-VH-G13	8,74E-12	НТ	НТ	2,31E-12
BSPSMA/CD3-1700	CD3-VH-G17	7,37E-12	2,07E-12	НТ	3,89E-12
BSPSMA/CD3-005	CD3-VH-G20	1,39E-11	8,32E-12	НТ	6,11E-12

НТ = не тестировалось.

Таблица 12В

Цитотоксичность и свойства активации Т-клеток выбранных биспецифических антител EGFRvIIIxCD3

Идентификатор биспецифического антитела	Анти-CD3 связывающее плечо	U87_EGFRvIII истощение клеток EC ₅₀ [М]	Активация Т-клеток EC ₅₀ [М]
BSV3/CD3-001	CD3-VH-G	3,64E-10	3,33E-11
BSV3/CD3-002	CD3-VH-G5	1,30E-09	1,13E-10

Таблица 12С

Цитотоксичность и свойства активации Т-клеток выбранных биспецифических антител MUC16xCD3

Идентификатор биспецифического антитела	Анти-CD3 связывающее плечо	OVCAR3 истощение клеток EC ₅₀ [М]	Активация Т-клеток EC ₅₀ [М]
BSV3/CD3-001	CD3-VH-G	2,24E-11	5,88E-12
BSV3/CD3-002	CD3-VH-G5	3,06E-11	1,01E-11

Пример 7. Биспецифические анти-PSMA/анти-CD3 антитела проявляют сильную противоопухолевую эффективность *in vivo*.

Для определения эффективности *in vivo* иллюстративных анти-PSMA/анти-CD3 биспецифических антител, идентифицированных как имеющие слабую или не обнаруживаемую аффинность связывания с CD3 человека и яванского макака, исследования проводили у мышей с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека. Дополнительные исследования также проводились у иммунокомпетентных мышей, несущих ксенотрансплантаты рака простаты мыши, сконструированные для экспрессии PSMA человека.

Эффективность анти-PSMA/анти-CD3 биспецифических антител в моделях ксенотрансплантата опухоли человека.

Для оценки эффективности *in vivo* анти-PSMA/анти-CD3 биспецифических антител в исследованиях ксенотрансплантата опухоли человека у мышей NOD ТКИД гамма (NSG) (Jackson Laboratories, Бар Харбор, штат Мэн) совместно имплантировали моноклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) вместе с опухолевыми клетками предстательной железы человека 22Rv1 или C4-2, которые эндогенно экспрессируют PSMA.

Кратко, 4×10^6 клеток 22Rv1 или 5×10^6 клеток C4-2 (MD Anderson, TX) были совместно имплантированы под кожу с 1×10^6 PBMC человека (ReachBio, LLC., Сизл, штат Вашингтон) в 50:50 смеси с матригелем (BD Biosciences) в правый бок самцов мышей NSG. В исследовании C4-2 мышам вводили интрапарентерально на 0, 4 и 7 сутки после имплантации опухоли с 0,1 мг/кг BSPSMA/CD3-003 или BSPSMA/CD3-005.

В дополнительной ксеногенной модели биспецифические анти-PSMA/анти-CD3 антитела тестировали на мышах, привитых гемопоэтическими стволовыми клетками CD34⁺ человека. Вкратце, новорожденные SIRP α BALB/c-Rag2-IL2 γ -(BRG) мыши были привиты клетками печени плода hCD34⁺. Спустя 3-6 месяцев hCD34-привитые мыши SIRP α BRG затем имплантировали C4-2-клетками (5×10^6 подкожно в матригеле). Через 8 суток мышам обрабатывали 10 мкг BSPSMA/CD3-004 или антителом изотипического контроля, после чего в течение всего исследования вводили дозы 2х/неделя.

Во всех исследованиях размер опухоли измеряли 2 раза в неделю с использованием суппортов и объема опухоли, рассчитанного как объем=(длина×ширина²)/2.

Как показывают результаты в табл. 13, биспецифические антитела, испытываемые в ксеногенных моделях, описанных выше, были эффективны для подавления роста опухоли по сравнению с изотипическим контролем.

Таблица 13

Подавление роста опухоли путем введения анти-PSMA/анти-CD3 биспецифических антител в ксеногенные модели мыши

Ксеногенная модель: подавление роста опухоли				
Модель опухоли/ штамм мыши	№ мыш/ группа лечения	Идентификатор биспецифического антитела	Доза	Конечный объем опухоли (мм ³) Среднее \pm SD
C4-2/ NSG	5	BSPSMA/CD3-003	0,1 мг/кг на 0, 4 и 7 сутки	0 \pm 0
	5	BSPSMA/CD3-005		0 \pm 0
	5	Изотипический контроль		960 \pm 660
C4-2/ SIRP α Balb/c-Rag2- IL2 γ - BRG привитые hCD34+ HSC	5	BSPSMA/CD3-004	1,0 мкг/мышь 2х/неделя	70 \pm 60
	5	Изотипический контроль		260 \pm 180

Эффективность анти-PSMA/анти-CD3 биспецифических антител в иммунокомпетентной опухолевой модели.

Кроме того, биспецифические анти-PSMA антитела/CD3 оценивали на противоопухолевую активность в иммунокомпетентной модели (предварительная заявка США № 62/083653, поданная 24 ноября 2014 г.). Мыши, гуманизированные для трех цепей ($\delta\gamma\epsilon$) CD3, также были гуманизированы для PSMA и имплантированы альтернативной клеточной линией мышинного рака простаты TRAMP-C2, трансфицированной PSMA человека.

Перед началом исследования был продуцирован вариант опухолевых клеточных линий TRAMP-C2_hPSMAv № 1. Кратко, $7,5 \times 10^6$ клеток TRAMP-C2_hPSMA имплантировали подкожно в правый бок самцов мышей, гуманизированных для CD3 и PSMA. Опухоль вырезали и разрезали на 3 мм фрагменты и впоследствии имплантировали в правый бок новых гуманизированных самцов мыши. Затем опухоль, образованную имплантированными опухолевыми фрагментами, собирали и дезагрегировали в одноклеточную суспензию. Эти клетки (TRAMP-C2_hPSMAv № 1) затем культивировали *in vitro* при выборе G418. 4×10^6 клеток этой вариантной клеточной линии затем имплантировали в правый бок сам-

цов мышей с PSMA/CD3-гуманизацией для исследований эффективности биспецифических антител.

Гуманизированных мышей PSMA/CD3, имплантированных TRAMPC2_hPSMAv № 1, обрабатывали 100 или 10 мкг биспецифического анти-PSMA/анти-CD3 антитела BSPSMA/CD3-004 или изотипическим контролем 2х/неделя, начиная со дня имплантации опухоли. Были также исследованы уровни цитокинов в сыворотке крови через 4 ч после инъекции, а также уровни Т-клеток селезенки. Исследование было прекращено на 27-е сутки.

Как демонстрируют результаты в табл. 14, анти-PSMA/анти-CD3 биспецифическая молекула, испытанная BSPSMA/CD3-004, продемонстрировала эффективность значительного замедления роста опухоли во всех группах лечения. Минимальное выделение цитокинов наблюдалось после введения BSPSMA/CD3-004, возможно, из-за слабого связывания анти-CD3 антител. Оба тестируемых антитела продемонстрировали противоопухолевую эффективность без истощения Т-клеток в селезенке.

Таблица 14

Эффективность анти-PSMA/анти-CD3 биспецифических антител в иммунокомпетентной сингенной модели

Модель опухоли/штамм мыши	Идентификатор биспецифического антитела	Доза (мкг/мышь) 2х/неделя*	N № мышь/ группа лечения	Объем опухоли (мм ³) на 27 сутки (Среднее ± SD)	Средние концентрации цитокинов в сыворотке, (пг/мл)					Уровень Т-клеток селезенки %, (среднее±SD)*	
					IFN γ	TNFα	IL-2	IL-12p70	IL-6	CD4+	CD8+
TRAMP-C2/ PSMA ^{Hum} /Hum CD3 ^{Hum}											
	BSPSMA/CD3-004	100	4	50 ± 60	30	60	60	40	370	8,0 ± 1,0	12,0 ± 2,0
		10	5	380 ± 650	10	50	50	10	330	8,0 ± 3,0	14,0 ± 4,0
	Изотипический контроль	100	5	1740 ± 560	4	30	30	10	230	5,0 ± 1,0	8,0 ± 2,0

* Мышам вводили антитело или изотипический контроль 2х/неделю, начиная со дня имплантации опухоли.

Измеряется как процент клеток CD4⁺ или CD8⁺ в селезенке из живых клеток mCD45⁺.

Таким образом, биспецифические анти-PSMA антитела/CD3 по данному изобретению проявляют сильную противоопухолевую эффективность как в иммунокомпрометированных, так и в иммунокомпетентных опухолевых моделях, несмотря на то, что они имеют низкое или не обнаруживаемое связывание с антигеном CD3.

Пример 8. Анти-MUC16/анти-CD3 биспецифические антитела проявляют сильную противоопухолевую эффективность *in vivo*.

Для определения эффективности *in vivo* иллюстративных анти-MUC16/анти-CD3 биспецифических антител, идентифицированных как имеющие слабую или не обнаруживаемую аффинность связывания с CD3 человека и яванского макака, исследования проводили у мышей с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека. Эффективность выбранных биспецифических антител тестировалась как в способах дозирования, так и при терапевтическом лечении.

Эффективность анти-MUC16/анти-CD3 биспецифических антител в моделях ксенотрансплантата опухоли человека.

Для оценки эффективности *in vivo* анти-MUC16/анти-CD3 биспецифических антител в исследованиях ксенотрансплантата опухоли человека, мышам NOD ТКИД гамма (NSG) (Jackson Laboratories, Бар Харбор, штат Мэн) были предварительно имплантированы мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC; ReachBio LLC., Сиэтл, штат Вашингтон), а затем введенные асцитные клетки из линии клеток рака яичника человека OVCAR-3 (Американская коллекция типовых культур, Манассас, штат Виргиния) трансдуцировали люциферазой (OVCAR-3/Luc). Клетки OVCAR-3 эндогенно экспрессируют MUC-16.

Кратко, мышам NSG инъекцировали внутрибрюшинно (в.б.) $5,0 \times 10^6$ PBMC человека. Спустя 8 суток $1,5 \times 10^6$ асцитных клеток из клеточной линии OVCAR-3/Luc, ранее пассированных *in vivo*, вводили в.б. мышам NSG, привитым с помощью PBMC. В группе немедленного лечения мышам вводили в.б. в день

имплантации клеток OVCAR-3/Лус анти-MUC16/анти-CD3, анти-BSMUC16/анти-CD3-001 или анти-BSMUC16/анти-CD3-005 биспецифические антитела или изотипический контроль в дозе 10 мкг/мышь (N=5 мышей/группа лечения). В модели терапевтических доз мышам вводили в.б. на 7 сутки после имплантации опухоли биспецифические или контрольные антитела MUC16/CD3, описанными выше, в дозе 10 мкг/мышь (N=5/группа лечения).

Во всех исследованиях рост опухоли контролировали с помощью биолуминесцентной визуализации (BLI). Мышам вводили в.б. субстрат люциферазы D-люциферин, суспендированный в PBS (150 мг/кг) и визуализированным под изофлурановой анестезией через 10 мин. BLI проводили с использованием системы Xenogen IVIS (Perkin Elmer, Хопкинтон, штат Массачусетс), а сигналы BLI были получены с использованием программного обеспечения Living Image (Xenogen/Perkin Elmer). Интересующие области были нарисованы вокруг каждой клеточной массы, а интенсивности фотонов регистрировались как фотоны(р)/секунды(с)/см²/стерадиан(срад). Для группы немедленной терапии данные представлены как уровни BLI на 26 сутки после имплантации опухоли (табл. 15). Для группы терапевтического лечения данные представлены как кратные изменения в BLI между 6 сутками (1 сутки перед лечением) и в конечной точке исследования (26 суток после имплантации опухоли, табл. 16).

Как показывают результаты, оба BSMUC16/CD3-001 и BSMUC16/CD3-005 продемонстрировали схожую эффективность в подавлении роста опухоли по сравнению с изотипическим контролем, когда BLI измеряли на 26 сутки в модели немедленного дозирования. Оба анти-MUC16/анти-CD3 биспецифических антитела также подавляли рост развившихся опухолей на 7 сутки после имплантации опухоли по сравнению с контролем. Таким образом, анти-MUC16/анти-CD3 биспецифические антитела по данному изобретению проявляют сильную противоопухолевую эффективность в нескольких моделях.

Таблица 15

Эффективность анти-MUC16/анти-CD3 биспецифических антител
в иммунокомпетентной модели ксенотрансплантата.
Немедленное дозирование

Модель опухоли/Штамм мыши/Доза	Идентификатор биспецифического антитела	N	Среднее биолуминесцентное излучение (фотоны/сек/см ² /стерадиан) 26 сутки (Среднее ± SD)
OVCAR-3/Лус/NSG/10 мкг/мышь	BSMUC16/CD3-001	5	$1,4 \times 10^3 \pm 3,5 \times 10^2$
	BSMUC16/CD3-005	5	$1,5 \times 10^3 \pm 9,7 \times 10^2$
	Изотипический контроль	5	$2,0 \times 10^7 \pm 1,0 \times 10^6$

Таблица 16

Эффективность анти-Muc16/анти-CD3 биспецифических антител против в иммунокомпрометированной модели ксенотрансплантата. Терапевтическое лечение

Модель опухоли/Штамм мыши/ Доза	Идентификатор биспецифического антитела	N	Кратное изменение в среднем биолюминесцентном излучении [р/с/см ² /sr] на 26 сутки по сравнению с 6 сутками (Среднее ± SD)
OVCAR-3/Luc/ NSG/10 мкг/мышь	BSMUC16/CD3-001	5	2,0 ± 5,0
	BSMUC16/CD3-005	5	0,01 ± 0,02
	Изотипический контроль	5	21,0 ± 8,0

Пример 9. Фармакокинетическая оценка анти-MUC16 х анти-CD3 биспецифических антител.

Оценка фармакокинетики анти-MUC16ханти-CD3 биспецифических антител BSMUC16/CD3-001 и BSMUC16/CD3-005 и изотипического контроля проводилась у гуманизированных мышей MUC16хCD3 (мышей, гомозиготных относительно экспрессии MUC16 и CD3 человека, MUC16^{hu/hu}хCD3^{hu/hu}), гуманизированных мышей CD3 (мышей, гомозиготных относительно экспрессии CD3 человека, CD3^{hu/hu}) и контрольного штамма мышей (75% C57BL, 25% 129Sv) дикого типа (ДТ). Когорта содержала 4-5 мышей на тестируемое антитело и на штамм мыши. Все мыши получали единичную внутрибрюшинную (в.б.) дозу, равную 0,4 мг/кг. Образцы крови собирали через 3 и 6 ч, 1, 3, 7, 14 и 28 суток после дозирования. Кровь обрабатывали до сыворотки и замораживали при -80°C до анализа.

Концентрации циркулирующих антител определяли путем общего анализа антител к IgG человека с использованием GyroLab xPlore™ (Gyros, Упсала, Швеция). Вкратце, биотинилированное козьё античеловеческое поликлональное антитело IgG (Jackson ImmunoResearch, Вест Гроув, штат Пенсильвания) было помещено на гранулы, покрытые стрептавидином, на Gyrolab Bioaffy 200 CD (Gyros), чтобы захватить IgG человека, присутствующий в сыворотке крови. После захвата аффинной колонки связанное антитело IgG человека в образцах было обнаружено с помощью Alexa-647, помеченного козьим античеловеческим IgG (Jackson ImmunoResearch). Флуоресцентный сигнал на колонке, необходимый для обнаружения связанных IgG и единиц ответа (RU), считывался прибором. Концентрации проб определяли интерполяцией по стандартной кривой, которая была подобрана с использованием 5-параметрической логистической кривой с использованием программного обеспечения Gyrolab Evaluator.

Параметры ПК определяли с помощью некомпартментного анализа (NCA) с использованием программного обеспечения Phoenix®WinNonlin® версии 6.3 (Certara, L.P., Принцетон, штат Нью-Джерси) и экстравакулярной дозирочной модели. Используя соответствующие средние значения концентрации для каждого антитела, все параметры ПК, включая наблюдаемую максимальную концентрацию в сыворотке (C_{max}), предполагаемый период полувыведения (t_{1/2}) и площадь под кривой концентрации в зависимости от времени до последней измеряемой концентрации (AUC_{last}) были определены с использованием линейного трапециевидного правила с линейной интерполяцией и равномерного взвешивания.

После в.б. введения антител у мышей ДТ общие профили времени концентрации IgG BSMUC16/CD3-001, BSMUC16/CD3-005 и изотипического контроля были одинаковыми, характеризующимися сначала кратковременным распределением лекарственного средства, за которым следует одна фаза элиминации лекарственного средства во всем остатке исследования. Максимальная концентрация в сыворотке (C_{max}) и расчетное лекарственное воздействие (AUC_{last}) от трех антител были сопоставимы (в 1,3 раза друг от друга).

После в.б. введения антител мышам CD3^{hu/hu} BSMUC16/CD3-001, BSMUC16/CD3-005 и изотипический контроль имели сопоставимые концентрации C_{max} (4,6, 3,6 и 4,1 мкг/мл соответственно). BSMUC16/CD3-005 и изотипический контроль демонстрировали аналогичные кривые элиминации лекарственного средства, тогда как BSMUC16/CD3-001 проявляли более резкую элиминацию лекарственного средства, чем оба, предполагая, что связывание с мишенью CD3 человека вызывает клиренс. Конечная концентрация антител для BSMUC16/CD3-001 составляла 0,03 мкг/мл, что примерно в 28 раз меньше конечных концентраций антител, определенных для изотипического контроля (0,85 мкг/мл) и в 22 раза меньше, чем BSMUC16/CD3-005 (0,66 мкг/мл).

У дважды гуманизированных мышей MUC16^{hu/hu}хCD3^{hu/hu}, биспецифическое антитело Muc16хCD3 и антитело изотипического контроля имели сопоставимые концентрации C_{max} (C_{max} в пределах 4,5-6,9 мкг/мл). Оба биспецифических антитела проявляли более высокое удаление лекарственного средства, чем изотипический контроль, подтверждая эффект, опосредованный мишенью. Конечная концентрация антител для BSMUC16/CD3-001 и BSMUC16/CD3-005 была в около 29 раз и в 2,9 раза меньше, чем конечная концентрация антител, определенная для изотипического контроля (0,86 мкг/мл).

Краткое изложение данных для общих концентраций анти-MUC16ханти-CD3 биспецифических антител и антитела изотипического контроля представлено в табл. 17. Средние параметры PK описаны в табл. 18А и 18В. Средние общие концентрации антител против времени представлены на фиг. 2А-2С. В заключение, биспецифические антитела MUC16хCD3 демонстрировали сходные C_{max} и кривые элиминации лекарственного средства у мышей ДТ, но BSMUC16/CD3-001 продемонстрировало более высокие скорости элиминации, чем BSMUC16/CD3-005, и изотипический контроль у единично гуманизированных CD3 мышей и мышей с двойной гуманизацией MUC16/CD3. Поскольку биспецифические антитела, вводимые в данном исследовании PK, состоят из одного и того же анти-MUC16 связывающего плеча, результаты демонстрируют, что сила связывания CD3-нацеливающего плеча может играть роль в уровнях воздействия лекарственного средства (AUC_{last}) и скорости элиминации лекарственного средства. Ни BSMUC16/CD3-001, ни BSMUC16/CD3-005 не связывают MUC16 мыши или CD3 мыши.

Таблица 17

Средние концентрации общего IgG в сыворотке
после однократной 0,4 мг/кг внутрибрюшинной инъекции
BSMUC16/CD3-001, BSMUC16/CD3-005 и антител
изотипического контроля у мышей ДТ, гуманизированных CD3 мышей и
гуманизированных MUC16хCD3 мышей

Антител о	Время (д)	Общая концентрация mAb в сыворотке мыши					
		ДТ		CD3 ^{hu/hu}		MUC16 ^{hu/hu} x CD3 ^{hu/hu}	
		Сред нее (мкг /мл)	+/- SD	Средн ее (мкг/ мл)	+/- SD	Средне е (мкг/м л)	+/- SD
BSMUC16 /CD3- 001	0,13	5,39	0,34	4,30	0,29	6,77	1,52
	0,25	5,80	0,36	4,26	1,07	6,63	1,06
	1,00	4,13	0,43	2,87	0,71	4,89	0,53
	3,00	3,19	0,53	1,44	0,27	2,50	0,22
	7,00	2,61	0,73	0,72	0,13	1,20	0,22
	14,00	1,44	0,69	0,18	0,05	0,28	0,08
	21,00	0,93	NO	0,07	0,02	0,06	0,05

	28,00	0,60	НО	0,04	0,01	0,03	0,02
BSMUC16 /CD3- 005	0,13	4,23	0,62	3,35	1,15	4,35	0,24
	0,25	4,53	0,55	3,40	0,96	4,45	0,49
	1,00	3,47	0,32	2,72	0,42	3,00	0,61
	3,00	2,51	0,13	1,95	0,37	1,98	0,41
	7,00	2,02	0,24	2,31	0,67	1,58	0,36
	14,00	1,19	0,17	1,01	0,23	0,78	0,26
	21,00	1,19	0,29	1,19	0,11	0,66	0,29
	28,00	0,71	0,20	0,66	0,28	0,30	0,22
Изотипи ческий контрол ь	0,13	5,07	1,16	5,43	1,30	6,56	0,70
	0,25	5,91	1,10	5,67	1,91	6,48	0,90
	1,00	2,64	0,24	2,98	1,14	2,82	0,30
	3,00	2,05	0,06	2,29	0,83	1,57	0,37
	7,00	1,80	0,25	2,14	0,85	1,96	0,37
	14,00	1,22	0,28	1,48	0,66	1,34	0,37
	21,00	1,20	0,58	1,43	0,72	1,24	0,44
	28,00	0,73	0,24	0,85	0,29	0,86	0,41

Время: (г, когда отмечается) = время в часах после однократной инъекции;

Д = день исследования;

SD = стандартное отклонение;

НО = не определено из-за исключения мышей с отрицательными титрами клиренса лекарственного средства.

Таблица 18А

Сводка фармакокинетических параметров:
Гуманизированные мыши CD3^{hu/hu}

Пара- метр	Еди- ницы	Мышь ДТ			Мышь CD3 ^{hu/hu}		
		Изотипи ческий контрол ь	BSMUC16 / CD3-001	BSMUC1 6/ CD3- 005	Изотипи ческий контрол ь	BSMUC16 /CD3- 001	BSMUC16 /CD3- 005
C _{max}	мкг/мл	5 ± 3	6 ± 0,4	5 ± 0,5	4,1 ± 3	4,6 ± 0,8	3,5 ± 1
T _{1/2}	д	11 ± 4	7 ± 3	12 ± 2	14 ± 0,5	3,9 ± 0,6	11 ± 5
AUC _{last}	д•мкг /мл	35 ± 18	40 ± 11	45 ± 5	49 ± 20	16 ± 3	36 ± 13

C_{max} = пиковая концентрация;

AUC = площадь под кривой концентрации-времени;

AUC_{last} = AUC, рассчитанная с момента времени до момента последней положительной концентрации;

T_{1/2} = предполагаемый период полувыведения;

д = день.

Таблица 18В

Сводка фармакокинетических параметров:
Дважды гуманизированные мыши MUC16^{hu/hu}хCD3^{hu/hu}

Параметр	Единицы	Мышь ДТ			Мыши MUC16 ^{hu/hu} х CD3 ^{hu/hu}		
		Изотипический контроль	BSMUC16 /CD3-001	BSMUC16 /CD3-005	Изотипически контроль	BSMUC16 /CD3-001	BSMUC16 /CD3-005
C _{max}	мкг/мл	5 ± 3	6 ± 0,4	5 ± 0,5	6,7 ± 0,7	6,9 ± 1	4,5 ± 4
T _{1/2}	д	11 ± 4	7 ± 3	12 ± 2	12,9 ± 4	3,3 ± 0,8	8,2 ± 4
AUC _{last}	д•мкг/мл	35 ± 18	40 ± 11	45 ± 5	46 ± 10	27 ± 3	34 ± 11

C_{max} = пиковая концентрация;

AUC = площадь под кривой концентрации-времени;

AUC_{last} = AUC, рассчитанная с момента времени до момента последней положительной концентрации;

T_{1/2} = предполагаемый период полувыведения;

d = день.

Пример 10. Анти-STEAP2/анти-CD3 биспецифические антитела проявляют сильную противоопухолевую эффективность *in vivo*.

Для определения эффективности *in vivo* иллюстративных анти-STEAP2/анти-CD3 биспецифических антител, идентифицированных как имеющие слабую или не обнаруживаемую аффинность связывания с CD3 человека и яванского макака, исследования проводили у мышей с ослабленным иммунитетом, несущих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека.

Для оценки эффективности *in vivo* анти-STEAP2/анти-CD3 биспецифических антител в исследованиях ксенотрансплантата опухоли человека у мышей NOD ТКИД гамма (NSG) (Jackson Laboratories, Бар Харбор, штат Мэн) совместно имплантировали моноклеарные клетки периферической крови человека (PBMC; ReachBio LLC., Сиэтл, штат Вашингтон) вместе с опухолевыми клетками предстательной железы человека C4-2 (MD Anderson Cancer Center, Хьюстон, штат Техас), которые эндогенно экспрессируют STEAP2.

Кратко, $5,0 \times 10^6$ клеток C4-2 были совместно имплантированы подкожно (п.к.) с $1,25 \times 10^6$ PBMC человека в 50:50 смеси матригеля (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния) в правый бок самцов мышей NSG. Мышей лечили внутривенно (в.в.) в день имплантации (модель немедленного лечения) с помощью анти-STEAP2/анти-CD3 биспецифических антител BSSTEAP2/CD3-001, BSSTEAP2/CD3-002 или BSSTEAP2/CD3-003 или антитела изотипического контроля (что не связывают опухолевые клетки C4-2) в дозе 0,1 или 0,01 мг/кг (N=5 мышей/группа).

Размер опухоли измеряли 2 раза в неделю с использованием суппортов и объема опухоли, рассчитанного как объем=(длина×ширина²)/2. Данные представлены как размер опухоли (мм³) в конечной точке исследования, 46 сутки после имплантации опухоли (табл. 19).

Как показывают результаты, приведенные в табл. 19, BSSTEAP2/CD3-001, BSSTEAP2/CD3-002 и BSSTEAP2/CD3-003 значительно подавляют рост опухоли по сравнению с изотипическим контролем, когда размеры опухоли измерялись в конечной точке исследования. Важно отметить, что анти-STEAP2/анти-CD3 биспецифические антитела были эффективны в ингибировании роста опухоли C4-2 даже при самой низкой дозе, равной 0,1 мг/кг.

Таблица 19

Эффективность анти-STEAP2/анти-CD3 биспецифических антител
в иммунокомпрометированной модели ксенотрансплантата.

Немедленное дозирование

Модель опухоли/ штамм мышь/ мыши/	Идентификатор биспецифического антитела	Доза (мг/кг)	N	Размер опухоли (мм ³) 46 сутки после имплантации опухоли (Среднее ± SD)
C4-2 / NSG	BSSTEAP2/CD3-001	0,1	5	18,0 ± 14,0
		0,01	5	23,0 ± 22,0
	BSSTEAP2/CD3-002	0,1	5	15,0 ± 12,0
		0,01	5	17,0 ± 8,0
	BSSTEAP2/CD3-003	0,1	5	19,0 ± 12,0
		0,01	5	25,0 ± 21,0
Биспецифический контроль	0,1	5	1020,0 ± 922,0	

Данное изобретение не должно ограничиваться в объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые описаны в данном документе, станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих фигур. Такие модификации предназначены для охвата прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Цитотоксическое биспецифическое антитело, содержащее первое антигенсвязывающее плечо, которое проявляет от слабого до недетектируемого связывания с CD3 человека и CD3 яванского макака, и второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает опухолеассоциированный антиген, где указанное первое плечо содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую области, определяющие комплементарность, HCDR1-HCDR2-HCDR3, содержащие соответственно аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 36-38-40 или SEQ ID NO: 140-142-144, и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую области, определяющие комплементарность, LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащие соответственно аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 164-166-168, или указанная легкая цепь представляет собой когнатную легкую цепь второго антигенсвязывающего плеча, которое связывает опухолеассоциированный антиген.

2. Биспецифическое антитело по п.1, где указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162.

3. Биспецифическое антитело по п.1 или 2, где указанное первое антигенсвязывающее плечо содержит области, определяющие комплементарность, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащие соответственно аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 36-38-40-164-166-168.

4. Биспецифическое антитело по п.1 или 2, где указанное первое антигенсвязывающее плечо содержит области, определяющие комплементарность, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащие соответственно аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 140-142-144-164-166-168.

5. Биспецифическое антитело по п.2, где указанное биспецифическое антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34/162.

6. Биспецифическое антитело по п.2, где указанное биспецифическое антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 138/162.

7. Применение цитотоксического биспецифического антитела для лечения рака у субъекта, где указанное биспецифическое антитело содержит первое антигенсвязывающее плечо, которое проявляет от слабого до недетектируемого связывания с CD3 человека и CD3 яванского макака, и второе антигенсвязывающее плечо, которое связывает опухолеассоциированный антиген, где указанное первое плечо содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую области, определяющие комплементарность, HCDR1-HCDR2-HCDR3, содержащие соответственно аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 36-38-40 или SEQ ID NO: 140-142-144, и легкую цепь, где указанная легкая цепь содержит

вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую области, определяющие комплементарность, LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащие соответственно аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 164-166-168, или указанная легкая цепь представляет собой когнатную легкую цепь второго антигенсвязывающего плеча, которое связывает опухолеассоциированный антиген.

8. Применение по п.7, где указанное биспецифическое антитело проявляет активацию Т-клеток *in vitro*.

9. Применение по п.7 или 8, где указанный опухолеассоциированный антиген экспрессирован на опухолевой клетке человека.

10. Применение по любому из пп.7-9, где указанное биспецифическое антитело индуцирует опосредованный Т-клетками лизис опухолевых клеток с величиной EC₅₀, равной менее чем около 1,3 нМ, как измерено в анализе опосредованного Т-клетками лизиса опухолевых клеток *in vitro*.

11. Применение по любому из пп.7-10, где указанный опухолеассоциированный антиген выбран из группы, состоящей из AFP, ALK, белков BAGE, BIRC5 (сурвивин), BIRC7, β-катенина, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразы IX, каспазы-8, CALR, CCR5, CD19, CD20 (MS4A1), CD22, CD30, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, циклина-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, белков GAGE (например, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, глипикана-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, белков MAGE (например, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 и -12), MART-1, мезотелина, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), белков RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TGF-β, TMPRSS2, антигена "Thompson-nouvelle" (Tn), TRP-1, TRP-2, тирозиназы и уроплакина-3.

12. Применение по п.11, где опухолеассоциированный антиген представляет собой CD20, EGFRvIII, PSMA (FOLH1), STEAP2 или MUC16.

13. Применение по любому из пп.7-12, где указанная LCVR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162.

14. Применение по любому из пп.7-13, где указанное первое антигенсвязывающее плечо содержит области, определяющие комплементарность, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащие соответственно аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 36-38-40-164-166-168.

15. Применение по любому из пп.7-13, где указанное первое антигенсвязывающее плечо содержит области, определяющие комплементарность, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащие соответственно аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 140-142-144-164-166-168.

16. Применение по п.13, где указанное биспецифическое антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34/162.

17. Применение по п.13, где указанное биспецифическое антитело содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 138/162.

18. Фармацевтическая композиция для лечения рака у субъекта, содержащая цитотоксическое биспецифическое антитело по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

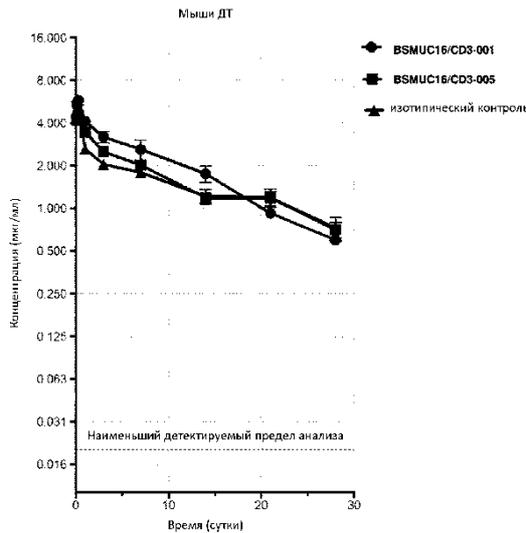
19. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.18.

20. Способ по п.19, где рак выбирают из группы, включающей рак поджелудочной железы, меланому, глиобластому, рак головы и шеи, рак предстательной железы, злокачественные глиомы, остеосаркому, колоректальный рак, рак желудка, злокачественную мезотелиому, множественную миелому, рак яичника, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, синовиальную саркому, рак щитовидной железы, рак молочной железы, меланоманглиому, рак молочной железы, плоскоклеточную карциному, рак пищевода, светлоклеточную почечно-клеточную карциному, хромофобную почечно-клеточную карциному, почечную онкоцитому, почечную транзиторно-клеточную карциному, уротелиальную карциному, аденокарциному, мелкоклеточную карциному или первичные или метастатические опухоли иммунной системы.

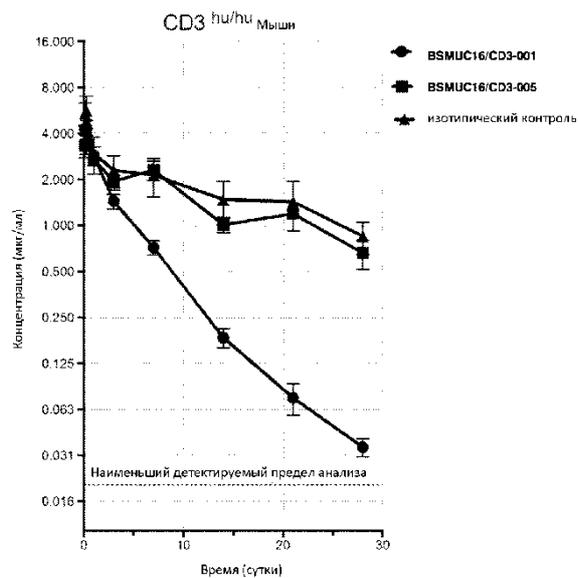
	Каркасная область 1	CDR 1	Каркасная область 2	CDR 2
Зародышевая линия h1gHV	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-P	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G2	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G3	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G4	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G5	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G8	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G9	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G10	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G11	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G12	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G13	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G14	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G15	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G16	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G17	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G18	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G19	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G20	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			
CD3-VH-G21	EVQLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFTTDDYSMHWVROAPGKGLIEWVSGISWNSGGSI			

	Каркасная область 3	CDR 3	Каркасная область 4
Зародышевая линия h1gHV	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-P	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G2	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G3	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G4	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G5	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G8	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G9	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G10	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G11	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G12	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G13	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G14	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G15	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G16	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G17	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G18	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G19	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G20	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS
CD3-VH-G21	GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNISRAEDTALYYCAKDI	SGYGYFYYCLD	VWGGQTTVTIVSS

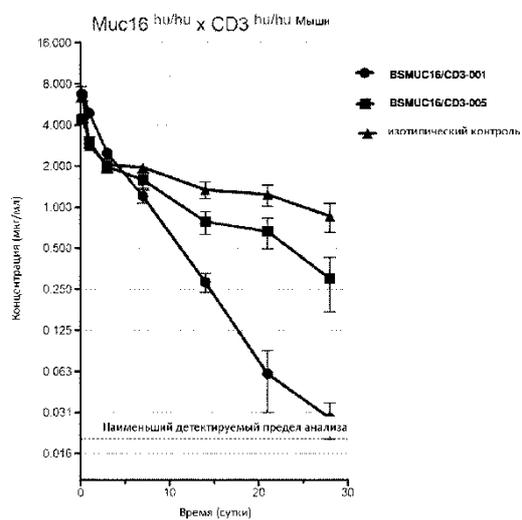
Фиг. 1



Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 2С

