

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042472**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.16

(21) Номер заявки
201792573

(22) Дата подачи заявки
2016.05.20

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) ТРИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗАННЫЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/165,153; 62/165,833; 62/305,088

(32) 2015.05.21; 2015.05.22; 2016.03.08

(33) US

(43) 2018.04.30

(86) PCT/US2016/033644

(87) WO 2016/187594 2016.11.24

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

(72) Изобретатель:
**Бёуэрле Патрик (DE), Евнин Люк,
Гуно Жанмари, Рамакришнан
Ванитха, Веше Хольгер (US)**

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

(56) US-A1-20130017200

(57) Настоящее изобретение относится к триспецифическим антигенсвязывающим белкам, содержащим домен, связывающийся с CD3, домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, и домен связывания антигена-мишени. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям на их основе, а также нуклеиновым кислотам, рекомбинантным экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для изготовления таких триспецифических антигенсвязывающих белков. Настоящее изобретение также относится к способам применения раскрытых триспецифических антигенсвязывающих белков в профилактике и/или лечении заболеваний, состояний и расстройств.

B1**042472****042472****B1**

Перекрестная ссылка

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/305 088, поданной 8 марта 2016 года; предварительной заявки США № 62/165 833, поданной 22 мая 2015 года; и предварительной заявки США № 62/165, 153, поданной 21 мая 2015 года, причем все заявки включены в настоящее описание посредством отсылки во всей их полноте.

Перечень последовательностей

В настоящей заявке содержится список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Упомянутая копия ASCII, созданная 17 мая 2016 года, называется 47517_701_601_SL.txt и имеет размер 128512 байтов.

Уровень техники

Селективное разрушение отдельной клетки или клеток определенного типа часто желательно в различных клинических ситуациях. Например, основной целью терапии рака является специфическое уничтожение опухолевых клеток с оставлением здоровых клеток и тканей нетронутыми и неповрежденными. Один из таких способов терапии заключается в индуцировании иммунного ответа против опухоли с тем, чтобы заставить иммунные эффекторные клетки, такие как естественные клетки-киллеры (natural killer (NK) cells) или цитотоксические Т-лимфоциты (cytotoxic T lymphocytes (CTL)), атаковать и разрушать опухолевые клетки.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к триспецифическому антигенсвязывающему белку, его фармацевтическим композициям, а также нуклеиновым кислотам, рекомбинантным экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения таких триспецифических антигенсвязывающих белков и способам применения для лечения заболеваний, расстройств или состояний. В одном аспекте настоящее изобретение относится к триспецифическим антигенсвязывающим белкам, причем упомянутые белки включают:

(a) первый домен (А), который специфически связывается с CD3 человека;

(b) второй домен (В), который представляет собой домен, служащий для удлинения периода полувыведения; и

(с) третий домен (С), который специфически связывается с антигеном-мишенью, причем данные домены связаны в порядке $H_2N-(A)-(B)-(C)-COOH$, $H_2N-(A)-(C)-(B)-COOH$, $H_2N-(B)-(A)-(C)-COOH$, $H_2N-(B)-(C)-(A)-COOH$, $H_2N-(C)-(B)-(A)-COOH$ или $H_2N-(C)-(A)-(B)-COOH$ с помощью линкеров L1 и L2.

В определенных аспектах настоящее изобретение также относится к триспецифическим антигенсвязывающим белкам, причем упомянутые белки включают:

(a) первый домен (А), который специфически связывается с CD3 человека;

(b) второй домен (В), который представляет собой домен, служащий для удлинения периода полувыведения; и

(с) третий домен (С), который специфически связывается с антигеном-мишенью, причем данные домены связаны в порядке $H_2N-(A)-(C)-(B)-COOH$, $H_2N-(B)-(A)-(C)-COOH$ или $H_2N-(C)-(B)-(A)-COOH$ с помощью линкеров L1 и L2.

В определенных аспектах настоящее изобретение также относится к триспецифическим антигенсвязывающим белкам, причем упомянутые белки включают:

(a) первый домен (А), который специфически связывается с CD3 человека;

(b) второй домен (В), который представляет собой домен, служащий для удлинения периода полувыведения; и

(с) третий домен (С), который специфически связывается с антигеном-мишенью, причем данные домены связаны в порядке $H_2N-(A)-(B)-(C)-COOH$, $H_2N-(A)-(C)-(B)-COOH$, $H_2N-(B)-(A)-(C)-COOH$, $H_2N-(B)-(C)-(A)-COOH$, $H_2N-(C)-(B)-(A)-COOH$ или $H_2N-(C)-(A)-(B)-COOH$ с помощью линкеров L1 и L2, и где первый домен связывается с CD3 человека с K_D , превышающей 100 нМ.

В определенных аспектах настоящее изобретение также относится к триспецифическим антигенсвязывающим белкам, причем упомянутые белки включают:

(a) первый домен (А), который специфически связывается с CD3 человека;

(b) второй домен (В), который представляет собой домен, служащий для удлинения периода полувыведения; и

(с) третий домен (С), который специфически связывается с антигеном-мишенью, причем данные домены связаны в порядке $H_2N-(A)-(B)-(C)-COOH$, $H_2N-(A)-(C)-(B)-COOH$, $H_2N-(B)-(A)-(C)-COOH$, $H_2N-(B)-(C)-(A)-COOH$, $H_2N-(C)-(B)-(A)-COOH$ или $H_2N-(C)-(A)-(B)-COOH$ с помощью линкеров L1 и L2, и где белок имеет молекулярную массу менее 55 кДа. В определенных аспектах настоящее изобретение также относится к триспецифическим антигенсвязывающим белкам, причем упомянутые белки включают:

(a) первый домен (А), который специфически связывается с CD3 человека;

(b) второй домен (В), который представляет собой домен, служащий для удлинения периода полувыведения; и

(с) третий домен (С), который специфически связывается с антигеном-мишенью, причем данные

домены связаны в порядке $H_2N-(A)-(B)-(C)-COOH$, $H_2N-(A)-(C)-(B)-COOH$, $H_2N-(B)-(A)-(C)-COOH$, $H_2N-(B)-(C)-(A)-COOH$, $H_2N-(C)-(B)-(A)-COOH$ или $H_2N-(C)-(A)-(B)-COOH$ с помощью линкеров L1 и L2, и где В включает однодоменное антитело, которое связывается с сывороточным альбумином.

Различные варианты осуществления триспецифических антигенсвязывающих белков также обеспечены в настоящем изобретении, рассматриваемые для любого аспекта в настоящем изобретении, отдельно или в комбинации. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит варируемую легкую цепь и варируемую тяжелую цепь, каждая из которых способна специфически связываться с человеческим CD3. В некоторых вариантах осуществления варируемая легкая цепь представляет собой λ , (лямбда) легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления варируемая легкая цепь представляет собой κ (каппа) легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит одноцепочечный варируемый фрагмент (single-chain variable fragment (scFv)), специфичный для CD3 человека. В некоторых вариантах осуществления первый домен специфичен для CD3 ϵ (эпсилон). В некоторых вариантах осуществления первый домен специфичен для CD3 δ (дельта). В некоторых вариантах осуществления первый домен специфичен для CD3 γ (гамма). В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит определяющие комплементарные области (complementary determining regions (CDR)), выбранные из группы, состоящей из муромонаба-CD3 (OKT3), отеликсизумаба (TRX4), теплизумаба (MGA031), визилизумаба (Nuvion), SP34, X35, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, OKT3D, M-T301, SMC2, F101.01, UCHL1 и WT-31. В некоторых вариантах осуществления первый домен является гуманизированным или человеческим. В некоторых вариантах осуществления первый домен имеет K_D связывания с CD3 на CD3-экспрессирующих клетках, равную 1000 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления первый домен имеет K_D связывания с CD3 на CD3-экспрессирующих клетках, равную 100 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления первый домен имеет K_D связывания с CD3 на CD3-экспрессирующих клетках равную 10 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления первый домен имеет перекрестную реактивность с CD3 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит аминокислотную последовательность, обеспеченную в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления второй домен связывает человеческий сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит scFv, варируемый тяжелый домен (VH), варируемый легкий домен (VL), однодоменное антитело, пептид, лиганд или низкомолекулярную группу. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит домен VH. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит домен VL. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит однодоменное антитело. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит пептид. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит лиганд. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит низкомолекулярную группу.

В некоторых вариантах осуществления третий домен содержит scFv, домен VH, домен VL, не являющийся частью Ig домен, лиганд, нуклеин или низкомолекулярную группу, которые специфически связываются с антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления третий домен характеризуется специфичностью по отношению к молекуле клеточной поверхности. В некоторых вариантах третий домен характеризуется специфичностью по отношению к опухолевому антигену.

В некоторых вариантах осуществления линкеры L1 и L2 представляют собой пептидные линкеры. В некоторых вариантах осуществления линкеры L1 и L2 независимо состоят из около 20 или менее аминокислотных остатков. В некоторых вариантах линкеры L1 и L2, каждый независимо, выбраны из (GS) $_n$ (SEQ ID NO: 49), (GGS) $_n$ (SEQ ID NO: 50), (GGGS) $_n$ (SEQ ID NO: 51), (GGSG) $_n$ (SEQ ID NO: 52), (GGSGG) $_n$ (SEQ ID NO: 53) или (GGGGS) $_n$ (SEQ ID NO: 54), где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах линкеры L1 и L2, каждый независимо, представляют собой (GGGGS) $_4$ (SEQ ID NO: 55) или (GGGGS) $_3$ (SEQ ID NO: 56). В некоторых вариантах осуществления линкеры L1 и L2 представляют собой химические линкеры.

В некоторых вариантах осуществления первый домен находится на N-конце белка. В некоторых вариантах осуществления второй домен находится на N-конце белка. В некоторых вариантах осуществления третий домен находится на N-конце белка. В некоторых вариантах осуществления первый домен находится на C-конце белка. В некоторых вариантах осуществления второй домен находится на C-конце белка. В некоторых вариантах осуществления третий домен находится на C-конце белка.

В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса белка меньше, чем около 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса белка составляет от около 50 до около 75 кДа. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса белка меньше, чем около 50 кДа. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса белка меньше, чем около 40 кДа. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса белка составляет от около 20 до около 40 кДа. В некоторых вариантах осуществления белок имеет период полувыведения, составляющий по меньшей мере около 50 ч. В некоторых вариантах осуществления белок имеет период полувыведения, составляющий по меньшей

мере около 100 ч. В некоторых вариантах осуществления белок характеризуется повышенным проникновением в ткани по сравнению с IgG против того же антигена-мишени. Настоящее изобретение также относится, в другом аспекте, к полинуклеотидам, кодирующим триспецифические антигенсвязывающие белки по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления. В другом аспекте, представленном в настоящем изобретении, обеспечены векторы, содержащие описанные полинуклеотиды. В другом аспекте, представленном в настоящем изобретении, обеспечены клетки-хозяева, трансформированные описанными векторами.

В еще одном аспекте, представленном в настоящем изобретении, обеспечены фармацевтические композиции, содержащие триспецифический антигенсвязывающий белок по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления, полинуклеотид, кодирующий триспецифический антигенсвязывающий белок по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления, вектор, содержащий описанные полинуклеотиды, или клетка-хозяин, трансформированная вектором по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления, и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к способам получения триспецифического антигенсвязывающего белка по любому из аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения, причем упомянутый способ включает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любой триспецифический антигенсвязывающий белок в настоящем изобретении, в условиях, позволяющих проводить экспрессию белка и выделение и очистку полученного белка из культуры.

Настоящее изобретение также относится к способам для лечения или улучшения пролиферативного заболевания, опухолевого заболевания, воспалительного заболевания, иммунологического расстройства, аутоиммунного заболевания, инфекционного заболевания, вирусного заболевания, аллергических реакций, паразитных реакций, заболеваний "трансплантат-против-хозяина" или заболеваний "хозяин-против-трансплантата", включающим введение триспецифического антигенсвязывающего белка по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления субъекту, нуждающемуся в таком лечении или улучшении. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение средства в сочетании с описанным в настоящем изобретении триспецифическим антигенсвязывающим белком.

Включение посредством ссылки.

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

Краткое описание фигур

Новые признаки изобретения изложены со всеми особенностями в прилагаемой формуле изобретения. Более полное понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет получено со ссылкой на следующее подробное описание, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы настоящего изобретения, и сопровождающие их чертежи.

Фиг. 1 является схематическим представлением иллюстративного триспецифического антигенсвязывающего белка, где данный белок имеет константный основной элемент, содержащий анти-CD3ε одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) и анти-HSA вариабельную область тяжелой цепи; и связывающий мишень вариабельный домен, который может представлять собой VH, scFv, не являющийся частью Ig связывающий элемент или лиганд.

Фиг. 2 является схематическим представлением дополнительных иллюстративных триспецифических антигенсвязывающих белков, созданных для оптимального проникновения в ткани. На фиг. 2, слева, показан в качестве иллюстрации триспецифический антиген связывающий белок, содержащий фрагменты однодоменного антитела во всех доменах. На фиг. 2, в середине, показан в качестве иллюстрации триспецифический антигенсвязывающий белок, включающий ноттин, который связывается с антигеном-мишенью. На фиг. 2, справа, показан в качестве иллюстрации триспецифический антигенсвязывающий белок, содержащий природный лиганд, который связывается с антигеном-мишенью.

Фиг. 3 представляет собой схематическое изображение присоединения низкомолекулярного связывающего элемента к триспецифическому антигенсвязывающему белку. Триспецифический антигенсвязывающий белок содержит последовательность распознавания сортазы в качестве домена, связывающего антиген-мишень. После инкубации белка с сортазой и присоединенным к остатку глицина низкомолекулярным связывающим элементом, сортаза лигирует или конъюгирует низкомолекулярный связывающий элемент с сайтом распознавания. На фигуре показана последовательность "LPETGG" как SEQ ID NO: 60 и последовательность "LPETG" как SEQ ID NO: 57.

На фиг. 4 показано схематическое представление шести различных способов, с помощью которых могут быть расположены три домена данных триспецифических антигенсвязывающих молекул.

На фиг. 5 сравнивается способность молекул BiTE (EGFR-направленный BiTE от Lutterbuese et al., 2007. PNAS 107: 12605-12610 и PSMA-направленный BiTE pasotuxizumab) со способностью направленных против EGFR и PSMA и содержащих VH-домен триспецифических молекул индуцировать первичные человеческие Т-клетки для уничтожения опухолевых клеток.

На фиг. 6 показано, что все шесть возможных конфигураций триспецифической молекулы, содержащей EGFR-направленный VH-домен, могут индуцировать Т-клетки для уничтожения линии NCI-1563 опухолевых клеток человека. Эксперимент проводили в отсутствие (слева на фигуре) и присутствии (справа на фигуре) человеческого сывороточного альбумина с EGFR-направленным BiTE в качестве положительного контроля.

На фиг. 7 оценивается способность пяти возможных конфигураций триспецифической молекулы, содержащей PSMA-направленный домен VH, индуцировать Т-клетки для уничтожения линии 22Rv1 опухолевых клеток человека. Эксперимент проводили в отсутствие (слева на фигуре) и присутствии (справа на фигуре) человеческого сывороточного альбумина с PSMA-направленным BiTE в качестве положительного контроля. Показана также активность PSA-направленной триспецифической молекулы с PSMA-направленным scFv.

На фиг. 8 показано, что триспецифические молекулы могут состоять из константного основного элемента, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент анти-CD3ε (scFv) и анти-HSA вариабельную область тяжелой цепи; и связывающего мишень вариабельного домена, который может представлять собой scFv.

На фиг. 9 показано, что триспецифические молекулы, которые используют финомер, в отличие от полученного из антитела домена для направленной доставки в опухоль, могут индуцировать Т-клетки для уничтожения опухолевых клеток.

Фиг. 10 показывает, что, когда направленные против EGFR триспецифические молекулы перенаправляют Т-клетки для уничтожения опухолевых клеток CaPan2 человека (панель А), Т-клетки активируются и продуцируют цитокины TNF-α (панель В) и IFNγ (панель С), в зависимости от дозы триспецифической молекулы.

На фиг. 11 показано, что, когда направленные против PSMA триспецифические молекулы перенаправляют Т-клетки для уничтожения опухолевых клеток 22Rv1 человека (панель А), Т-клетки активируются и продуцируют цитокины TNF-α (панель В) и IFNγ (панель С), в зависимости от дозы триспецифической молекулы.

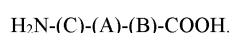
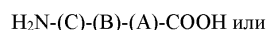
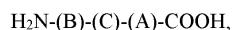
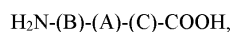
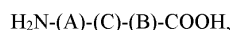
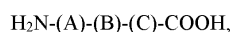
На фиг. 12 показано, что направленные против MSLN триспецифические молекулы могут мигрировать через матригель быстрее, чем обычные антитела.

На фиг. 13 показано фаговое титрование на биотин-CD3ε и биотин-HSA.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к триспецифическим антигенсвязывающим белкам, их фармацевтическим композициям, а также нуклеиновым кислотам, рекомбинантным экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения таких триспецифических антигенсвязывающих белков. Настоящее изобретение также относится к способам применения раскрытых триспецифических антигенсвязывающих белков в профилактике и/или лечении заболеваний, состояний и расстройств. Триспецифические антигенсвязывающие белки способны специфически связываться с антигеном-мишенью, а также с CD3 и доменом удлинения периода полувыведения, таким как домен связывания сывороточного альбумина человека (human serum albumin (HSA)). На фиг. 1 представлен один неограничивающий пример триспецифического антигенсвязывающего белка.

В одном аспекте настоящего изобретения триспецифические антигенсвязывающие белки содержат домен (А), который специфически связывается с CD3, домен (В), который специфически связывается с человеческим сывороточным альбумином (HSA), и домен (С), который специфически связывается с антигеном-мишенью. Три домена в триспецифических антигенсвязывающих белках расположены в любом порядке. Таким образом, предполагается, что порядок доменов триспецифических антигенсвязывающих белков представляют собой:



В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки имеют порядок доменов $\text{H}_2\text{N}-(\text{A})-(\text{B})-(\text{C})-\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки имеют порядок доменов $\text{H}_2\text{N}-(\text{A})-(\text{C})-(\text{B})-\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки имеют порядок доменов $\text{H}_2\text{N}-(\text{B})-(\text{A})-(\text{C})-\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки имеют порядок доменов $\text{H}_2\text{N}-(\text{B})-(\text{C})-(\text{A})-\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки имеют порядок доменов $\text{H}_2\text{N}-(\text{C})-(\text{B})-(\text{A})-\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления

триспецифические антигенсвязывающие белки имеют порядок доменов $H_2N-(C)-(A)-(B)-COOH$.

Триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, необязательно содержат полипептид, имеющий последовательность, описанную в табл. 6 или 7 (SEQ ID NO: 1-48), и ее подпоследовательности. В некоторых вариантах осуществления триспецифический антигенсвязывающий белок содержит полипептид, имеющий по меньшей мере от 70 до 95% или более гомологии с последовательностью, описанной в табл. 6 или 7 (SEQ ID NO: 1-48). В некоторых вариантах осуществления триспецифический антигенсвязывающий белок содержит полипептид, имеющий по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95% или более гомологии с последовательностью, описанной в табл. 6 или 7 (SEQ ID NO: 1-48). В некоторых вариантах осуществления триспецифический антигенсвязывающий белок имеет последовательность, содержащую, по меньшей мере, часть последовательности, описанной в табл. 6 или 7 (SEQ ID NO: 1-48). В некоторых вариантах осуществления триспецифический антигенсвязывающий белок содержит полипептид, содержащий одну или более последовательностей, описанных в табл. 6 или табл. 7 (SEQ ID NO: 1-48).

Триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, предназначены для обеспечения специфического направленной доставки в клетки, экспрессирующие антиген-мишень, путем рекрутирования цитотоксических Т-клеток. Это повышает эффективность по сравнению с ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity), которая использует полноразмерные антитела, направленные против единственного антигена, и не способна непосредственно рекрутировать цитотоксические Т-клетки. Напротив, привлекая молекулы CD3, экспрессируемые конкретно на данных клетках, триспецифические антигенсвязывающие белки могут сшивать цитотоксические Т-клетки с клетками, экспрессирующими антиген-мишень, с высокой степенью специфичности, тем самым направляя цитотоксический потенциал Т-клетки в сторону клетки-мишени. Триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, привлекают цитотоксические Т-клетки через связывание с экспрессируемыми на клеточной поверхности белками CD3, которые образуют часть TCR. Одновременное связывание нескольких триспецифических антигенсвязывающих белков с CD3 и антигеном-мишенью, экспрессируемым на поверхности конкретных клеток, вызывает активацию Т-клеток и опосредует последующий лизис определенной клетки, экспрессирующей антиген-мишень. Таким образом, предполагается, что триспецифические антигенсвязывающие белки осуществляют сильное, специфическое и эффективное уничтожение клеток-мишеней. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки стимулируют уничтожение клеток-мишеней цитотоксическими Т-клетками с целью устранения патогенных клеток (например, опухолевых клеток, инфицированных вирусами или бактериями клеток, аутореактивных Т-клеток и т.д.). В некоторых из таких вариантов осуществления клетки избирательно удаляются, тем самым снижая вероятность токсических побочных эффектов. В других вариантах осуществления те же самые полипептиды могут быть использованы для усиления элиминации эндогенных клеток, таких как В- или Т-лимфоциты при аутоиммунном заболевании или гемопоэтических стволовых клеток (hematopoietic stem cells (HSC)) при трансплантации стволовых клеток, с целью получения терапевтического эффекта.

Триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, придают дополнительные терапевтические преимущества по отношению к традиционным моноклональным антителам и другим биспецифическим молекулам меньшего размера. Как правило, эффективность рекомбинантных белков в качестве лекарственных средств, в значительной степени, зависит от внутренней фармакокинетики самого белка. Одним из таких преимуществ в настоящем изобретении является то, что триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, имеют удлиненный фармакокинетический период полувыведения, обусловленный наличием домена, обеспечивающего удлинение периода полувыведения, такого как домен, специфичный к HSA. В этом отношении, триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, имеют удлиненный период полувыведения из сыворотки крови, составляющий около двух, трех, около пяти, около семи, около 10, около 12 или около 14 дней в некоторых вариантах осуществления. Это контрастирует с другими связывающими белками, такими как молекулы BiTE или DART, которые имеют относительно более короткие периоды полувыведения. Так, например, в случае CD19×CD3 биспецифической scFv-scFv слитой молекулы BiTE, требуется непрерывная доставка данного лекарственного средства путем внутривенной инфузии (IV) из-за его короткого периода полувыведения. Более длительные внутренние периоды полувыведения триспецифических антигенсвязывающих белков решают данную проблему, тем самым обеспечивая повышенный терапевтический потенциал, такой как фармацевтические препараты с низкой дозой, уменьшенное периодическое введение и/или новые фармацевтические композиции. Триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, также имеют оптимальный размер для улучшения проникновения в ткани и распределения в ткани. Большие размеры ограничивают или предотвращают проникновение или распределение белка в ткани-мишени. Триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, избегают этого, имея небольшой размер, который позволяет улучшить проникновение и распределение в ткани. Соответственно, описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки в некоторых вариантах осуществ-

ления имеют размер от около 50 до около 80 кДа, от около 50 до около 75 кДа, от около 50 до около 70 кДа или от около 50 до около 65 кД. Таким образом, размер триспецифических антигенсвязывающих белков имеет преимущество по сравнению с IgG-антителами, размер которых составляет около 150 кД, и молекулами диател BiTE и DART, размер которых составляет около 55 кДа, но которые не имеют удлиненного периода полувыведения и, следовательно, быстро выводятся через почки. В других вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, имеют оптимальный размер для улучшения проникновения и распределения в ткани. В данных вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки сконструированы настолько малыми, насколько это возможно, при сохранении специфичности по отношению к их мишеням. Соответственно, в данных вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, имеют размер от около 20 до около 40 кДа или от около 25 до около 35 кД, до около 40 кДа, около 45 кДа, до около 50 кДа, до около 55 кДа, до около 60 кДа, до около 65 кДа. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, имеют размер, составляющий около 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40 кДа, около 39 кДа, около 38 кДа, около 37 кДа, около 36 кДа, около 35 кДа, около 34 кДа, около 33 кДа, около 32 кДа, около 31 кДа, около 30 кДа, около 29 кДа, около 28 кДа, около 27 кД, около 26 кД, около 25 кДа, около 24 кДа, около 23 кДа, около 22 кДа, около 21 кДа или около 20 кД. В качестве примера, подход, позволяющий получить малые размеры, заключается в использовании фрагментов однодоменного антитела (single domain antibody (sdAb)) для каждого из доменов. Например, конкретный триспецифический антигенсвязывающий белок имеет анти-CD3 sdAb, анти-HSA sdAb и sdAb для антигена-мишени. Это уменьшает размер иллюстративного триспецифического антигенсвязывающего белка до менее 40 кДа. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления домены триспецифических антигенсвязывающих белков представляют собой фрагменты однодоменного антитела (sdAb). В других вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки включают низкомолекулярные (small molecule entity (SME)) связывающие элементы для HSA и/или антигена-мишени. SME-связывающие элементы представляют собой небольшие молекулы, составляющие в среднем от 500 до 2000 Да, и присоединяются к триспецифическим антигенсвязывающим белкам с помощью известных способов, таких как опосредуемые сортазой лигирование или конъюгация. В данных случаях один из доменов триспецифического антигенсвязывающего белка представляет собой последовательность распознавания сортазы, например, LPETG (SEQ ID NO: 57). Чтобы присоединить SME-связывающий элемент к триспецифическому антигенсвязывающему белку с последовательностью распознавания сортазы, белок инкубируют с сортазой и SME-связывающим элементом, при этом сортаза присоединяет SME-связывающий элемент к последовательности распознавания. Известные SME-связывающие элементы включают MIP-1072 и MIP-1095, которые связываются со специфическим к простате мембранным антигеном (prostate-specific membrane antigen (PSMA)). В других вариантах осуществления домен, который связывается с антигеном-мишенью триспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем изобретении, содержит пептид ноттин для связывания с антигеном-мишенью. Ноттины представляют собой стабилизированные дисульфидными связями пептиды с каркасной структурой цистинового узла и имеют средние размеры, составляющие около 3,5 кДа. Предполагается связывание ноттинов с определенными молекулами опухолей, такими как фибронектин и VEGF-рецептор. В других вариантах осуществления домен, который связывается с антигеном-мишенью триспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем изобретении, включает природный рецепторный лиганд, такой как В-клеточный активирующий фактор (B-cell activating factor (BAFF/BLyS)). Еще одна особенность описанных в настоящем изобретении триспецифических антигенсвязывающих белков заключается в том, что они представляют собой однополипептидный дизайн с гибкой связью между доменами. Это позволяет легко производить и изготавливать триспецифические антигенсвязывающие белки, поскольку они могут быть кодированы молекулой одной кДНК, которая легко может быть включена в вектор. Кроме того, поскольку описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки являются мономерной единичной полипептидной цепью, нет ни проблем со спариванием цепей, ни необходимости димеризации. Предполагается, что описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки снижают тенденцию к агрегации в отличие от других опубликованных молекул, таких как биспецифический белок с доменами Fc-гамма-иммуноглобулина.

В описанных в настоящем изобретении триспецифических антигенсвязывающих белках домены связаны внутренними линкерами L1 и L2, причем L1 связывает первый и второй домен триспецифических антигенсвязывающих белков, а L2 связывает второй и третий домены триспецифических антигенсвязывающих белков. Линкеры L1 и L2 имеют оптимизированную длину и/или аминокислотный состав. В некоторых вариантах осуществления линкеры L1 и L2 имеют одинаковую длину и аминокислотный состав. В других вариантах осуществления L1 и L2 различны. В некоторых вариантах осуществления внутренние линкеры L1 и/или L2 являются "короткими", т.е. состоят из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков. Таким образом, в некоторых случаях внутренние линкеры состоят из около 12 или менее аминокислотных остатков. В случае 0 аминокислотных остатков, внутренний линкер представляет собой пептидную связь. В некоторых вариантах осуществления внутренние линкеры L1 и/или

L2 являются "длинными", т.е. состоят из 15, 20 или 25 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления данные внутренние линкеры состоят из от около 3 до около 15, например, 8, 9 или 10 смежных аминокислотных остатков. Что касается аминокислотного состава внутренних линкеров L1 и L2, пептиды выбраны со свойствами, которые придают гибкость триспецифическим антигенсвязывающим белкам, не мешают связывающим доменам, а также устойчивы к расщеплению протеазами. Например, глициновые и сериновые остатки обычно обеспечивают устойчивость к протеазе. Примеры внутренних линкеров, подходящих для связывания доменов в триспецифических антигенсвязывающих белках, включают, но не ограничиваются ими (GS)_n (SEQ ID NO: 49), (GGS)_n (SEQ ID NO: 50), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 51), (GGSG)_n (SEQ ID NO: 52), (GGSGG)_n (SEQ ID NO: 53) или (GGGGGS)_n (SEQ ID NO: 54), где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В одном варианте осуществления внутренний линкер L1 и/или L2 представляет собой (GGGGGS)₄ (SEQ ID NO: 55) или (GGGGGS)₃ (SEQ ID NO: 56).

CD3-связывающий домен.

Специфика ответа Т-клеток опосредуется распознаванием антигена (отображаемого в контексте крупного комплекса гистосовместимости, МНС) комплексом TCR. В составе TCR CD3 представляет собой белковый комплекс, который включает цепь CD3γ (гамма), цепь CD3δ (дельта) и две цепи CD3ε (эпсилон), которые присутствуют на поверхности клетки. CD3 ассоциируется с α (альфа) и β (бета) цепями TCR, а также с цепью CD3ζ (дзета), которые все вместе образуют полный TCR. Кластеризация CD3 на Т-клетках, например, посредством иммобилизованных антител против CD3, приводит к активации Т-клеток, сходной с вовлечением Т-клеточного рецептора, но не зависящей от его специфичности в отношении определенного клона.

В одном аспекте описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки содержат домен, который специфически связывается с CD3. В одном аспекте описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки содержат домен, который специфически связывается с CD3 человека. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки включают домен, который специфически связывается с CD3γ. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки содержат домен, который специфически связывается с CD3δ. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки содержат домен, который специфически связывается с CD3ε.

В других вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки содержат домен, который специфически связывается с TCR. В некоторых случаях триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, содержат домен, который специфически связывает α-цепь TCR. В некоторых случаях триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, содержат домен, который специфически связывает β-цепь TCR. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен описанных в настоящем изобретении триспецифических антигенсвязывающих белков демонстрирует не только сильное сродство к CD3-связыванию с человеческим CD3, но также и отличную перекрестную реактивность с соответствующими белками CD3 яванского макака. В некоторых случаях CD3-связывающий домен триспецифических антигенсвязывающих белков является перекрестно-реактивным с CD3 яванского макака. В определенных случаях соотношения величин K_D для человеческого CD3 и для CD3 яванского макака (human: cynomolgus K_D) составляют от 5 до 0,2.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка может представлять собой любой домен, который связывается с CD3, включая, но не ограничиваясь ими, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. В некоторых случаях является преимуществом, чтобы домен, связывающий CD3, был получен из того же вида, в котором, в конечном счете, будет использоваться триспецифический антигенсвязывающий белок. Например, для применения на людях может являться преимуществом, чтобы CD3-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка содержал человеческие или гуманизированные остатки из антигенсвязывающего домена антитела или фрагмента антитела.

Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения антигенсвязывающий домен содержит гуманизированное или человеческое антитело или фрагмент антитела или мышинное антитело или фрагмент мышинного антитела. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит одну или более (например, все три) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LC CDR1), определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (LC CDR2) и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (LC CDR3) гуманизированного или человеческого анти-CD3-связывающего домена, описанного в настоящем изобретении, и/или одну или более (например, вся три) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HC CDR1), определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (HC CDR2) и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (HC CDR3) гуманизированного или человеческого анти-CD3-связывающего домена, описанного в настоящем изобретении, например, гуманизированного или человеческого анти-CD3-

связывающего домена, содержащего одну или более, например, все три, LC CDR и одну или более, например, все три, HC CDR.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит переменную область гуманизированной или человеческой легкой цепи, специфичную для CD3, причем переменная область легкой цепи, специфичная для CD3 человека, содержит последовательности CDR человеческой или нечеловеческой легкой цепи в каркасной области человеческой легкой цепи. В определенных случаях, каркасная область легкой цепи является каркасной областью легкой цепи λ (лямбда). В других случаях, каркасная область легкой цепи является каркасной областью легкой цепи κ (каппа).

В некоторых вариантах осуществления гуманизированный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит переменную область гуманизированной или человеческой тяжелой цепи, специфичную для CD3, причем переменная область тяжелой цепи, специфичная для CD3, содержит последовательности CDR человеческой или нечеловеческой тяжелой цепи в каркасной области человеческой тяжелой цепи. В определенных случаях, определяющие комплементарность области тяжелой цепи и/или легкой цепи получены из известных анти-CD3-антител, таких как, например, муромонаб-CD3 (OKT3), отеликсизумаб (TRX4), теплизумаб (MGA031), визилизумаб

(Nuvion), SP34, X35, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-409, CLB-

T3.4.2, TR-66, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-

4B6, OKT3D, M-T301, SMC2, F101.01, UCNT-1 и WT-31.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD3-связывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной в данном описании. Как использовано в данном описании, "одноцепочечный переменный фрагмент" или "scFv" относится к фрагменту антитела, содержащему переменную область легкой цепи и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, причем переменные области легкой и тяжелой цепи смежно связаны через короткий гибкий полипептидный линкер, и способному экспрессироваться в виде одной полипептидной цепи, и где scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он получен. В одном варианте осуществления изобретения анти-CD3-связывающий домен содержит: переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более чем 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, обеспеченной в настоящем изобретении, или последовательность, имеющую от 95 до 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, обеспеченной в настоящем изобретении; и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более чем 30, 20 или 10 модификаций (например, замен) в аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, обеспеченной в настоящем изобретении, или последовательность, имеющую от 95 до 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, обеспеченной в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий анти-CD3-связывающий домен представляет собой scFv, и переменная область легкой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, описанную в настоящем изобретении, присоединена к переменной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в настоящем изобретении, с помощью scFv-линкера. Переменная область легкой цепи и переменная область тяжелой цепи из scFv может располагаться, например, в любом из следующих направлений: переменная область легкой цепи -scFv-линкер-переменная область тяжелой цепи или переменная область тяжелой цепи - scFv-линкер-переменная область легкой цепи.

В некоторых случаях, scFv, которые связываются с CD3, получены в соответствии с известными способами. Например, молекулы scFv могут быть получены при связывании областей VH и VL вместе при помощи гибких полипептидных линкеров. Молекулы scFv содержат scFv-линкер (например, линкер Ser-Gly) с оптимизированной длиной и/или аминокислотным составом. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, длина scFv-линкера такова, что VH- или VL-домен можно связать межмолекулярно с другим переменным доменом с образованием сайта связывания с CD3. В определенных вариантах осуществления такие scFv-линкеры являются "короткими", т.е. состоят из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков. Таким образом, в некоторых случаях scFv-линкеры состоят из около 12 или менее аминокислотных остатков. В случае 0 аминокислотных остатков, scFv-линкер представляет собой пептидную связь. В некоторых вариантах осуществления данные scFv-линкеры состоят из от около 3 до около 15, например, 8, 9 или 10 смежных аминокислотных остатков. Что касается аминокислотного состава scFv-линкеров, выбраны пептиды, которые придают гибкость, не мешают переменным доменам а также позволяют осуществить межцепочный фолдинг с тем, чтобы объединить два переменных домена для образования функционального сайта связывания с CD3. Так, например, scFv-линкеры, включающие остатки глицина и серина, обычно обеспечивают устойчивость к протеазам. В некоторых вариантах осуществления линкеры в scFv содержат остатки глицина и серина. Аминокислот-

ная последовательность scFv-линкеров может быть оптимизирована, например, с помощью способов фагового дисплея для улучшения связывания с CD3 и получения большего количества scFv. Примеры пептидных scFv-линкеров, подходящих для связывания варибельного домена легкой цепи и варибельного домена тяжелой цепи, в scFv включает, но не ограничиваются ими (GS)_n (SEQ ID NO: 49), (GGS)_n (SEQ ID NO: 50), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 51), (GGSG)_n (SEQ ID NO: 52), (GGSGG)_n (SEQ ID NO: 53) или (GGGGGS)_n (SEQ ID NO: 54), в котором n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10. В одном из вариантов осуществления линкер в scFv может быть (GGGGGS)₄ (SEQ ID NO: 55) или (GGGGGS)₃ (SEQ ID NO: 56). Изменение длины линкера может сохранить или повысить активность, что приводит к более высокой эффективности в исследованиях активности.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка имеет сродство к CD3 на клетках, экспрессирующих CD3, с K_D, равной 1000 нМ или менее, 500 нМ или менее, 200 нМ или менее, 100 нМ или менее, 80 нМ или менее, 50 нМ или менее, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее, 5 нМ или менее, 1 нМ или менее или 0,5 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка имеет сродство к CD3ε, γ или δ с K_D, равной 1000 нМ или менее, 500 нМ или менее, 200 нМ или менее, 100 нМ или менее, 80 нМ или менее, 50 нМ или менее, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее, 5 нМ или менее, 1 нМ или менее, или 0,5 нМ или менее. В других вариантах осуществления CD3-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка имеет низкое сродство к CD3, т.е. около 100 нМ или выше.

Сродство к связыванию с CD3 может быть определено, например, по способности самого триспецифического антигенсвязывающего белка или его CD3-связывающего домена связываться с CD3, нанесенным на планшет для анализа; отображаемым на микробной клеточной поверхности; в растворе; и т.д. Связывающая активность самого триспецифического антигенсвязывающего белка или его CD3-связывающего домена по настоящему изобретению по отношению к CD3 может быть проанализирована при помощи иммобилизации лиганда (например, CD3) или самого триспецифического антигенсвязывающего белка или его CD3-связывающего домена на шарике, подложке, клетке и т.д. Могут быть добавлены агенты в соответствующем буфере, и партнеры по связыванию могут инкубироваться в течение определенного периода времени при заданной температуре. После промывок для удаления несвязанного материала связанный белок может быть высвобожден при помощи, например, SDS, буферов с высоким pH и тому подобное, и проанализирован, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Surface Plasmon Resonance (SPR)).

Домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения.

Настоящее изобретение относится к доменам, которые удлиняют период полувыведения антигенсвязывающего домена. Предполагается, что такие домены включают, но не ограничиваются ими, HSA-связывающие домены, домены Fc, небольшие молекулы, а также другие домены, обеспечивающие удлинение периода полувыведения, известные в данной области техники.

Человеческий сывороточный альбумин (Human serum альбумин (HSA)) (молекулярная масса ~67 кДа) является наиболее распространенным белком в плазме крови, присутствует в количестве, составляющем около 50 мг/мл (600 мкМ), и имеет период полувыведения, составляющий около 20 дней в организме человека. HSA служит для поддержания pH плазмы крови, способствует поддержанию коллоидного артериального давления, выполняет функции в качестве носителя многих метаболитов и жирных кислот, а также служит в качестве основного белка для транспорта лекарственных средств в плазме.

Нековалентная ассоциация с альбумином удлиняет период полувыведения короткоживущих белков. Например, рекомбинантное сливание альбумин-связывающего домена с фрагментом Fab привело к *in vivo* 25- и 58-кратному клиренсу и удлинению периода полувыведения в 37 и 26 раз при внутривенном введении мышам и кроликам, соответственно, по сравнению с введением только фрагмента Fab. В другом примере, когда инсулин ацилируют жирными кислотами для улучшения связи с альбумином, длительный эффект наблюдался при подкожном введении у кроликов или свиней. Взятые вместе, данные этих исследований демонстрируют связь между связыванием с альбумином и пролонгированным действием.

В одном аспекте настоящего изобретения триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, включают в себя домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, например домен, который специфически связывается с HSA. В некоторых вариантах осуществления HSA-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка может быть любым доменом, который связывается с HSA, включая, но не ограничиваясь ими, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. В некоторых вариантах осуществления HSA-связывающий домен представляет собой одноцепочечные варибельные фрагменты (ScFv), однодоменное антитело, такое как варибельный домен тяжелой цепи (VH), варибельный домен легкой цепи (VL) и варибельный домен (VHH) из полученного из верблюда однодоменного антитела, пептид, лиганд или низкомолекулярную группу, специфичные к HSA. В определенных вариантах осуществления HSA-связывающий домен является однодоменным антителом. В других вариантах осуществления HSA-связывающий домен представляет собой пептид. В

других вариантах осуществления HSA-связывающий домен представляет собой низкомолекулярную группу. Предполагается, что HSA-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка имеет достаточно малый размер и не более 25 кДа, не более 20 кДа, не более 15 кДа или не более 10 кДа, в некоторых вариантах осуществления. В некоторых случаях HSA-связывающий домен имеет размер 5 кДа или менее, если он представляет собой пептид или низкомолекулярную группу.

Домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, триспецифического антигенсвязывающего белка обеспечивают изменение фармакодинамики и фармакокинетики самого триспецифического антигенсвязывающего белка. Как упомянуто выше, домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, продлевает период полувыведения. Домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, также изменяет фармакодинамические свойства, включая изменение распределения, проникновения и диффузии триспецифического антигенсвязывающего белка в ткани. В некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, обеспечивает улучшение направленной доставки в ткани (включая опухоли), распределения в ткани, проникновения в ткани, диффузии внутри ткани, а также повышенную эффективность, по сравнению с белком без домена, обеспечивающего удлинение периода полувыведения. В одном варианте осуществления терапевтические способы эффективно и продуктивно используют пониженное количество триспецифического антигенсвязывающего белка, что приводит к снижению побочных эффектов, например, к снижению клеточной неопухолевой цитотоксичности.

Дополнительно, аффинность связывания домена, обеспечивающего удлинение периода полувыведения, может быть выбрана таким образом, чтобы соответствовать определенному периоду полувыведения в конкретном триспецифическом антигенсвязывающем белке. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, имеет высокую аффинность связывания. В других вариантах осуществления домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, имеет среднюю аффинность связывания. В других вариантах осуществления домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, имеет низкую или маргинальную аффинность связывания. Примеры аффинности связывания включают в себя K_D -концентрации при 10 нМ или менее (высокая), в диапазоне от 10 нМ до 100 нМ (средняя), и более 100 нМ (низкая). Как упомянуто выше, аффинности связывания с HSA определяются с помощью известных способов, например, поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Домен связывания антигена-мишени.

В дополнение к описанным CD3 и домену, обеспечивающему удлинение периода полувыведения, триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, также содержат домен, который связывается с антигеном-мишенью. Антиген-мишень вовлечен в заболевание, расстройство или состояние и/или связан с заболеванием, расстройством или состоянием. В частности, антиген-мишень связан с пролиферативным заболеванием, опухолевым заболеванием, воспалительным заболеванием, иммунологическим расстройством, аутоиммунным заболеванием, инфекционным заболеванием, вирусным заболеванием, с аллергической реакцией, с паразитной реакцией, болезнью "трансплантат-против-хозяина" или болезнью "хозяин-против-трансплантата". В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген, экспрессированный на опухолевой клетке. В качестве альтернативы, в некоторых вариантах осуществления антиген-мишень связывается с патогеном, таким как вирус или бактерия. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой молекулу клеточной поверхности, такую как белок, липид или полисахарид. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень находится на опухолевой клетке, зараженной вирусом клетке, бактериально инфицированной клетке, поврежденном эритроците, клетке артериальной бляшки или клетке фиброзной ткани.

Конструкция триспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем изобретении, делает возможным, чтобы домен связывания антигена-мишени был универсальным в том смысле, что домен связывания антигена-мишени может представлять собой любой тип связывающего домена, включая, но не ограничиваясь этим, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. В некоторых вариантах осуществления домен связывания антигена-мишени представляет собой одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), однодоменное антитело, такие как переменный домен тяжелой цепи (VH), переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен (VHH) из полученного из верблюда однодоменного антитела. В других вариантах осуществления домен связывания антигена-мишени представляет собой не являющийся Ig связывающий домен, т.е. антитело-миметик, такое как антикарины, аффилины, молекулы аффитела, аффимеры, аффитины, альфатела, авимеры, белки с анкириновым повтором DARPin, финомеры, пептиды с доменом Кунитца и монотела. В других вариантах осуществления домен связывания антигена-мишени представляет собой лиганд или пептид, который связывается с или ассоциируется с антигеном-мишенью. В других вариантах осуществления домен связывания антигена-мишени представляет собой ноттин. В других вариантах осуществления домен связывания антигена-мишени представляет собой низкомолекулярную группу.

Модификации триспецифических белков.

Триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, включают производные или аналоги, в которых:

- (i) аминокислота замещена остатком аминокислоты, который не является остатком аминокислоты, кодируемым генетическим кодом,
- (ii) зрелый полипептид слит с другим соединением, таким как полиэтиленгликоль, или
- (iii) дополнительные аминокислоты слиты с белком, такие как лидерная последовательность или секреторная последовательность или последовательность для очистки белка.

Типичные модификации включают, но не ограничиваются ими, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гема, ковалентное присоединение нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентное присоединение липида или липидного производного, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных сшивок, образование цистина, образование пироглутамата, формилирование, гамма карбоксилирование, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристилирование, окисление, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредуемое транспортной РНК добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование и убиквитинирование.

Модификации выполнены в любом месте в триспецифических антигенсвязывающих белках, описанных в настоящем изобретении, включая пептидный остов, аминокислотные боковые цепи и аминокислотные концы. Некоторые общие модификации пептидов, которые являются применимыми для модификации триспецифических антигенсвязывающих белков, включают гликозилирование, присоединение липида, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, гидроксилирование, блокирование аминокислотной или карбоксильной группы или обеих групп в полипептиде, посредством ковалентной модификации, и АДФ-рибозилирование.

Полинуклеотиды, кодирующие триспецифические антигенсвязывающие белки.

Настоящее изобретение также относится, в некоторых вариантах осуществления, к полинуклеотидным молекулам, кодирующим триспецифический антигенсвязывающий белок, описанный в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полинуклеотидные молекулы представлены в виде ДНК-конструкции. В других вариантах осуществления изобретения обеспечены полинуклеотидные молекулы в виде транскрипта информационной РНК.

Полинуклеотидные молекулы построены известными способами, например, путем объединения генов, кодирующих три связывающих домена, либо разделенных пептидными линкерами, либо, в других вариантах осуществления, непосредственно связанных пептидной связью, в единую генетическую конструкцию, функционально связанную с подходящим промотором и необязательно подходящим терминатором транскрипции, и их экспрессирования в бактериях или других подходящих экспрессионных системах, например, в клетках CHO. В вариантах осуществления изобретения, где домен связывания антигена-мишени представляет собой низкомолекулярную группу, полинуклеотиды содержат гены, кодирующие домен связывания CD3 и домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения. В вариантах осуществления, где домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, представляет собой низкомолекулярную группу, полинуклеотиды содержат гены, кодирующие домены, которые связываются с CD3 и антигеном-мишенью. В зависимости от используемых векторной системы и хозяина, может быть использовано любое число подходящих элементов транскрипции и трансляции, включая конститутивные и индуцируемые промоторы. Промотор выбирают таким образом, что он приводит в действие экспрессию полинуклеотида в соответствующей клетке-хозяине.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид встраивают в вектор, предпочтительно экспрессирующий вектор, что представляет дополнительный вариант осуществления. Данный рекомбинантный вектор может быть сконструирован в соответствии с известными способами. Векторы, представляющие особый интерес, включают плазмиды, фагмиды, производные фагов, вирусы (например, ретровирусы, аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы, вирусы герпеса, лентивирусы и тому подобные) и космиды. Различные экспрессионные системы вектор/хозяин могут применяться, чтобы служить в качестве носителя и использоваться для экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид описанного триспецифического антигенсвязывающего белка. Примерами экспрессирующих векторов для экспрессии в *E. coli* являются pSKK (Le Gall et al., J Immunol Methods. (2004) 285(1): 111-27) или pcDNA5 (Invitrogen), для экспрессии в клетках млекопитающих.

Таким образом, триспецифические антигенсвязывающие белки, как описано в настоящем изобретении, в некоторых вариантах осуществления получают путем введения вектора, кодирующего белок, как описано выше, в клетку-хозяина и культивирования упомянутой клетки-хозяина в условиях, при которых белковые домены экспрессируются, могут быть выделены и, при необходимости, дополнительно очищены.

Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения обеспечены фармацевтические композиции, включающие триспецифический антигенсвязывающий белок, описанный в настоящем изобретении.

бретении, вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид триспецифических антигенсвязывающих белков, или клетку-хозяин, трансформированную данным вектором, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя, но не ограничиваясь этим, любой носитель, который не мешает эффективности биологической активности ингредиентов и который не является токсичным для пациента, которому его вводят. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области и включают фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих средств, стерильные растворы и т.д. Такие носители могут быть приготовлены обычными способами и может вводиться субъекту в подходящей дозе. Предпочтительно композиции являются стерильными. Данные композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, эмульгаторы и диспергирующие средства. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено путем включения различных антибактериальных и противогрибковых средств. В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции триспецифический антигенсвязывающий белок, описанный в настоящем изобретении, инкапсулирован в наночастицах. В некоторых вариантах осуществления наночастицы представляют собой фуллерены, жидкие кристаллы, липосомы, квантовые точки, суперпарамагнитные наночастицы, дендримеры или наностержни. В других вариантах осуществления фармацевтической композиции триспецифический антигенсвязывающий белок присоединен к липосомам. В некоторых случаях, триспецифический антигенсвязывающий белок конъюгирован с поверхностью липосом. В некоторых случаях, триспецифический антигенсвязывающий белок инкапсулирован внутри оболочки липосомы. В некоторых случаях, липосома представляет собой катионную липосому.

Триспецифический антигенсвязывающий белок, описанный в настоящем изобретении, рассматривается для применения в качестве лекарственного средства. Введение осуществляется различными способами, например, путем внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, внутримышечного, местного или внутрикожного введения. В некоторых вариантах осуществления способ введения зависит от вида терапии и вида соединения, содержащегося в фармацевтической композиции. Режим дозирования будет определяться лечащим врачом и другими клиническими факторами. Дозирование для любого пациента зависит от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, пол, конкретное соединение, подлежащее введению, время и путь введения, вид терапии, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства, вводимые одновременно. "Эффективная доза" относится к количествам активного ингредиента, которые являются достаточными, чтобы повлиять на ход и тяжесть заболевания, что приводит к уменьшению или ремиссии такой патологии, и может быть определено с использованием известных способов.

Способы лечения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения обеспечиваются способы и применения для стимуляции иммунной системы индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение триспецифического антигенсвязывающего белка, описанного в настоящем изобретении. В некоторых случаях, введение триспецифического антигенсвязывающего белка, описанного в настоящем изобретении, индуцирует и/или поддерживает цитотоксичность по отношению к клетке, экспрессирующей антиген-мишень. В некоторых случаях, клетки, экспрессирующие антиген-мишень, представляет собой раковую или опухолевую клетку, инфицированную вирусом клетку, бактериально инфицированную клетку, аутореактивную Т- или В-клетку, поврежденные эритроциты, артериальные бляшки или фиброзные ткани.

Настоящее изобретение также относится к способам и к применениям для лечения заболевания, расстройства или состояния, связанного с антигеном-мишенью, включающим введение индивидууму, нуждающемуся в этом, триспецифического антигенсвязывающего белка, описанного в настоящем изобретении. Заболевания, нарушения или состояния, связанные с антигеном-мишенью, включают, но не ограничиваются ими, вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантата, атеросклероз или фиброз. В других вариантах осуществления заболевание, расстройство или состояние, связанное с антигеном-мишенью, представляет собой пролиферативное заболевание, опухолевое заболевание, воспалительное заболевание, иммунологическое расстройство, аутоиммунное заболевание, инфекционное заболевание, вирусное заболевание, аллергическую реакцию, паразитарную реакцию, болезнь "трансплантат-против-хозяина" или болезнь "хозяин-против-трансплантата". В одном варианте осуществления заболевание, расстройство или состояние, связанное с антигеном-мишенью, представляет собой рак. В одном случае рак является гематологическим раком. В другом случае рак представляет собой рак с солидной опухолью.

Как использовано в данном описании, в некоторых вариантах осуществления "лечение" или "лечить" или "леченный" относится к терапевтическому лечению, задача которого состоит в том, чтобы замедлить (уменьшить) нежелательное физиологическое состояние, расстройство или заболевание, или для получения благоприятных или желаемых клинических результатов. Для целей, описанных в настоящем изобретении, благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, облегчение симптомов; уменьшение степени состояния, расстройства или заболевания; стабилизация

цию (т.е. отсутствие ухудшения) уровня состояния, расстройства или заболевания; задержку начала или замедление прогрессирования состояния, расстройства или заболевания; коренное улучшение состояния, расстройства или болезненного состояния; и ремиссию (частичную или полную), будь то обнаруживаемая или необнаруживаемая, или облегчение или улучшение состояния, расстройства или заболевания. Лечение включает в себя выявление клинически значимого ответа без чрезмерных уровней побочных эффектов. Лечение также включает в себя продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если не было получено лечение. В других вариантах осуществления "лечение" или "лечить" или "леченный" относится к профилактическим мерам, задача которых состоит в задержке начала или уменьшении тяжести нежелательного физиологического состояния, расстройства или заболевания, например, у человека, который предрасположен к заболеванию (например, человек, который несет в себе генетический маркер для заболевания, такого как рак молочной железы).

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем изобретении, триспецифический антиген связывающий белок вводят в сочетании со средством для лечения конкретного заболевания, расстройства или состояния. Средства включают, но не ограничиваются ими, терапии, включающие антитела, небольшие молекулы (например, химиотерапевтические препараты), гормоны (стероидные, пептидные и тому подобное), радиотерапии (гамма-лучи, рентгеновские лучи и/или направленная доставка радиоизотопов, микроволновые печи, УФ-излучение и тому подобное), генную терапию (например, препараты антисмысловой, антиретровирусной терапии и тому подобное) и другие иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки вводят в сочетании с антидиарейными средствами, антирвотными средствами, анальгетиками, опиоидами и/или нестероидными противовоспалительными средствами. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки вводят до, во время или после операции.

Некоторые определения.

Как используется в настоящем изобретении, "период полувыведения" используется в его обычном смысле, как это описано в Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics 21-25 (Alfred Goodman Gilman, Louis S. Goodman, and Alfred Gilman, eds., 6th ed. 1980). Вкратце, данный термин предназначен, чтобы охватить количественную меру периода выведения лекарственного препарата. Выведение большинства препаратов описывается экспоненциальной зависимостью (т.е. следует кинетике первого порядка), так как концентрации лекарственного средства обычно не достигают тех, которые требуются для насыщения процесса выведения. Скорость экспоненциального процесса может быть выражена его константой скорости k , выражающей относительное изменение на единицу времени, либо его периодом полувыведения $t_{1/2}$, временем, необходимым для 50%-ного завершения процесса. Единицами данных двух констант являются единица времени⁻¹ и единица времени, соответственно. Константа скорости первого порядка и полупериод реакции связаны просто ($k \times t_{1/2} = 0,693$) и могут быть взаимозаменяемыми соответствующим образом. Поскольку кинетика выведения первого порядка подсказывает, что в единицу времени теряется постоянная фракция лекарственного средства, график зависимости логарифма концентрации лекарственного средства от времени является линейным в любое время после начальной фазы распределения (т.е. после того, как поглощение и распределение лекарственного средства завершатся). Полупериод времени для выведения лекарственного средства может быть точно определен из такого графика.

Примеры

Пример 1. Построение иллюстративного триспецифического антигенсвязывающего белка к CD20. Генерирование scFv CD3-связывающего домена.

Каноническая последовательность цепи CD3ε человека имеет номер доступа в базе данных UniProt P07766. Каноническая последовательность цепи CD3 человека имеет номер доступа в базе данных UniProt P09693. Каноническая последовательность цепи CD3δ человека имеет номер доступа в базе данных UniProt P043234. Антитела против CD3ε, CD3γ или CD3δ получают с помощью известных технологий, таких как созревание аффинности. Когда в качестве исходного материала используют мышинные анти-CD3 антитела, гуманизация мышинных анти-CD3 антител желательна для клинических условий, где мыш-специфические остатки могут индуцировать выработку человеческих антимышинных антител (human-anti-mouse antigen (HAMA)) у субъектов, которые получают в качестве лечения триспецифический антигенсвязывающий белок, описанный в настоящем изобретении. Гуманизация осуществляется путем прививки CDR-областей из мышинного анти-CD3 антитела на соответствующие акцепторные каркасные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека, необязательно включая другие модификации CDR и/или каркасных областей. Как предусмотрено в настоящем изобретении, нумерация остатков в антителах и фрагментах антител следует системе нумерации Kabat (Kabat E. A. et al., 1991; Chothia et al., 1987).

Человеческие или гуманизированные анти-CD3 антитела, следовательно, используются для создания scFv-последовательностей для CD3-связывающих доменов триспецифического антигенсвязывающего белка. Получают последовательности ДНК, кодирующие человеческие или гуманизированные домены VL и VH, и кодоны для конструкций являются необязательно оптимизированными для экспрессии в

клетках из *Homo sapiens*. Порядок, в котором домены VL и VH появляются в scFv, варьируется (т.е. ориентация VL-VH или VH-VL), и три копии "G₄S" (SEQ ID NO: 58) или "G₄S" (SEQ ID NO: 58) субъединицы (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 56) соединяют вариабельные домены для создания домена scFv. Плазмидные конструкции, содержащие анти-CD3 scFv, могут иметь дополнительный Flag, His или другие аффинные метки, и их вводят при помощи электропорации в HEK293 или другие подходящие клеточные линии человека или млекопитающих и очищают. Проверочные анализы включают анализ связывания с помощью FACS, кинетический анализ с использованием Proteon и окрашивание CD3-экспрессирующих клеток.

Генерирование scFv CD20-связывающего домена CD20 является одним из белков клеточной поверхности, присутствующих на В-лимфоцитах. Антиген CD20 обнаруживается в нормальных и злокачественных пре-В и зрелых В-лимфоцитах, включая таковые в более чем 90% В-клеточных неходжкинских лимфом (non-Hodgkin's lymphomas (NHL)). Антиген отсутствует в гематопозитических стволовых клетках, активированных В-лимфоцитах (плазматические клетки) и в нормальной ткани. Как таковые, были описаны несколько антител, в основном, мышиного происхождения: 1F5, 2B8/C2B8, 2H7 и 1H4.

scFv-домен связывания CD20 генерируется аналогично описанному выше способу генерации scFv-домена связывания CD3.

Клонирование ДНК-конструкций экспрессии, кодирующих триспецифический антигенсвязывающий белок.

Анти-CD3 scFv-домены, которые используются для построения триспецифического антигенсвязывающего белка в сочетании с анти-CD20 scFv-доменом и HSA-связывающим доменом (например, пептид или домен VH), представляют собой домены, организованные, как показано на фиг. 1. Для экспрессии триспецифического антигенсвязывающего белка в клетках CHO кодирующие последовательности всех белковых доменов клонируют в систему экспрессирующего вектора в клетках млекопитающих. Вкратце, генные последовательности, кодирующие CD3-связывающий домен, HSA-связывающий домен и CD20-связывающий домен, наряду с пептидными с помощью линкеров L1 и L2, отдельно синтезируют и субклонировать. Полученные конструкции затем лигируют вместе в порядке "CD20-связывающий домен - L1 - CD3-связывающий домен - L2 - HSA-связывающий домен", с получением окончательной конструкции. Все экспрессионные конструкции разработаны таким образом, что они содержат кодирующие последовательности для N-концевого сигнального пептида и C-концевой гексагистидиновой (6×His) метки (SEQ ID NO: 59), чтобы облегчить секрецию и очистку белка, соответственно.

Экспрессия триспецифических антигенсвязывающих белков в стабильно трансфицированных клетках CHO.

Используют систему экспрессии в клетках CHO (FLP-In®, Life Technologies), производном клеток CHO-K1 яичника китайского хомячка (ATCC, CCL-61) (Kao and Puck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1968;60(4): 1275-81). Прикрепленные клетки пересевают в соответствии со стандартными протоколами клеточных культур, предоставляемыми Life Technologies.

Для адаптации к росту в суспензии, клетки отделяют от флаконов для выращивания культуры ткани и помещают в среду без сыворотки. Адаптированные к росту в суспензии клетки подвергают криоконсервации в среде с 10% DMSO.

Рекомбинантные CHO-клеточные линии, стабильно экспрессирующие секретируемые триспецифические антигенсвязывающие белки, генерируют путем трансфекции адаптированных к росту в суспензии клеток. При отборе с антибиотиком гигромицином В, плотности жизнеспособных клеток измеряют два раза в неделю, и клетки центрифугируют и ресуспендируют в свежей среде селекции при максимальной плотности $0,1 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. Клеточные популяции, стабильно экспрессирующие триспецифические антигенсвязывающие белки, извлекают через 2-3 недели селекции, при этом клетки переносят в стандартную культуральную среду во встряхивающихся колбах.

Экспрессию рекомбинантных секретируемых белков подтверждают, проводя гель-электрофорез или проточную цитометрию белков. Стабильные клеточные популяции подвергают криоконсервации в среде, содержащей DMSO.

Триспецифические антигенсвязывающие белки получают в 10-дневных подпитываемых культурах стабильно трансфицированных CHO-клеточных линий путем секреции в надосадочную жидкость клеточной культуры. Надосадочные жидкости клеточных культур собирают через 10 дней при жизнеспособности культур типично >75%. Образцы отбирают из производственных культур каждый день и оценивают клеточную плотность и жизнеспособность. В день сбора клеток надосадочные жидкости клеточных культур очищают центрифугированием и вакуумной фильтрацией перед дальнейшим использованием. Титры экспрессии белков и целостность продукта в надосадочных жидкостях клеточных культур анализируют с помощью SDS-PAGE.

Очистка триспецифических антигенсвязывающих белков.

Триспецифические антигенсвязывающие белки очищают от надосадочной жидкости культуры клеток CHO согласно двухступенчатой процедуре. Конструкции подвергают аффинной хроматографии на первой стадии с последующей препаративной хроматографией с исключением по размеру (size exclusion chromatography (SEC)) на Superdex 200 на второй стадии. В образцах меняют буфер и их концентрируют

при помощи ультрафильтрации до типичной концентрации >1 мг/мл. Чистоту и гомогенность (обычно $>90\%$) конечных образцов оценивают с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, а затем с помощью иммуноблоттинга с использованием анти-HSA или антиидиотипического антитела, а также с помощью аналитической SEC, соответственно. Очищенные белки хранят в аликвотах при -80°C до использования.

Пример 2. Определение аффинности к антигену с помощью проточной цитометрии.

Триспецифические антигенсвязывающие белки из примера 1 проверяют на их аффинности связывания с человеческими $\text{CD}3^{+}$ и $\text{CD}20^{+}$ клетками и $\text{CD}3^{+}$ и $\text{CD}20^{+}$ клетками яванского макака.

$\text{CD}3^{+}$ и $\text{CD}20^{+}$ клетки инкубируют с 100 мкл серийных разведений триспецифических антигенсвязывающих белков из примера 1. После трехкратной промывки в буфере FACS клетки инкубируют с 0,1 мл 10 мкг/мл мышинового моноклонального антиидиотипического антитела в том же буфере в течение 45 мин на льду. После второго промывочного цикла клетки инкубируют с 0,1 мл 15 мкг/мл FITC-конъюгированных козьих анти-мышинных IgG антител в тех же условиях, что и раньше. В качестве контроля, клетки инкубируют с анти-His IgG с последующей инкубацией с FITC-конъюгированными козьими анти-мышинными IgG антителами без триспецифических антигенсвязывающих белков. Затем клетки снова промывают и ресуспендируют в 0,2 мл буфера FACS, содержащего 2 мкг/мл пропидий йодида (PI), чтобы исключить мертвые клетки. Флуоресценцию 1×10^4 живых клеток измеряют, используя проточный цитометр Beckman-Coulter FC500 MPL с использованием программного обеспечения MXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Германия) или проточный цитометр Millipore Guava EasyCyte с использованием программного обеспечения Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Германия), Средние интенсивности флуоресценции образцов клеток вычисляют с использованием программного обеспечения CXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Германия) или программного обеспечения Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Германия). После вычитания значений интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных только вторичными и третичными реагентами, значения затем используют для расчета значений K_D с уравнением для моносайтового связывания (гиперболы), используя программное обеспечение для построения нелинейных кривых GraphPad Prism (версия 6.00 для Windows, GraphPad Software, La Jolla, California США).

Аффинность связывания с CD3 и перекрестную реактивность оценивают с помощью титрования и экспериментов по проточной цитометрии на $\text{CD}3^{+}$ клетках Jurkat и $\text{CD}3^{+}$ HSC-F клеточной линии (JCRB, cat.:JCRB1164) яванского макака. Связывание с CD20 и перекрестную реактивность оценивают на линиях опухолевых клеток человека, экспрессирующих $\text{CD}20^{+}$. K_D -отношение перекрестной реактивности вычисляют с использованием значений K_D , определенных на линиях клеток CHO, экспрессирующих либо рекомбинантные человеческие антигены, либо рекомбинантные антигены яванского макака.

Пример 3. Анализ цитотоксичности.

Триспецифический антигенсвязывающий белок в примере 1 оценивают *in vitro* на его посредничество в зависимой от Т-клеток цитотоксичности по отношению к клеткам-мишеням, экспрессирующим $\text{CD}20^{+}$.

Флуоресцентно-меченые $\text{CD}20^{+}$ клетки REC-1 (линия мантийноклеточной лимфомы, ATCC CRL-3004) инкубируют с выделенными РВМС случайных доноров или с Т-клетками CB15 (стандартизованная линия Т-клеток) в качестве эффекторных клеток в присутствии триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1. После инкубации в течение 4 ч при 37°C в инкубаторе с увлажнением, высвобождение флуоресцентного красителя из клеток-мишеней в надосадочную жидкость определяют в спектрофлуориметре. Клетки-мишени, инкубированные без триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1 и клетки-мишени, полностью лизированные при добавлении сапонина в конце инкубации, служат в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно. На основании измеренных оставшихся живых клеток-мишеней, рассчитывают процент специфического лизиса клеток в соответствии со следующей формулой

$$[1 - (\text{число живых мишеней(образец)} / \text{количество живых мишеней(самопроизвольно)})] \times 100\%.$$

Сигмовидные кривые зависимости ответа от дозы и значения EC_{50} вычисляют с помощью нелинейной регрессии/аппроксимации 4-параметрической логистической модели с использованием программного обеспечения GraphPad. Значения лизиса, полученные для данной концентрации антитела, используют для расчета сигмоидальных кривых дозы-ответа с помощью анализа аппроксимации 4-параметрической логистической модели с использованием программного обеспечения Prism.

Пример 4. Фармакокинетика триспецифических антигенсвязывающих белков.

Триспецифический антигенсвязывающий белок из примера 1 оценивают на период полувыведения в исследованиях на животных.

Триспецифический антигенсвязывающий белок вводят яванским макакам в виде 0,5 мг/кг болюсной инъекции внутримышечно. Еще одна группа яванских макаков получает белок, сопоставимый по размеру с доменами связывания CD3 и CD20, но без HSA-связывания. Третья и четвертая группа получают белок с CD3- и HSA-связывающими доменами и белок с CD20- и HSA-связывающими доменами, соответственно, причем оба сравнимы по размеру с триспецифическим антигенсвязывающим белком. Каждая испытуемая группа состоит из 5 обезьян. Образцы сыворотки крови отбирают в упомянутые моменты

времени, серийно разводят, и концентрацию белков определяют с помощью анализа ELISA на связывание с CD3 и/или CD20.

Фармакокинетический анализ выполняют с использованием плазменных концентраций испытуемого образца. Средние по группе плазменные данные для каждого испытуемого образца соответствуют мультиэкспоненциальному профилю на графике в зависимости от времени после введения дозы. Данные аппроксимируют при помощи стандартной двухкомпарментной модели с болюсным введением и константами скорости реакции первого порядка для фаз распределения и выведения. Общее уравнение для лучшей аппроксимации данных для внутривенного введения имеет вид

$$c(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t},$$

где $c(t)$ представляет собой концентрацию в плазме крови в момент времени t ,

A и B являются отрезками, отсекаемыми по оси ординат, а

α и β представляют собой кажущиеся константы скорости первого порядка для фаз распределения и выведения, соответственно, α -фаза является начальной фазой клиренса и отражает распределение белка во всей внеклеточной жидкости животного, в то время как вторая часть или часть β -фазы кривой спада представляет истинный плазменный клиренс.

Способы аппроксимации таких уравнений хорошо известны в данной области техники. Так, например,

$$A = D/V(\alpha - k_{21})/(\alpha - \beta),$$

$$B = D/V(\beta - k_{21})/(\alpha - \beta), \text{ и}$$

α и β (для $\alpha > \beta$) являются корнями квадратного уравнения

$$r^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10})r + k_{21}k_{10} = 0$$

с использованием расчетных параметров V = объем распределения,

k_{10} = скорость выведения,

k_{12} = скорость переноса из компартмента 1 в компартмент 2 и

k_{21} = скорость переноса из компартмента 2 в компартмент 1, и

D = введенная доза.

Анализ данных: Графики концентрации в зависимости от временных профилей построены с использованием Kaleidagraph (Kaleidagraph™ V. 3.09 Copyright 1986-1997. Synergy Software. Reading, Pa.). Сообщенные значения, меньшие, чем подлежащие сообщению (less than reportable (LTR)), не включены в анализ РК и не представлены в графическом виде. Фармакокинетические параметры определяют компартментным анализом с помощью программного обеспечения WinNonlin (WinNonlin® Professional V. 3.1 WinNonlin™ Copyright 1998-1999 Pharsight Corporation. Mountain View, штат Калифорния). Фармакокинетические параметры вычисляют, как описано в Ritschel W A and Kearns G L, 1999, IN: Handbook Of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications, 5th edition, American Pharmaceutical Assoc, Washington, D.C.

Предполагается, что триспецифический антигенсвязывающий белок из примера 1 имеет улучшенные фармакокинетические параметры, такие как увеличение периода полувыведения, по сравнению с белками, лишенными HSA-связывающего домена.

Пример 5. Модель ксенотрансплантатной опухоли.

Триспецифический антигенсвязывающий белок из примера 1 оценивают в модели ксенотрансплантата.

Самок иммунодефицитных NOD/SCID мышей сублетально облучают (2 Gy) и подкожно инокулируют 4×10^6 клеток Ramos RA1 в правый бок. Когда опухоли достигают размера от 100 до 200 мм³, животных распределяют на 3 группы обработки. Группам 2 и 3 (8 животных в каждой) внутрибрюшинно вводят $1,5 \times 10^7$ активированных Т-клеток человека. Через три дня животных из группы 3 затем обрабатывают в общей сложности 9 внутривенными дозами в 50 мкг триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1 (qdx9d). Группы 1 и 2 обрабатывают только носителем. Массу тела и объем опухоли определяют в течение 30 дней.

Ожидается, что у животных, обработанных триспецифическим антигенсвязывающим белком из примера 1, имеется статистически значимое снижение роста опухоли по сравнению с соответствующей обработанной носителем контрольной группой.

Пример 6. Протокол контрольно-проверочного (Proof-of-Concept) клинического исследования для введения триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1 пациентам с В-клеточной лимфомой.

Данное исследование является клиническим исследованием фазы I/II с целью изучения триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1 в качестве лечения для пациентов с В-клеточной лимфомой.

Результаты исследования.

Основной: максимальная переносимая доза триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1.

Вторичный: определить, является ли *in vitro* ответ триспецифического антигенсвязывающего белка

из примера 1 связанным с клиническим ответом.

Фаза I.

Максимально переносимая доза (maximum tolerated dose (MTD)) будет определяться в разделе фазы I исследования.

1.1. Максимально переносимая доза (MTD) будет определяться в разделе фазы I исследования.

1.2. Пациенты, отвечающие критериям исследования, будут введены в исследование триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1.

1.3. Цель состоит в том, чтобы определить самую высокую дозу триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1, которая может быть введена безопасно без серьезных или неуправляемых побочных эффектов у участников. Доза, которая дается, будет зависеть от количества участников, которые были зачислены в исследование ранее, и от того, насколько хорошо переносилась доза. Не все участники будут получать одну и ту же дозу.

Фаза II.

2.1. В следующем разделе фазы II участники будут получать MTD с целью определения, будет ли лечение с терапией триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1 давать по меньшей мере 20%-ный уровень ответа. Основной результат для фазы II - определить, приводит ли терапия триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1 к достижению клинического ответа по меньшей мере у 20% пациентов (взрывной ответ, незначительный ответ, частичный ответ или полный ответ).

Право на участие в исследовании.

Гистологически подтвержденная, недавно диагностированная агрессивная В-клеточная лимфома в соответствии с действующей классификацией Всемирной организации здравоохранения (World Health Organisation Classification), с 2001 по 2007 год.

Любая стадия заболевания.

Лечение с помощью R-CHOP или R-CHOP в виде схем лечения ($\pm$ -трансплантат).

Возраст ≥ 18 лет.

Общее состояние больного по шкале Карновского (Karnofsky performance status) $\geq 50\%$ или общее состояние больного по шкале ECOG от 0 до 2.

Средняя продолжительность жизни ≥ 6 недель.

Пример 7. Способы оценки связывания и цитотоксические активности триспецифических антигенсвязывающих молекул.

Получение белка.

Последовательности триспецифических молекул были клонированы в вектор pCDNA 3.4 (Invitrogen) экспрессии в млекопитающих, с предшествующей лидерной последовательностью и последующей последовательностью 6 $\times$ Histidine Tag (SEQ ID NO: 59). Клетки Expi293F (Life Technologies A14527) поддерживали в суспензии в колбах для оптимального роста (Thomson) в количестве от 0,2 до 8 $\times 10^6$ клеток/мл в среде для роста Expi293. Очищенную плазмидную ДНК трансфицировали в клетки Expi293 в соответствии с протоколами Expi293 Expression System Kit (Life Technologies, A14635) и поддерживали в течение от 4 до 6 дней после трансфекции. Кондиционированные среды частично очищали аффинной и обессоливающей хроматографией. Триспецифические белки впоследствии дополнительно очищали путем ионного обмена, или, альтернативно, концентрировали в устройствах для центробежной фильтрации Amicon Ultra (EMD Millipore), наносили на среду Superdex 200 (GE Healthcare) для хроматографии исключения по размеру и элюировали в нейтральном буфере, содержащем наполнители. Собранные фракции и окончательную чистоту оценивали с помощью SDS-PAGE и аналитической SEC.

Измерения аффинности.

Аффинности всех молекул связывающих доменов были измерены с помощью интерферометрии биосенсоров с использованием прибора Octet.

Аффинности к PSMA измеряли, загружая человеческий белок PSMA-Fc (100 нМ) на античеловеческие биосенсоры IgG-Fc в течение 120 с, с последующим 60-секундным исходным уровнем, после чего связывания измеряли, инкубируя наконечник датчика в серии разведений триспецифических молекул в течение 180 с, с последующей диссоциацией в течение 50 с. Аффинности к EGFR и CD3 измеряли путем загрузки человеческого белка EGFR-Fc или человеческого белка CD3-Flag-Fc, соответственно, (100 нМ) на античеловеческие биосенсоры IgG-Fc в течение 120 с, с последующим 60-секундным исходным уровнем, после чего связывания измеряли, инкубируя наконечник датчика в серии разведений триспецифических молекул в течение 180 с, с последующей диссоциацией в течение 300 с. Сродство к сывороточному альбумину человека (HSA) измеряли с помощью загрузки биотинилированного альбумина на стрептавидиновые биосенсоры, затем следуя тем же кинетическим параметрам, что и для измерений аффинности к CD3. Все стадии выполняли при 30°C в 0,25% казеина в фосфатно-буферном растворе.

Анализ цитотоксичности.

Анализ зависимой от Т-клеток клеточной цитотоксичности (T-cell dependent cellular cytotoxicity (TDCC)) в клетках человека используется для измерения способности активаторов, привлекающих Т-клетки, включая триспецифические молекулы, направлять Т-клетки с тем, чтобы уничтожить опухоле-

вые клетки (Nazarian et al., 2015. J Biomol Screen. 20:519-27). В данном анализе Т-клетки и клетки-мишени линии раковых клеток смешивали вместе при соотношении 10:1 в 384-луночной планшете и добавляли различные количества привлекающего Т-клетки активатора. Через 48 ч Т-клетки смывали, оставляя прикрепленные к пластине клетки-мишени, которые не были убиты Т-клетками. Для количественной оценки оставшихся жизнеспособных клеток использовали анализ CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega).

Анализы на цитокины.

AlphaLISA анализы (Perkin Elmer) для TNF-альфа и гамма-интерферона используются для получения доказательств того, что Т-клетки активируются триспецифическими молекулами в присутствии клеток-мишеней. Для данного анализа первичные Т-клетки человека и опухолевые клетки человека инкубируют в присутствии тестируемых молекул, как описано в анализах на цитотоксичность. Через 48 ч инкубации 2-микролитровые аликвоты надосадочных жидкостей анализа анализируют в соответствии с инструкциями изготовителя.

Диффузионные тесты.

Слой матригеля (Matrigel) (75 мкл) добавляли к 24-луночным вкладышам Transwell (0,4 мкм), после чего к верхней и нижней камерам добавляли PBS (100 и 1025 мкл, соответственно) и уравнивали в течение ночи при 4°C. 100 пмоль IgG или Fab (козий анти-человеческий Fc, Jackson Immuno Research) или триспецифических молекул добавляли в верхнюю камеру, и диффузию каждой молекулы в нижнюю камеру определяли количественно во времени с помощью анализа ELISA для каждой конкретной молекулы. IgG и Fab захватывали ослиным антикозьим IgG (Jackson Immunoresearch), который был иммобилизован на ELISA-планшетах, и детектировали с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена ослиного антикозьего IgG (Jackson Immunoresearch) и по развитию TMB. Триспецифические молекулы захватывали человеческим сывороточным альбумином (Athens Research & Technology), который был иммобилизован на ELISA-планшетах, и детектировали с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена анти-His-антитела (GenScript) и по развитию TMB.

Относительную диффузию в каждой временной точке рассчитывали как: (концентрация в нижней камере в момент времени=t)/(концентрация в верхней камере в момент времени=t).

Статистически значимые различия в диффузии между молекулой IgG и Fab или триспецифическими молекулами были идентифицированы с использованием непарного t-теста.

Пример 8. Измерения аффинности для триспецифических молекул, направленных против EGFR.

Аффинности трех связывающих доменов в молекуле, направленной против EGFR, измеряли интерферометрией бислоев с использованием прибора Octet, и соответствующие данные обобщены в табл. 1.

Триспецифические молекулы, в которых EGFR-связывающий домен расположен на N-конце молекулы, показали значительно более высокие аффинности к EGFR, по сравнению с триспецифическими молекулами, которые содержали EGFR-связывающий домен в центре или в С-концевом положении. Аналогичным образом, триспецифические молекулы, содержащие альбумин-связывающий домен на N-конце, также демонстрировали более высокую аффинность к HSA, чем те, которые содержат альбумин в середине или в С-концевых положениях. В противоположность этому, все триспецифические молекулы показали очень сходные аффинности к CD3 человека, независимо от положения связывающего домена в пределах триспецифической молекулы.

Пример 9. Измерения аффинности для триспецифических молекул, направленных против PSMA.

Аффинности трех связывающих доменов в молекулах, направленных против PSMA, были измерены интерферометрией бислоев с использованием прибора Octet, и соответствующие данные обобщены в табл. 2.

Триспецифические молекулы, содержащие альбумин-связывающий домен на N-конце, имели более высокие аффинности к HSA, чем те, которые содержат альбумин-связывающий домен в середине или в С-концевых положениях. В отличие от этого, положение CD3-связывающего домена не влияет на аффинность к его мишени. Точно так же, положение PSMA-связывающего домена имело небольшое влияние на аффинность, причем все триспецифические молекулы имеют аффинности к PSMA человека, отличающиеся друг от друга не более чем в 3 раза.

Пример 10. Анализы цитотоксичности с триспецифическими молекулами.

Триспецифические молекулы испытывали в анализах зависимой от Т-клеток клеточной цитотоксичности (TDCC) в отношении их способности индуцировать первичные человеческие Т-клетки с тем, чтобы уничтожить опухолевые клетки человека зависимым от опухоли-мишени образом.

Триспецифические молекулы, содержащие полученные из однодоменного антитела нацеленные на опухоль домены против EGFR или PSMA, могут вызвать мощное уничтожение клеток механизмом, сравнимым с механизмом действия привлекающих Т-клетки биспецифических активаторов (bispecific T cell engagers (BiTE)), см. фиг. 5. Шесть направленных против EGFR триспецифических молекул с однодоменным анти-EGFR антителом (см. фиг. 4) и триспецифическая молекула, содержащая анти-EGFR scFv, были протестированы в количественных анализах TDCC с использованием линии NCI-1563 клеток аденокарциномы легких человека. Для сравнения EGFR BiTE был включен в каждом анализе (Lutterbuese et al., 2007. PNAS 107: 12605-12610.). Было продемонстрировано, что все 7 конфигураций направ-

ленных против EGFR триспецифических молекул эффективно убивают клетки-мишени (см. репрезентативные данные в табл. 3 и 4, и фиг. 6 и 8) с активностью, аналогичной с таковой EGFR BiTE. Анализ TDCC также была проведен с добавлением 15 мг/мл человеческого сывороточного альбумина, чтобы оценить влияние связывания альбумина на TDCC-активность триспецифических молекул. Как и ожидалось, потенциальная эффективность EGFR BiTE, в котором отсутствует альбумин-связывающий домен, была сходной в отсутствие или в присутствии альбумина. Потенциальные эффективности триспецифических молекул уменьшались в присутствии альбумина, но величина снижения зависела от конфигурации молекулы. Конфигурации, потенциальные эффективности которых уменьшались, по меньшей мере, в присутствии альбумина, представляли собой EGFR-scFv:C:A и E:A:C (анти-EGFR-scFv:анти-CD3E-scFv:анти-ALB-sdAb и анти-EGFR-sdAb:анти-ALB-sdAb:анти-CD3E-scFv).

Для того чтобы продемонстрировать, что результаты, полученные для направленных против EGFR триспецифических молекул, могут применяться ко всем триспецифическим молекулам, пять направленных против PSMA триспецифических молекул с однодоменным анти-PSMA антителом и триспецифическая молекула, содержащая анти-PSMA scFv, были протестированы в анализе TDCC с использованием эпителиальной клеточной линии 22Rv1 карциномы предстательной железы человека. Для сравнения, PSMA BiTE (pasotuxizumab) был включен в анализ. Типичные результаты можно найти в табл. 5 и на фиг. 7. Большинство направленных против PSMA триспецифических молекул обладали сходной активностью к PSMA BiTE в анализе TDCC, за исключением триспецифической молекулы с конфигурацией A:C:P (анти-PSMA-sdAb:анти-CD3E-scFv:анти-ALB-sdAb), данные триспецифические молекулы были также протестированы в анализе TDCC, содержащем 15 мг/мл человеческого сывороточного альбумина, чтобы оценить влияние связывания альбумина на TDCC-активность триспецифических молекул. Как и ожидалось, потенциальная активность PSMA BiTE, в котором отсутствует альбумин-связывающий домен, была сходной в отсутствие или в присутствии альбумина. Потенциальные эффективности триспецифических молекул уменьшались в присутствии альбумина, но величина снижения зависела от конфигурации молекулы. Конфигурации, потенциальные эффективности которых уменьшались, по меньшей мере, в присутствии альбумина, представляли собой P:A:C (анти-PSMA-sdAb:анти-ALB-sdAb:анти-CD3E-scFv). Триспецифические молекулы, описанные в настоящем изобретении, могут использовать различные модальности для направленной доставки в опухолевые клетки-мишени. На фиг. 5, 6 и 7 показаны триспецифические молекулы с sdAb-производными доменами, направленными против опухоли, и фиг. 7 и 8 показывают, что триспецифические молекулы с scFv-производным опухоль-связывающим доменом могут работать одинаково хорошо. На фиг. 9 продемонстрировано, что домен, направленный против опухоли, не ограничивается конструкциями, полученными из антител, такими как sdAbs и scFvs, но что домены не из иммуноглобулинов могут также работать. В данном примере финомер с молекулярной массой в 7 кДа, специфичный к Her2, использовали для перенаправления покоящихся Т-клеток человека, чтобы уничтожить клетки рака яичников человека.

Пример 11. Определение цитокиновой продукции с триспецифическими молекулами.

Для того чтобы показать, что триспецифические молекулы, протестированные в настоящем изобретении, действительно активировали Т-клетки и перенаправляли данные Т-клетки, чтобы уничтожить клетки опухоли, было проведено определение продукции цитокинов TNF α и IFN γ , параллельно с определением активности Т-клеток по уничтожению клеток, так как Т-клетки продуцируют данные цитокины, когда они активируются. Как показано на фиг. 10 и 11, четыре протестированные триспецифические молекулы, направленные против EGFR и PSMA, стимулировали продукцию TNF α и интерферона γ ; с потенциальной активностью, аналогичной их активности по уничтожению клеток. Полученные данные согласуются с утверждением, что триспецифические молекулы активируют Т-клетки, участвуя в привлечении клеток-мишеней.

Пример 12. Диффузионные тесты.

Размер триспецифических молекул, анализируемых в настоящем изобретении, меньше, чем у обычных молекул IgG, и, следовательно, ожидается, что они будут диффундировать быстрее и проникать в ткань лучше, чем моноклональные антитела. Для того чтобы оценить данное свойство, был разработан анализ диффузии/миграции через матригель. Для этой цели планшеты Transwell для анализа покрывали матригелем, желатинообразной белковой смесью, напоминающей сложную внеклеточную среду, найденную во многих тканях. Триспецифические молекулы, полноразмерные IgG или Fab-фрагменты добавляли в верхнюю камеру. Через восемь и 12 ч оценивали нижнюю камеру в отношении количества макромолекул, способных мигрировать через матрицу. Как показано на фиг. 12, триспецифические молекулы мигрируют в обеих временных точках со скоростью гораздо большей, чем полноразмерные молекулы IgG.

Пример 13. Определение анти-CD3 scFv вариантов с различной аффинностью к человеческим CD3 ϵ .

Характеристика исходного анти-CD3 ϵ фага.

Исходный анти-CD3 ϵ показывал хорошее связывание с биотин-CD3- ϵ и низкое связывание с биотин-HSA (фиг. 13).

Анти-CD3 ϵ scFv фаговые библиотеки.

Библиотека с одиночными замещениями была обеспечена для доменов CDR1 тяжелой цепи, CDR2

тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи. Остатки изменяли по одному посредством мутагенеза.

Выбор клонов и определение аффинности связывания.

Библиотеки с одиночными замещениями связывали с биотинилированным hu-CD3ε, промывали, элюировали и подсчитывали. Биотинилированные суноCD3 (яванского макака) использовали в качестве мишени для отбора первого раунда и промывали в течение 4 ч после комбинаторного связывания фагов из двух независимых библиотек (выбор ~2×). Биотинилированные hu-CD3 (человека) использовали в качестве мишени для отбора второго раунда и промывали в течение 3 ч после связывания обеих библиотек (выбор <2×). PCR-вкладыши из второго раунда отбора субклонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.4 His6. Отбирали 180 клонов, и ДНК очищали, секвенировали и трансфицировали в Expi293. Панель из шестнадцати клонов с диапазоном аффинностей для человеческого CD3ε была выбрана для более точного определения K_D (табл. 6).

В табл. 1 приведены аффинности триспецифических молекул, содержащих однодоменное антитело, направленное против EGFR, для трех антигенов-мишеней.

Расшифровка сокращений в таблице: E=анти-EGFR однодоменное антитело, C=анти-CD3E scFv, A=однодоменное антитело против альбумина.

Таблица 1. Аффинность

	hu-EGFR	hu-CD3	HSA
Триспецифическая конфигурация	K _D (нМ)	K _D (нМ)	K _D (нМ)
E:C:A	0,4	4,7	22,2
E:A:C	0,8	4,7	17,7
C:E:A	44,8	4,0	17,9
C:A:E	54,5	4,2	17,2
A:E:C	48,3	4,5	4,1
A:C:E	49,1	3,7	3,8

В табл. 2 приведены аффинности триспецифических молекул, содержащих однодоменное антитело, направленное против PSMA, для трех антигенов-мишеней. Расшифровка сокращений в таблице: P=анти-PSMA однодоменное антитело, C=анти-CD3E scFv, A=однодоменное антитело против альбумина.

Таблица 2. Аффинность

	hu-PSMA	hu-CD3	HSA
Триспецифическая конфигурация	K _D (нМ)	K _D (нМ)	K _D (нМ)
P:C:A	16,7	3,6	24,0
P:A:C	31,6	4,1	21,0
C:A:P	51,0	4,2	21,7
A:P:C	25,0	2,1	3,5
A:C:P	39,7	2,7	3,5

В табл. 3 приведены потенциальные активности триспецифических молекул, содержащих однодоменное антитело, направленное против EGFR, в анализах уничтожения клеток. Значения EC₅₀ представлены в виде молярных концентраций. Расшифровка сокращений в таблице: E=анти-EGFR однодоменное антитело, C=анти-CD3E scFv, A=однодоменное антитело против альбумина.

Таблица 3

Белок	EC ₅₀ (М)	EC ₅₀ с HSA (М)	Кратность изменения
E:C:A	1,30E-12	4,5E-11	35,4
E:A:C	1,40E-12	1,70E-11	12,3
C:E:A	5,60E-12	1,10E-10	20,4
C:A:E	5,50E-12	2,00E-10	36,2
A:E:C	6,90E-12	5,60E-10	81,5
A:C:E	6,10E-12	2,80E-10	45,5
EGFR BiTE	1,50E-12	2,30E-12	1,5

В табл. 4 приведены потенциальные активности триспецифических молекул, содержащих scFv-антитело, направленное против EGFR, и молекулу BiTE, в анализах уничтожения клеток. Значения EC₅₀ представлены в виде молярных концентраций. Расшифровка сокращений в таблице: E=анти-EGFR однодоменное антитело, C=анти-CD3E scFv, A=однодоменное антитело против альбумина.

Таблица 4

Белок	EC50 (М)	EC50 с HSA (М)	Кратность изменения
PSMA: scFv:C:A	1,60E-12	1,30E-11	7,8
PSMA BiTE	1,30E-12	1,70E-12	1,3

В табл. 5 приведены потенциальные активности триспецифических молекул, содержащих однодоменное антитело, направленное против PSMA, в анализах уничтожения клеток. Значения EC₅₀ представлены в виде молярных концентраций. Расшифровка сокращений в таблице: P=анти-PSMA однодоменное антитело, C=анти-CD3ε scFv, A=однодоменное антитело против альбумина.

Таблица 5

Белок	EC50 (М)	EC50 с HSA (М)	Кратность изменения
P:C:A	1,70E-10	2,35E-09	14,2
P:A:C	5,90E-11	2,23E-10	3,8
C:A:P	2,50E-10	1,23E-08	49,6
A:P:C	9,10E-11	4,02E-09	44
A:C:P	Не активен	Не активен	
PSMA: scFv:C:A	5,80E-10	2,00E-09	3,5
PSMA BiTE	1,30E-10	6,56E-11	0,5

В табл. 6 приведены аффинности связывания фаговых библиотек scFv CD3ε.

Таблица 6

анти-CD3ε scFv	K _D (нМ) CD3ε человека	kon(1/Мс)	кдисс(1/с)	K _D (нМ) CD3ε макака	kon(1/Мс)	кдисс(1/с)	Соотношение макак/ человек
Дикий тип	4,4	4,71E+05	2,07	3,9	4,63	1,83+05	0,9
2B2	3,8	6,08E+05	2,32	3,5	5,57E+05	1,93+05	0,9
9F2	4,1	3,61E+05	1,33	3,4	3,38E+05	1,05+05	0,8
5A2	4,3	5,66E+05	2,36	4,2	4,75E+05	1,93+05	1,0
6A2	4,7	5,22E+05	2,48	4,9	4,56E+05	2,22+05	1,0
2D2	6,4	5,27E+05	3,38	6,6	4,71E+05	3,09+05	1,0
3F2	8,0	7,04E+05	5,02	6,6	7,12E+05	4,38+05	0,8
2E4	14,4	4,16E+05	5,99	13,2	4,04E+05	5,32+05	0,9
2H2	16,0	5,87E+05	9,06E-03	16,0	5,25E+05	8,37+05	1,0
10B2	17,9	4,90E+05	8,74E-03	16,6	4,93E+05	8,15+05	0,9
1A2	19,9	5,99E+05	1,19E-02	17	5,31E+05	9,03+05	0,9
1C2	36,8	6,63E+05	2,44E-02	30	6,69E+05	1,97+05	0,8
2A4	46,3	3,64E+05	1,66E-02	43,4	3,53E+05	1,53+05	0,9
10E4	49,8	5,2E+05	2,60E-02	46,8	5,08E+05	2,38+05	0,9
8A5	109	7,46E+05	8,10E-02	103	7,23E+05	7,44+05	0,9
2G5	117	9,94E+05	1,15E-01	115	9,64E+05	1,11+05	1,0
1G4	132,9	1,67E+05	2,20E-02	133,7	1,64E+05	2,19+05	1,0

Таблица 7. Последовательности

SEQ ID NO:	Конструкция	Сокращение	Последовательность
1	Триспецифическая αEGFR:αCD3: αАльбумин	E:C:A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTF SSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGST YYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMNSL KPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEY DYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMN WVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYA

			DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT TVVSSGGGGSGGGSGGGSGQTTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSL LGKKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSN RWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSHNNHHH
2	Триспецифическая αEGFR: αАльбумин: αCD3	E:C:A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTF SSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGST YYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL KPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEY DYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGGGSGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWA YWQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGKKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHNNHHH
3	Триспецифическая αCD3:αEGFR: αАльбумин	C:E:A	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWA YWQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGKKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGG SEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGS TYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL KPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEY

			DYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSHHHHHH*
4	Триспецифи- ческая α CD3: α Альбумин: α EGFR	C:A:E	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYISYWA YWGQGTTLVTVSSGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS GNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGSGGG SEVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTF SSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAI NWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTMY LQMNSLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNF KDYEDYWGQGTQVTVSSHHHHHH
5	Триспецифи- ческая α Альбумин: α EGFR: α CD3	A:E:C	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCA ASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAI WSSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTMYL QMNSLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNF KDYEDYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYISYWAY WGQGTTLVTVSSGGGSGGGSGGGGSQT VVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSG NYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
6	Триспецифи-	A:C:E	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFS

	ческая αАльбумин: αCD3:αEGFR		SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCA ASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCSST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAA SGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINW SSGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFK DYEYDYWGQGTQVTVSSHHHHHHH*
7	EGFR BiTE		DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTN IHWYQQRNTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFS GSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNN WPTTFGAGTKLELKGGGGSGGGGSGGGG SQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLT NYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTD YNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSN DTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTTLVT VSASGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGG GSGGGGSQTVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTC GSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL HHHHHH
8	EGFR-scFv:C:A	EGFR-scFv:C:A	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTN IHWYQQRNTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFS GSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNN WPTTFGAGTKLELKGGGGSGGGGSGGGG SQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLT NYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTD YNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSN

			DTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVT VSASGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC GSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRL SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTL YLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LTVTVSSHHHHHH
9	Триспецифи- ческая αPSMA:αCD3: αАльбумин	P:C:A	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMIS EYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTD YAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKP EDTAVYYCDGYGYRGQGTQTVTVSSGGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA SGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYIS YWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGG GGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG AVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFL APGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGS GGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LTVTVSSHHHHHH
10	Триспецифи- ческая αPSMA: αАльбумин:αC D3	P:A:C	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMIS EYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTD YAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKP EDTAVYYCDGYGYRGQGTQTVTVSSGGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LTVTV

			SSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGSG GGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRG LIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKL TVLHHHHHHH
11	Триспецифи- ческая αCD3: αАльбумин: αPSMA	C:A:P	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWA YWGQGTLLTVSSGGGSGGGGSGGGGSGQ TVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVT SNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGSGGG SEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNATTLYLQMNLSLR PEDTAVYYCTIGGSLRSGGTLTVSSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTLSC AASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTI NPAGTTDYAESVKGRTISRDNATNTLYL QMNSLKPEDTAVYYCDGYGYRGQTQVT VSSHHHHHHH
12	Триспецифи- ческая αАльбумин: αPSMA:αCD3	A:P:C	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNATTLYLQMNLSLRP EDTAVYYCTIGGSLRSGGTLTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCA ASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTIN PAGTTDYAESVKGRTISRDNATNTLYLQ MNSLKPEDTAVYYCDGYGYRGQTQVT SSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC AASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGN SYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGSGGGG

			SGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS STGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHH HHHH*
13	Триспецифи- ческая α Альбумин: α CD3: α PSMA	A:C:P	EVQLVESGGGLVQPNSLRSLCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTSLTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCA ASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNAATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGTSLTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAA SRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINP AGTTDYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQM NSLPEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVS SHHHHHH*
14	Триспецифи- ческая α PSMA- scFv: α CD3: α Альбумин	PSMA- scFv:C:A	QVQLVESGGGLVKPGESLRSLCAASGFTFS DYMYWVRQAPGKGLEWVAISDGGYYT YYSDIKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLKA EDTAVYYCARGFLLRHGAMDYWGQGTSL TVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRTITCKASQNVDTNVAWYQQ KPGQAPKSLIYSASYRYSQVPSRFGSASG TDFTLTISSVQSEDFATYYCQYDSYPYTF GGGKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNAATYYADSVKDRF TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYISYWAYWGQGTSLTVSSGG GGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGG GTKLTVLGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ

			PGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSRSSQGTLVTVSSHHHHHH
15	PSMA BiTE		QVQLVESGGGLVQPGESLRRLSCAASGFTFS DYVMYVWRQAPGKGLEWVAISDGGYYT YYSDIKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLKA EDTAVYYCARGFLLRHGAMDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRTITCKASQNVDTNVAWYQQ KPGQAPKSLIYSASYRSDVPSRFGSASG TDFTLTISSVQSEDFATYYCQYDSYPYTF GGGKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSI.KI.SCAASGFTFNKYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGG GGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGG GKTLTVLHHHHHH
16	Триспецифи- ческая Her2- Финомер:αCD 3:αАльбумин		GVTFLFVALYDYTSYNTRDLSFHKGEKFQIL RMEDGVWWEARSLTTGETGYIPSNYVAP VDSIQGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR HGNGFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGG GSGGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAP RGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVLGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG NSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGK GLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS RSSQGTLVTVSSHHHHHH*
17	Триспецифи- ческая	A:M:C	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRP

	αCD3: αАльбумин: αMSLN		EDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGG GSGGGSQVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCA ASDFDFAAYDMSWVRQAPGQGLEWVAIIS HDGIDKYYDDSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNTLRAEDTATYQCLRLGAVGQGTLVT VSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGTLLTVTVSSGGGS GGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVT LTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTK LTVLHHHHHH
18	Триспецифи- ческая αАльбумин: αMSLN:αCD3	A:M:C	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGG GSGGGSQVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCA ASDFDFAAYDMSWVRQAPGQGLEWVAIIS HDGIDKYYDDSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNTLRAEDTATYQCLRLGAVGQGTLVT VSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGTLLTVTVSSGGGS GGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVT LTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTK LTVLHHHHHH
19	Триспецифи- ческая αАльбумин: αCD3:αMSLN	A:C:M	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCA ASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY
			ISYWAYWGQGTLLTVTVSSGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSST GAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGG SGGGSQVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAA SDFDFAAYDMSWVRQAPGQGLEWVAIISH DGIDKYYDDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNTLRAEDTATYQCLRLGAVGQGTLTV SSHHHHHHH*

Таблица 8. Последовательности

SEQ ID NO:	Связывающий элемент	Название	Цепь	Последовательность
20	CD3	Анти-huCD3E-scFv		DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRY TMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQK FKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGSGG SGGSGGSGGVDDIQLTQSPAISASPGKVTM TCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSK VASGVYPYRFGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATY YCQQWSSNPLTFGAGTKLELK
21	CD3	Анти-huCD3E	Варибельная тяжелая	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFKFSGY GMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKKYYV DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARQMGYWHFDLWGRGTLTVTVSS
22	CD3	Анти-huCD3E	Варибельная легкая	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTF GGGTKVEIK
23	CD3	Анти-huCD3E	Варибельная тяжелая	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFP MAWVRQAPGKGLEWVSTISTSGGRYYRDSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKFRQYSGGFDYWGQGTTLTVTVSS
24	CD3	Анти-huCD3E	Варибельная легкая	DIQLTQPNVSTSLGSTVKLSCTLSSGNIENNY VHWYQLYEGRSPTTMIYDDDKRPDGVDPDRFS GSIDRSSNSAFLTIHNVAIEDEAIYFCHSYVSSF NVFGGGTKLTVLR
25	CD3	Анти-huCD3E-scFv		DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTR YTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYAD SVKGRFTITTDKSTAYMELSSLRSEDATYY CARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGEGTSTG SGGSGGSGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKV ASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYY CQQWSSNPLTFGGGTKVEIK
26	CD3	Анти-huCD3E (гуманизированный ОКТ3)	Варибельная тяжелая	QVQLVQSGGGVVQPGRLRLSCKASGYTFTRY TMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQK VKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGYYF CARYYDDHYCLDYWGQGTPTVTVSS
27	CD3	Анти-huCD3E (гуманизированный)	Варибельная легкая	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMN WYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSG SGTDYFTFISLQPEDATYYCQQWSSNPFTFG QGTKLQITR

		й ОКТ3)		
28	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная тяжелая	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTY AMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTS S
29	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная легкая	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTS NYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYS NLWVFGGGTKLTVL
30	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная тяжелая	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDY TMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSGYADS VKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYY CAKDNSGYGHYYYGMDVWGQGTTVTVAS
31	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная легкая	AEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSN LAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQHYINWPLT FGGGTKVEIK
32	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная тяжелая	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTR STMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSSAYTNYNQ KFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY YCASRVHYDYNFGPYWGQGLTVTVSS
33	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная легкая	QVVLTSQSPAIMSAFPGEKVTMTCSASSSVSYM NWYQQKSGTSPKRWIYDSSKLASGVPARFSGS GSGTSYSLTISSMETEDAATYYCQQWSRNPPTF GGGTKLQITR
34	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная тяжелая	EVKLESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTY AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYY ADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTA MYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTS A
35	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная легкая	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSN YANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFS GSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNL WVFGGGTKLTVLG
36	CD3	гуманизи рованный scFv		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTY AMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTS SGGGGSGGGGSGGGGSAVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLG AQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
37	CD3	CD3- связываю щий		QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTR YTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQ KFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY

		элемент		YCARYYDDHYSLDYWQGTTTLTVSSAKTTPD IVLTQSPAIMASASPGKVTMTCSASSSVSYMN WYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVP AHFRGS GSGTSYSLTISGMEAEADAATYYCQQWSSNPFT FGSGTKLEINRADTAAAGSHHHHHH
38	HSA	Только домен VH		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKY WMSWVRQAPGKGLEWVSSIDFMGPHTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGRTSMLPMKGKFDYWQGTLTVSS
39	HSA	Только домен VH		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFDEY NMSWVRQAPGKGLEWVSTILPHGDRITYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKQDPLYRFDYWQGTLTVSS
40	HSA	Только домен VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQKIATYL NWYQQKPGKAPKLLIYRSSLQSAVPSRFSGS GSGTVFTLTISLQPEDFATYYCQQTAVPPTF GQGTKVEIKR
41	HSA	Только домен VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYRNSPLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYRVPPTFG QGTKVEIKR
42	HSA	MSA21		QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRF GMTWVRQAPGKGVWVSSIGSLGSDTLYADS VKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYY CTIGGSLNPGGQGTQTVSS
43	HSA	Неприрод ные консенсу сные альбумин - связываю щие домены		LKEAKEKAIEELKKAGITSDDYYFDLINKAKTVE GVNALKDEILKA
44	HSA	анти- ALB FAB	Вариабель ная тяжелая	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNY AINWVRQAPGKCLEWIGIHWASGTTFYATWAK GRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA RTVPGYSTAPYFDLWGQGTQTVSS
45	HSA	анти- ALB FAB	Вариабель ная легкая	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCQSSPSVWSNF LSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCGGGYSSISDTT FGCGTKVEIKRT
46	HSA	Только HSA VH		AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSF GMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTQTVSS
47	HSA	Только HSA VH		EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTQTVSS
48	HSA	Только HSA VH		AVQLVESGGGLVQGGGSLRLACAASERIFDLN LMGWYRQGPGENERELVATCITVGDSTNYADS VKGRFTISM DYTKQTVYLHMNSLRPEDTGLY YCKIRRTWHSSELWGQGTQTVSS

В то время как в настоящем изобретении были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления приведены только в качестве примера. Многочисленные варианты, изменения и замены будут очевидны специалистам в данной области техники без отступления от сущности изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящем изобретении, могут быть использованы в практической реализации изобретения. Предполагается, что последующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения, и что способы и конструкции в пределах объема данных требований и их эквивалентов, таким образом, будут покрыты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Триспецифический антигенсвязывающий белок, причем триспецифический антигенсвязывающий белок содержит:

(а) первый домен (А), который содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывается с CD3 человека;

(b) второй домен (В), который содержит однодоменное антитело (sdAb), который связывает человеческий сывороточный альбумин; и

(с) третий домен (С), который содержит sdAb, который специфически связывается с опухолевым антигеном-мишенью, который представляет собой EGFR, PSMA, HER2 или MSLN, причем триспецифический антигенсвязывающий белок имеет сродство к связыванию с опухолевым антигеном-мишенью, составляющее 200 нМ или менее;

причем домены соединены в порядке $H_2N-(C)-(B)-(A)-COOH$ или с помощью линкеров L1 и L2; причем линкеры L1 и L2 независимо представляют собой $(GS)_n$ (SEQ ID NO: 49), $(GGS)_n$ (SEQ ID NO: 50), $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 51), $(GGSG)_n$ (SEQ ID NO: 52) или $(GGSGG)_n$ (SEQ ID NO: 53), $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 54), причем n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и

причем триспецифический антигенсвязывающий белок имеет размер меньше чем 60 кДа.

2. Триспецифический антигенсвязывающий белок по п.1, в котором первый домен содержит определяющие комплементарность области (CDR), выбранные из группы, состоящей из муромонаба-CD3 (OKT3), отеликсизумаба (TRX4), теплизумаба (MGA031), визилизумаба (Nuvion), SP34, X35, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, OKT3D, M-T301, SMC2, F101.01, UCNT-1 и WT-31.

3. Триспецифический антигенсвязывающий белок по п.1, в котором первый домен является гуманизированным или человеческим.

4. Триспецифический антигенсвязывающий белок по п.1, в котором линкеры L1 и L2, каждый независимо, представляют собой $(GGGGS)_4$ (SEQ ID NO: 55) или $(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO: 56).

5. Триспецифический антигенсвязывающий белок по п.1, в котором первый домен является специфическим для CD3ε (эпсилон).

6. Триспецифический антигенсвязывающий белок по п.1, в котором первый домен имеет перекрестную реактивность с CD3 яванского макака.

7. Триспецифический антигенсвязывающий белок по п.1, в котором третий домен специфически связывается с EGFR.

8. Триспецифический антигенсвязывающий белок по п.1, в котором третий домен специфически связывается с PSMA.

9. Триспецифический антигенсвязывающий белок по п.1, в котором третий домен специфически связывается с HER2.

10. Триспецифический антигенсвязывающий белок по п.1, в котором третий домен специфически связывается с MSLN.

11. Триспецифический антигенсвязывающий белок по п.1, причем триспецифический антигенсвязывающий белок имеет период полувыведения по меньшей мере около 50 ч.

12. Фармацевтическая композиция для лечения пролиферативного заболевания индивидуума, содержащая:

(i) триспецифический антигенсвязывающий белок по любому из пп.1-11, и

(ii) фармацевтически приемлемый носитель.

13. Применение триспецифического антигенсвязывающего белка по любому из пп.1-11 для изготовления лекарственного средства для лечения рака у индивидуума.

14. Применение по п.13, в котором рак представляет собой гематологический рак.

15. Применение по п.13, в котором рак представляет собой рак с солидной опухолью.

16. Применение по п.15, в котором рак с солидной опухолью представляет собой рак молочной железы, рак легкого, рак предстательной железы, рак яичников или рак поджелудочной железы.

17. Применение по п.13, в котором лекарственное средство предназначено для введения в сочетании с химиотерапией, гормональной терапией, радиотерапией, генной терапией или иммунотерапией.

18. Применение по п.13, в котором лекарственное средство предназначено для введения в комбинации с антидиарейным средством, антирвотным средством, анальгетиком, опиоидом и/или нестероидным противовоспалительным средством.

19. Применение триспецифического антигенсвязывающего белка по любому из пп.1-6 для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния, связанного с PSMA у индивидуума, причем указанный (с) третий домен (С) содержит sdAb, который специфически связывается с опухолевым антигеном-мишенью, который представляет собой PSMA.

20. Применение триспецифического антигенсвязывающего белка по любому из пп.1-6 для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния, связанного с

MSLN у индивидуума, причем указанный (с) третий домен (C) содержит sdAb, который специфически связывается с опухолевым антигеном-мишенью, который представляет собой MSLN.

21. Применение триспецифического антигенсвязывающего белка по любому из пп.1-11 для изготовления лекарственного средства для стимулирования иммунной системы индивидуума.

22. Триспецифический антигенсвязывающий белок, причем триспецифический антигенсвязывающий белок содержит:

(а) первый домен (A), который содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывается с CD3 человека;

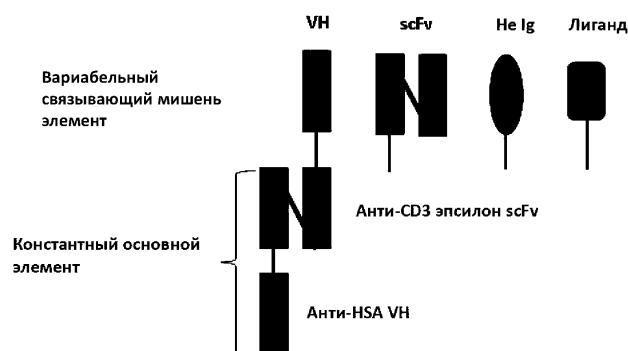
(б) второй домен (B), который содержит однодоменное антитело (sdAb), который связывает человеческий сывороточный альбумин; и

(с) третий домен (C), который содержит sdAb, который специфически связывается с опухолевым антигеном-мишенью, который представляет собой EGFR, PSMA, HER2 или MSLN,

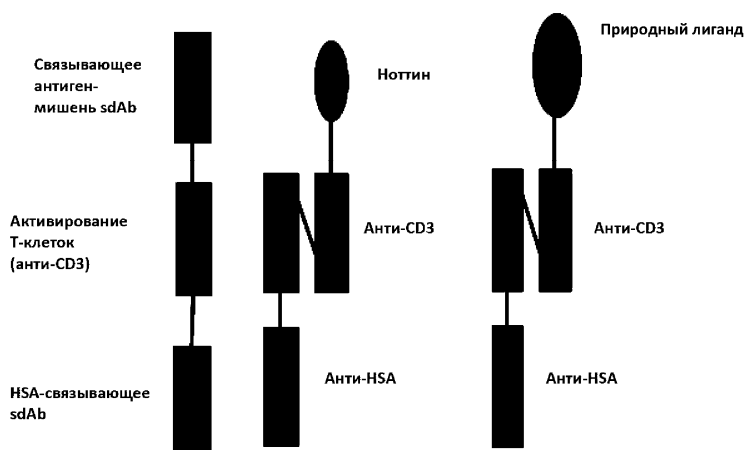
причем домены соединены в порядке $H_2N-(C)-(B)-(A)-COOH$ или с помощью линкеров L1 и L2, причем линкеры L1 и L2 независимо представляют собой GGGSGGGS (аминокислотные остатки 128-136 из SEQ ID NO: 1) и (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 56),

причем триспецифический антигенсвязывающий белок имеет сродство к связыванию с опухолевым антигеном-мишенью, составляющее 200 нМ или менее; и

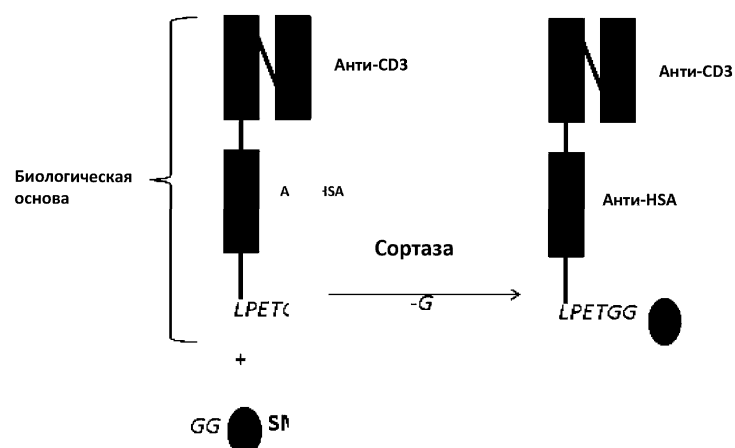
причем триспецифический антигенсвязывающий белок имеет размер меньше чем 60 кДа.



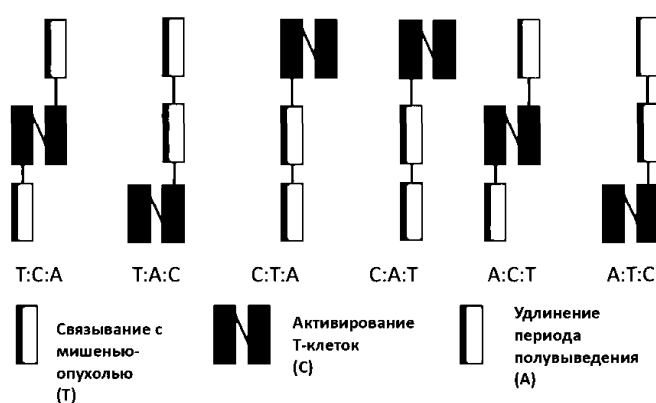
Фиг. 1



Фиг. 2

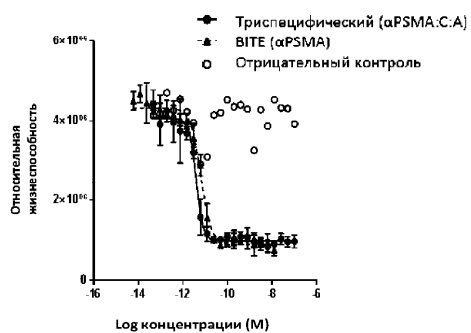


Фиг. 3

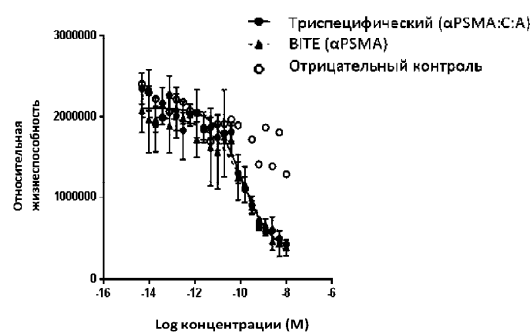


Фиг. 4

Опосредованный Т-клетками лизис клеток линии 22Rv1 рака простаты направленными против EGFR активаторами Т-клеток

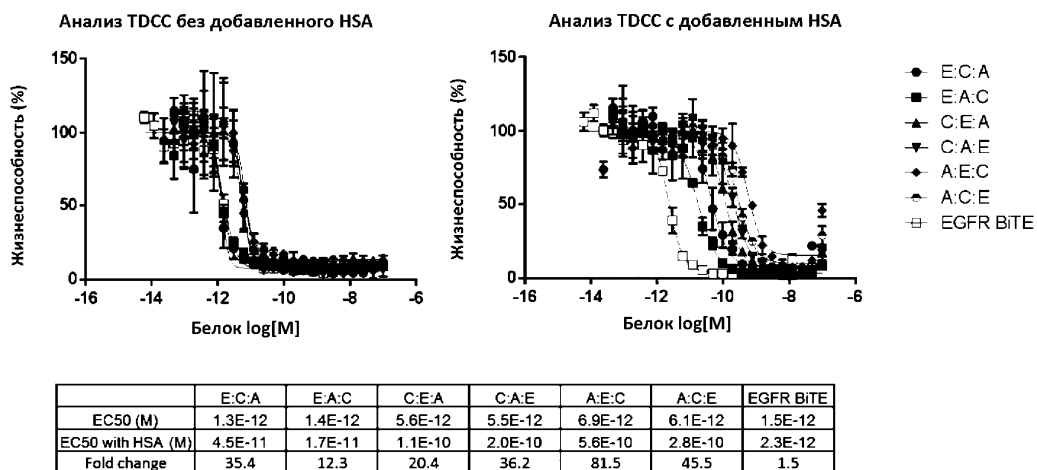


Опосредованный Т-клетками лизис клеток линии 22Rv1 рака простаты направленными против PSMA активаторами Т-клеток

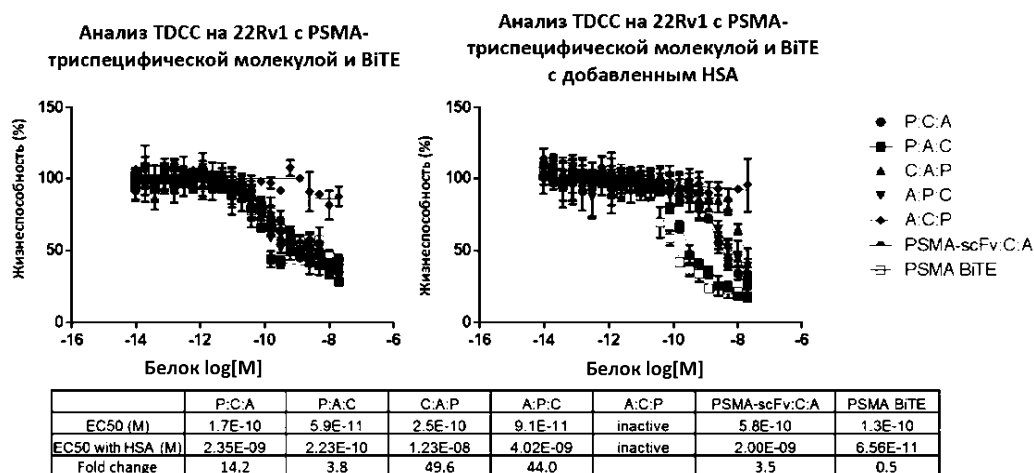


	Триспецифический (EGFR)	BiTE (EGFR)	Триспецифический (PSMA)	BiTE (PSMA)
EC ₅₀ (pM)	3.9	6.4	113	189

Фиг. 5

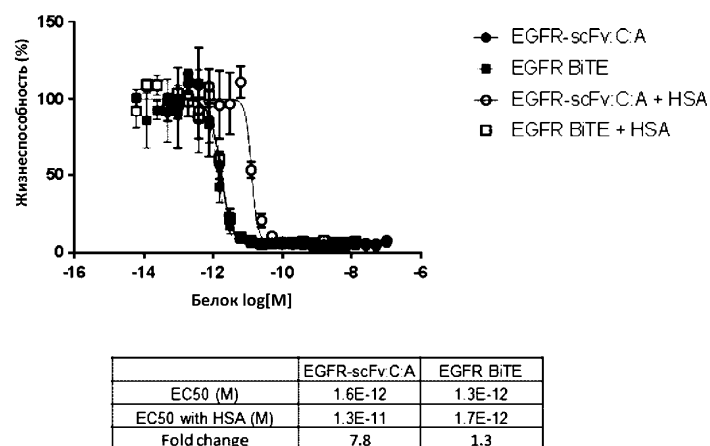


Фиг. 6



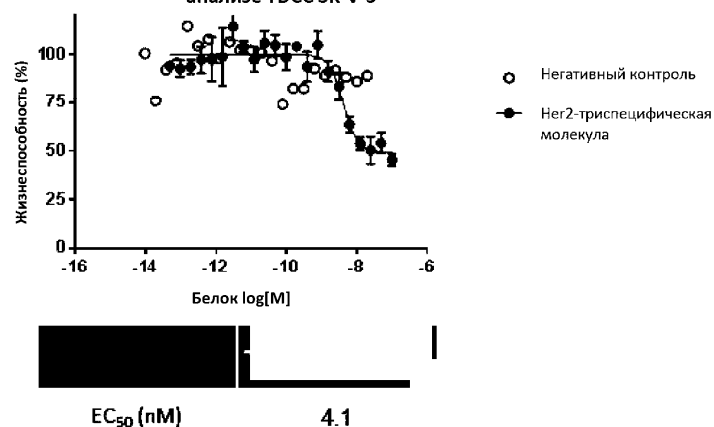
Фиг. 7

Активность триспецифической молекулы EGFR-scFv и EGFR-BiTE при анализе TDCC NCI-1563

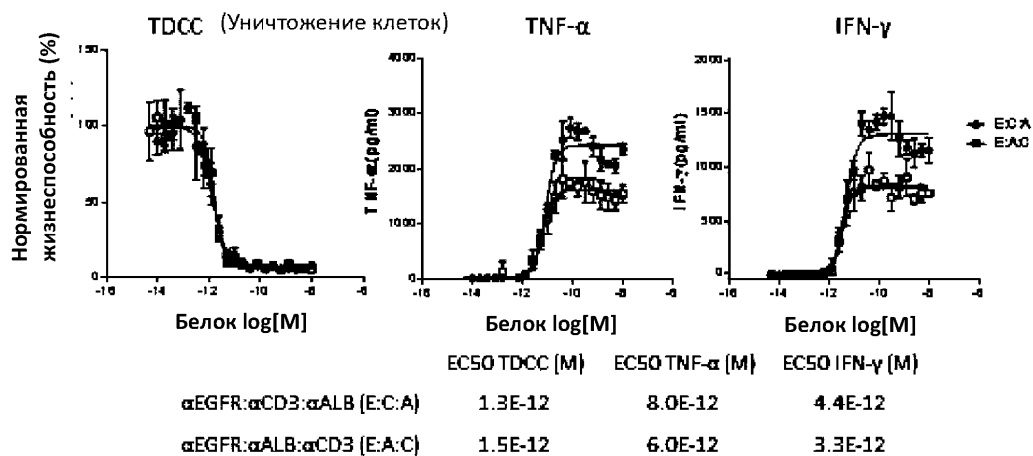


Фиг. 8

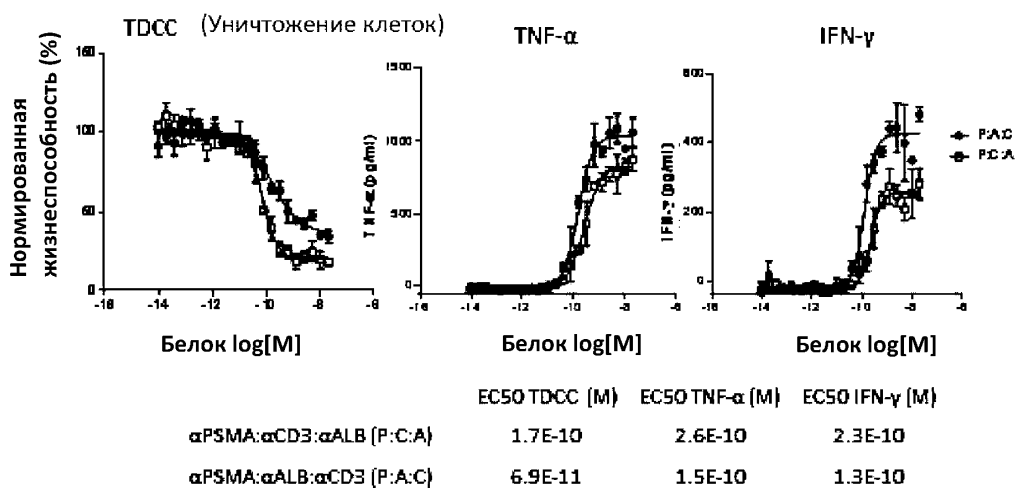
Активность направленной против Her2
триспецифической молекулы на основе фиомера в
анализе TDCC SK-V-3



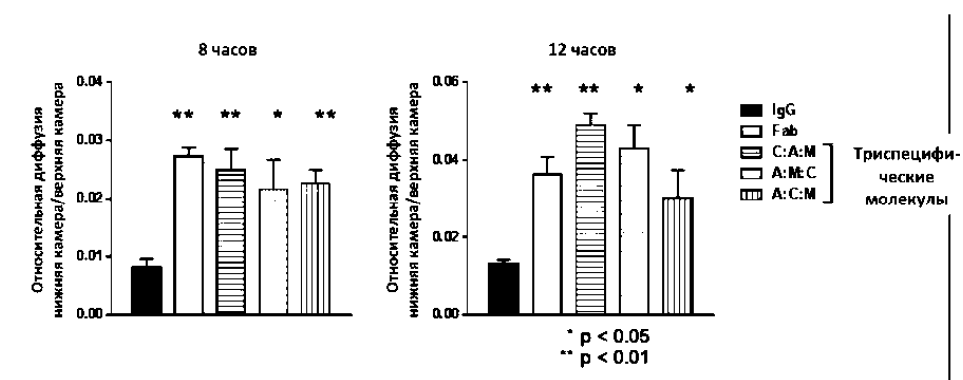
Фиг. 9



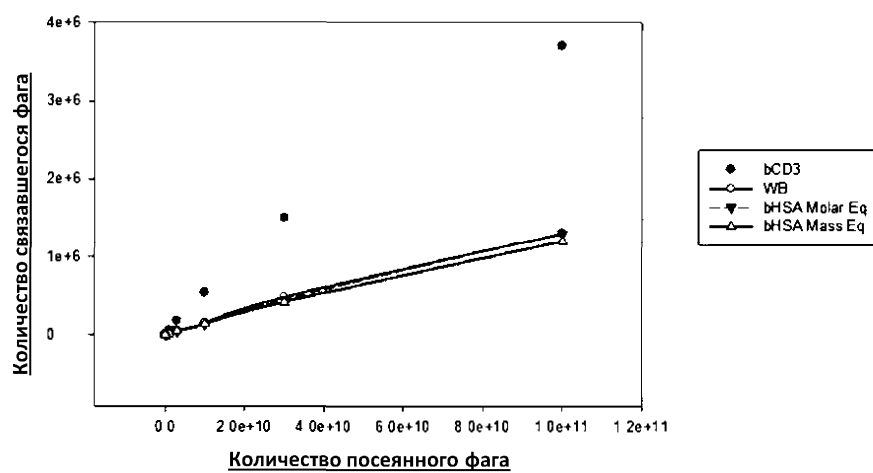
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2