

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042731**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.20

(21) Номер заявки
201892693

(22) Дата подачи заявки
2017.05.19

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) **БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЙ ВАРИАБЕЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ, СВЯЗЫВАЮЩИЙСЯ С CD3**

(31) **62/339,685**

(32) **2016.05.20**

(33) **US**

(43) **2019.04.30**

(86) **PCT/US2017/033673**

(87) **WO 2017/201493 2017.11.23**

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

(72) Изобретатель:
Дабридж Роберт Б., Сето Пуи, Остин
Ричард Дж., Эвнин Люк, Гуно
Жанмари, Лемон Брайан Д. (US)

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

(56) **US-A1-20160032019**
US-A1-20150232557
US-B2-7262276
US-A1-20110275787
US-A1-20140088295

(57) В настоящем изобретении раскрыты белки, содержащие одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, с улучшенными значениями аффинности связывания и надежными профилями агрегации. Также описаны мультиспецифические связывающие белки, включающие белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением. Предлагаются фармацевтические композиции, содержащие связывающие белки, раскрытые в настоящем изобретении, и способы применения таких составов.

B1**042731****042731****B1**

Перекрестная ссылка

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США 62/339685, поданной 20 мая 2016 года, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Перечень последовательностей

В настоящей заявке содержится список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Упомянутая копия ASCII, созданная 19 мая 2017 года, называется 47517-704_601_SEQ.TXT и имеет размер 66042 байт.

Включение посредством ссылки

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ 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 и были изложены в настоящем изобретении во всей своей полноте.

Предпосылки создания изобретения

CD3 представляет собой гомодимерный или гетеродимерный антиген, экспрессирующийся на Т-клетках в ассоциации с комплексом Т-клеточного рецептора (TCR) и требуемый для активации Т-клеток. Антитела против CD3 имеют терапевтические цели, включающие активацию Т-клеток. В настоящем изобретении предлагаются белки, содержащие одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, включая содержащие его мультиспецифические антитела.

Сущность изобретения

В одном варианте осуществления раскрыт белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, при этом указанный белок содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), вариабельную область легкой цепи (VL) и линкер, при этом VH содержит определяющие комплементарность области HC CDR1, HC CDR2 и HC CDR3, при этом VL содержит определяющие комплементарность области LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3, где (a) аминокислотная последовательность HC CDR1 представлена в $GX_1X_2X_3NX_4YX_5X_6N$ (SEQ ID NO: 2), X_1 представляет собой фенилаланин или аспарагин, X_2 представляет собой треонин, глутаминовую кислоту или метионин, X_3 представляет собой фенилаланин или тирозин, X_4 представляет собой лизин, треонин, глицин, аспарагин или глутаминовую кислоту, X_5 представляет собой аланин или пролин, X_6 представляет собой метионин, лейцин, валин или изолейцин; (b) аминокислотная последовательность HC CDR2 представлена в $RIRSX_7X_8NX_9YX_{10}TX_{11}YX_{12}DX_{13}VK$ (SEQ ID NO: 3), X_7 представляет собой лизин или глицин, X_8 представляет собой тирозин или серин, X_9 представляет собой аспарагин или лизин, X_{10} представляет собой аланин или глутаминовую кислоту, X_{11} представляет собой тирозин или глутаминовую кислоту, X_{12} представляет собой аланин или лизин, X_{13} представляет собой серин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, аланин или глутамин; (c) аминокислотная последовательность HC CDR3 представлена в $HX_{14}NFX_{15}X_{16}SX_{17}ISYWAX_{18}$ (SEQ ID NO: 4), X_{14} представляет собой глицин, аланин или треонин, X_{15} представляет собой глицин или аспарагин, X_{16} представляет собой аспарагин или аспарагиновую кислоту, X_{17} представляет собой тирозин, гистидин, пролин, глутамин, лейцин или глицин, X_{18} представляет собой тирозин или треонин; (d) аминокислотная последовательность LC CDR1 представлена в $X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}GX_{23}VX_{24}X_{25}GX_{26}YPN$ (SEQ ID NO: 5), X_{19} представляет собой глицин или аланин, X_{20} представляет собой серин или глутаминовую кислоту, X_{21} представляет собой серин или тирозин, X_{22} представляет собой треонин, фенилаланин, лизин или серин, X_{23} представляет собой аланин или тирозин, X_{24} представляет собой треонин или валин, X_{25} представляет собой серин, аспарагиновую кислоту, лизин, гистидин или валин, X_{26} представляет собой аспарагин или тирозин; (e) аминокислотная последовательность LC CDR2 представлена в $GX_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}P$ (SEQ ID NO: 6), X_{27} представляет собой треонин или изолейцин, X_{28} представляет собой лизин, глутаминовую кислоту, тирозин, аспарагин или серин, X_{29} представляет собой фенилаланин, лейцин, глутаминовую кислоту, изолейцин, метионин или валин, X_{30} представляет собой лейцин, аспарагин или глицин, X_{31} представляет собой аланин или валин; и (f) аминокислотная последовательность LC CDR3 представлена в $X_{32}LWYX_{33}NX_{34}WX_{35}$ (SEQ ID NO: 7), X_{32} представляет собой валин, треонин или аланин, X_{33} представляет собой серин, аспарагиновую кислоту или аланин, X_{34} представляет собой аргинин или серин, X_{35} представляет собой валин, изолейцин или аланин, при этом $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, X_8, X_9, X_{10}, X_{11}, X_{12}, X_{13}, X_{14}, X_{15}, X_{16}, X_{17}, X_{18}, X_{19}, X_{20}, X_{21}, X_{22}, X_{23}, X_{24}, X_{25}, X_{26}, X_{27}, X_{28}, X_{29}, X_{30}, X_{31}, X_{32}, X_{33}, X_{34}$ и X_{35} не являются одновременно фенилаланином, треонином, фенилаланином, лизином, аланином, метионином, лизином, тирозином, аспарагином, аланином, тирозином, аланином, серином, глицином, глицином, аспарагином, тирозином, тирозином, глицином, серином, серином, треонином, аланином, треонином, серином, аспарагином, треонином, лизином, фенилаланином, лейцином, аланином, валином, серином, аргинином и валином, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет следующую формулу: $f_1-r_1-f_2-r_2-f_3-r_3-f_4-r_4-f_5-r_5-f_6-r_6-f_7$, где r_1 представляет собой SEQ ID NO: 2; r_2 представляет собой SEQ ID NO: 3; r_3 представляет собой SEQ ID NO: 4; r_4 представляет собой SEQ ID NO: 5; r_5 представляет собой SEQ ID NO: 6; и r_6 представляет собой SEQ ID NO: 7; и где f_1, f_2, f_3, f_4 и f_5 представляют собой остатки каркасных участков, выбранные таким

- 3 -

- 5 -

белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и значения hKd и cKd находятся в диапазоне от около 125 нМ до около 140 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94, и значения hKd и cKd примерно в 20-50 раз выше, чем аффинность связывания по отношению к CD3 белка, который содержит последовательность, представленную в wt анти-CD3 (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94, и значения hKd и cKd находятся в диапазоне от около 100 нМ до около 120 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 95, и значения hKd и cKd примерно в 20-50 раз выше, чем аффинность связывания по отношению к CD3 белка, который содержит последовательность, представленную в wt анти-CD3 (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 95, и значения hKd и cKd находятся в диапазоне от около 100 нМ до около 120 нМ. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предлагается белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержащий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22 (wt анти-CD3), при этом один или несколько аминокислотных остатков, выбранных из аминокислотных положений 27, 28, 29, 31, 33, 34, 54, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 102, 105, 106, 108, 114, 163, 164, 165, 166, 168, 170, 171, 173, 193, 194, 195, 196, 197, 231, 235, 237 и 239, являются замещенными, при этом аминокислотное положение 27 замещено аспарагином, аминокислотное положение 28 замещено глутаминовой кислотой или метионином, аминокислотное положение 29 замещено тирозином, аминокислотное положение 31 замещено аспарагином, глицином, глутаминовой кислотой или треонином, аминокислотное положение 33 замещено пролином, аминокислотное положение 34 замещено валином, лейцином или изолейцином, аминокислотное положение 54 замещено глицином, аминокислотное положение 55 замещено серином, аминокислотное положение 57 замещено лизином, аминокислотное положение 59 замещено глутаминовой кислотой, аминокислотное положение 61 замещено глутаминовой кислотой, аминокислотное положение 63 замещено лизином, аминокислотное положение 65 замещено аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, аланином или глутамином, аминокислотное положение 102 замещено аланином или треонином, аминокислотное положение 105 замещено аспарагином, аминокислотное положение 106 замещено аспарагиновой кислотой, аминокислотное положение 108 замещено гистидином, пролином, глутамином, глицином или лейцином, аминокислотное положение 114 замещено треонином, аминокислотное положение 163 замещено аланином, аминокислотное положение 164 замещено глутаминовой кислотой, аминокислотное положение 165 замещено тирозином, аминокислотное положение 166 замещено фенилаланином, лизином или серином, аминокислотное положение 168 замещено тирозином, аминокислотное положение 170 замещено валином, аминокислотное положение 171 замещено аспарагиновой кислотой, лизином, валином или гистидином, аминокислотное положение 173 замещено тирозином, аминокислотное положение 193 замещено изолейцином, аминокислотное положение 194 замещено глутаминовой кислотой, тирозином, аспарагином или серином, аминокислотное положение 195 замещено лейцином, глутаминовой кислотой, изолейцином, метионином или валином, аминокислотное положение 196 замещено аспарагином или глицином, аминокислотное положение 197 замещено валином, аминокислотное положение 231 замещено треонином или аланином, аминокислотное положение 235 замещено аспарагиновой кислотой или аланином, аминокислотное положение 237 замещено серином и аминокислотное положение 239 замещено аланином или изолейцином. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит одно или несколько дополнительных замещений в аминокислотных положениях, отличных от положений 27, 28, 29, 31, 33, 34, 54, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 102, 105, 106, 108, 114, 163, 164, 165, 166, 168, 170, 171, 173, 193, 194, 195, 196, 197, 231, 235, 237 и 239. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит замещение в положении 27. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит замещение в положении 28. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит замещение в положении 29. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит замещение в положении 31. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит замещение в положении 33. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит замещение в положении 34. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит замещение в положении 54. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит замещение в положении 55. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент,

В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит последовательность, в которой аминокислотные положения 34, 65, 102, 163, 197 и 231 являются замещенными, и при этом значения hKd и cKd являются примерно такими же, как аффинность связывания по отношению к CD3 белка, который имеет последовательность, представленную в wt анти-CD3 (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит последовательность, в которой аминокислотные положения 34, 65, 102, 163, 197 и 231 являются замещенными, и при этом значения hKd и cKd находятся в диапазоне от около 3 нМ до около 5 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит последовательность, в которой аминокислотные положения 28, 57, 166 и 235 являются замещенными, и при этом значения hKd и cKd являются такими же, как аффинность связывания по отношению к CD3 белка, который имеет последовательность, представленную в wt анти-CD3 (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит последовательность, в которой аминокислотные положения 28, 57, 166 и 235 являются замещенными, и при этом значения hKd и cKd находятся в диапазоне от около 3 нМ до около 5 нМ.

- 8 -

этом значения hK_d и cK_d примерно в 20-50 раз выше, чем аффинность связывания по отношению к CD3 белка, который имеет последовательность, представленную в wt анти-CD3 (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит последовательность, в которой аминокислотные положения 31, 65, 108, 171 и 194 являются замещенными, и при этом значения hK_d и cK_d находятся в диапазоне от около 100 нМ до около 120 нМ.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предлагается белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, при этом указанный белок имеет аминокислотную последовательность, представленную в wt анти-CD3 (SEQ ID NO: 22), содержащую вариабельную область тяжелой цепи (VH), вариабельную область легкой цепи (VL), линкер, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 1), при этом VH содержит определяющие комплементарность области CDR1, CDR2 и CDR3, при этом VL содержит определяющие комплементарность области LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3, содержащие по меньшей мере одну мутацию в CDR1, CDR2 или CDR3 VH, и LC CDR1, LC CDR2 или LC CDR3 VL, при этом по меньшей мере одна мутация не расположена в аминокислотных положениях 26, 30, 32, 35, 50, 51, 52, 53, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 67, 101, 103, 104, 107, 109, 110, 111, 112, 113, 167, 169, 172, 174, 175, 176, 192, 198, 232, 233, 234, 236 или 238. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит по меньшей мере одну мутацию в аминокислотном положении, выбранном из 27, 28, 29, 31, 33, 34, 54, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 102, 105, 106, 108, 114, 163, 164, 165, 166, 168, 170, 171, 173, 193, 194, 195, 196, 197, 231, 235, 237 и 239. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 34 подвергнуто мутации в изолейцин, положение 65 подвергнуто мутации в глутамин, положение 102 подвергнуто мутации в аланин, положение 163 подвергнуто мутации в аланин, положение 197 подвергнуто мутации в валин и положение 231 подвергнуто мутации в треонин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 28 подвергнуто мутации в глутаминовую кислоту, положение 57 подвергнуто мутации в лизин, положение 166 подвергнуто мутации в фенилаланин и положение 235 подвергнуто мутации в аспарагиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 108 подвергнуто мутации в гистидин, положение 168 подвергнуто мутации в тирозин, положение 194 подвергнуто мутации в серин и положение 239 подвергнуто мутации в изолейцин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 28 подвергнуто мутации в метионин, положение 55 подвергнуто мутации в серин, положение 114 подвергнуто мутации в треонин, положение 166 подвергнуто мутации в фенилаланин, положение 195 подвергнуто мутации в лейцин и положение 237 подвергнуто мутации в серин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 31 подвергнуто мутации в треонин, положение 63 подвергнуто мутации в лизин, положение 108 подвергнуто мутации в пролин, положение 170 подвергнуто мутации в валин и положение 194 подвергнуто мутации в глутаминовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 29 подвергнуто мутации в тирозин, положение 65 подвергнуто мутации в глутаминовую кислоту, положение 108 подвергнуто мутации в пролин, положение 166 подвергнуто мутации в лизин, положение 195 подвергнуто мутации в глутаминовую кислоту и положение 231 подвергнуто мутации в треонин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 27 подвергнуто мутации в аспарагин, положение 59 подвергнуто мутации в глутаминовую кислоту, положение 102 подвергнуто мутации в треонин, положение 173 подвергнуто мутации в тирозин и положение 194 подвергнуто мутации в тирозин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 31 подвергнуто мутации в аспарагин, положение 65 подвергнуто мутации в аланин, положение 108 подвергнуто мутации в глутамин, положение 171 подвергнуто мутации в аспарагиновую кислоту и положение 193 подвергнуто мутации в изолейцин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 34 подвергнуто мутации в валин, положение 164 подвергнуто мутации в глутаминовую кислоту и положение 195 подвергнуто мутации в изолейцин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 33 подвергнуто мутации в пролин, положение 105 подвергают мутации в аспарагин, положение 171 подвергнуто мутации в лизин, положение 195 подвергнуто мутации в метионин и положение 231 подвергнуто мутации в аланин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 31 подвергнуто мутации в глицин, положение 65 подвергнуто мутации в глутаминовую кислоту, положение 108 подвергнуто мутации в пролин, положение 170 подвергнуто мутации в валин и положение 194 подвергнуто мутации в глутаминовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 27 подвергнуто мутации в аспарагин, положение 106 подвергнуто мутации в аспарагиновую кислоту, положение 171 подвергнуто мутации в гистидин и положение 195 подвергнуто мутации в валин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 31 подвергают мутации в аспарагин, положение 54 подвергнуто мутации в глицин, положение 165 подвергнуто мутации в тирозин, положение 196 подвергнуто мутации в аспарагин и положение 235 подвергнуто мутации в аланин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 28 подвергнуто мутации в глутаминовую кислоту, положение 59 подвергнуто мутации в глутаминовую кислоту, положение 108 подвергнуто мутации в лейцин, положение 166 подвергнуто мутации в серин и положение 196 подвергнуто мутации в глицин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное положение 34 замещено лейцином, аминокислотное положение 61 замещено глутаминовой кислотой, аминокислотное положение

нечный вариабельный фрагмент, связывающий аминокислотное положение 31 подвергнуто мутации в аспарагиновую кислоту, положение 108 подвергнуто мутации в валин и положение 194 подвергнуто мутации в пролин находятся в диапазоне примерно от 11 до 125 нМ, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, в которой аминокислотное положение 31 подвергнуто мутации в аспарагиновую кислоту, положение 95 подвергнуто мутации в валин, и при этом значения hKd и cKd при связывании по отношению к CD3 анти-CD3 (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит аминокислотное положение 27 подвергнуто мутации в аспарагиновую кислоту, положение 171 подвергнуто мутации в валин, при этом значения hKd и cKd находятся в диапазоне осуществления белок, содержащий вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит последовательность, в которой аминокислотное положение 54 подвергнуто мутации в аспарагин, положение 196 подвергнуто мутации в пролин, при этом значения hKd и cKd примерно в диапазоне от 10 до 125 нМ белка, который имеет последовательность, в которой аминокислотное положение 54 подвергнуто мутации в аспарагин, положение 196 подвергнуто мутации в тирозин, положение 196 подвергнуто мутации в пролин, при этом значения hKd и cKd находятся в диапазоне осуществления белок, содержащий вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит последовательность, в которой аминокислотное положение 54 подвергнуто мутации в аспарагин, положение 196 подвергнуто мутации в тирозин, при этом значения hKd и cKd находятся в диапазоне осуществления белок, содержащий вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит последовательность, в которой аминокислотное положение 108 подвергнуто мутации в лейцин, положение 196 подвергнуто мутации в глицин, и при этом значения hKd и cKd при связывании по отношению к CD3 анти-CD3 (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит аминокислотное положение 28 подвергнуто мутации в аспарагиновую кислоту, положение 108 подвергнуто мутации в серин и положение 196 подвергнуто мутации в пролин находятся в диапазоне примерно от около 125 нМ до около 120 нМ, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, в которой аминокислотное положение 61 подвергнуто мутации в аспарагиновую кислоту, положение 239 подвергнуто мутации в пролин, аминокислотное положение 239 подвергнуто мутации в аланин, при этом значения hKd и cKd выше, чем аффинности связывания по отношению к CD3 анти-CD3 (SEQ ID NO: 22), представленную в wt анти-CD3 (SEQ ID NO: 22), содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, в которой аминокислотное положение 61 подвергнуто мутации в аспарагиновую кислоту, положение 239 подвергнуто мутации в аланин, при этом значения hKd и cKd находятся в диапазоне от около 125 нМ до около 120 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержит аминокислотное положение 31 подвергнуто мутации в аспарагиновую кислоту, положение 65 подвергнуто мутации в аспарагин, аминокислотное положение 171 подвергнуто мутации в аспарагиновую кислоту, при этом значения hKd и cKd ниже, чем аффинности связывания по отношению к CD3 анти-CD3 (SEQ ID NO: 22), представленную в wt анти-CD3 (SEQ ID NO: 22), содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, в которой аминокислотное положение 31 подвергнуто мутации в аспарагиновую кислоту, положение 65 подвергнуто мутации в аспарагин, аминокислотное положение 171 подвергнуто мутации в аспарагиновую кислоту, при этом значения hKd и cKd находятся в диапазоне от около 125 нМ до около 120 нМ.

ное положение 171 подвергнуто мутации в валин и аминокислотное положение 194 подвергнуто мутации в глутаминовую кислоту, и при этом значения hKd и cKd находятся в диапазоне от около 100 нМ до около 120 нМ.

В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, который связывается с CD3, не связывается с мышиным CD3.

В одном варианте осуществления предлагается полинуклеотид, кодирующий белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением. В одном варианте осуществления предлагается вектор, содержащий полинуклеотид, описанный в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления предлагается клетка-хозяин, трансформированная вектором, описанным в настоящем изобретении. В следующем варианте осуществления предлагается фармацевтическая композиция, содержащая (i) белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением, полинуклеотид в соответствии с настоящим изобретением, вектор в соответствии с настоящим изобретением или клетку-хозяина в соответствии с настоящим изобретением, и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

В другом варианте осуществления предлагается способ получения белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением, при этом указанный способ включает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением, в условиях, которые обеспечивают экспрессию белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, и выделение и очистку полученного белка из культуры.

В другом варианте осуществления предлагается способ лечения или ослабления пролиферативного заболевания, опухолевого заболевания, воспалительного заболевания, иммунологического расстройства, аутоиммунного заболевания, инфекционного заболевания, вирусного заболевания, аллергической реакции, паразитарной реакции, болезни "трансплантат против хозяина" или болезни "хозяин против трансплантата", включающий введение белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления способ, кроме того, включает введение агента в комбинации с белком, содержащим одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением.

В настоящем изобретении в одном варианте осуществления предлагается мультиспецифический связывающий белок, содержащий белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением. В одном варианте осуществления описано антитело, содержащее белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением. В другом варианте осуществления предлагается мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, однодоменное антитело, вариабельный домен тяжелой цепи, пептид или лиганд, содержащий белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении описано антитело, содержащее белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением, при этом указанное антитело представляет собой scFv-антитело. В другом варианте осуществления описан мультиспецифический связывающий белок или антитело, содержащее белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением, и домен связывания сывороточного альбумина.

Краткое описание чертежей

Новые признаки изобретения подробно изложены 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 изобретения, и сопровождающие их чертежи.

На фиг. 1 показано титрование бактериофага на биотин-CD3ε и биотин-HSA.

На фиг. 2 показана аминокислотная последовательность человеческого CD3-связывающего белка (SEQ ID NO: 22). HC CDR1 указан в первой затененной последовательности (SEQ ID NO: 23)), HC CDR2 указан во второй затененной последовательности (RIRSKYNNYATYYADSVK (SEQ ID NO: 24)), HC CDR3 указан в третьей затененной последовательности (HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO: 25)), LC CDR1 указан в четвертой затененной последовательности (GSSTGAVTSGNYPN (SEQ ID NO: 26)), LC CDR2 указан в пятой затененной последовательности (GTKFLAP (SEQ ID NO: 27)), и CDR3 указан в шестой затененной последовательности (VLWYSNRWV (SEQ ID NO: 28)).

На фиг. 3 показаны профили шестнадцати клонов, выбранных для более точных определений K_d .

На фиг. 4 показана температура гидрофобного воздействия (T_h °C) для нескольких вариантов анти-huCD3ε scFv.

Подробное описание изобретения

Хотя в настоящем изобретении показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления приведены только в качестве примеров. Не выходя за рамки данного изобретения, специалист в данной области может осуществить многочисленные вариации, изменения и замены. Следует иметь в виду, что в практике осуществления данного изобретения можно использовать различные альтернативы вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем изобретении. Подразумевается, что прилагаемая формула изобретения определяет объем данного изобретения, и что способы и структуры в объеме этой формулы и их эквиваленты охвачены этой формулой изобретения. Некоторые определения Терминология, применяемая в настоящем изобретении, служит исключительно для описания конкретных случаев и не ограничивает изобретение. В настоящем изобретении неопределенная и определенная формы единственного числа также включают множественные формы, если контекст ясно не указывает иное. Кроме того, в той мере, в какой термины "включающий", "включает", "имеющий", "имеет", "с" или их варианты применяют в подробном описании и/или формуле изобретения, такие термины подразумевают включение в себя подобно термину "содержащий".

Термин "примерно" или "приблизительно" означает нахождение внутри диапазона приемлемой погрешности для конкретной величины, определенного специалистом в данной области техники, который будет зависеть отчасти от того, каким образом величину измеряют или определяют, то есть от ограниченной измерительной системы. Например, термин "примерно" может означать, что величина находится в пределах 1 или более чем 1 стандартного отклонения, как показывает практика в данной области. В тех случаях, когда в заявке и формуле изобретения приведены конкретные значения, то, если не указано иное, следует предполагать термин "примерно", обозначающий нахождение внутри диапазона приемлемой погрешности для конкретной величины.

Термины "индивидуум", "пациент" или "субъект" применяются как взаимозаменяемые. Ни один из этих терминов не требует или не ограничивается ситуацией, характеризующейся наблюдением (например, постоянным или периодическим) медицинским работником (например, врачом, дипломированной медицинской сестрой, помощником врача, санитаром или работником хосписа).

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 средства. Выведение большинства лекарственных средств описывается экспоненциальной зависимостью (то есть 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 доля лекарственного средства, график зависимости логарифма концентрации лекарственного средства от времени является линейным в любой момент времени после начальной фазы распределения (т.е. после того, как абсорбции и распределения лекарственного средства завершатся). Полупериод времени для выведения лекарственного средства может быть точно определен из такого графика.

Используемый в настоящем изобретении термин "процентная (%) идентичность аминокислотной последовательности" в отношении последовательности определяется как процентное содержание аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной последовательности после выравнивания последовательностей и внесения пробелов, если необходимо, чтобы получить максимальную процентную идентичность последовательностей, и без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процентной идентичности аминокислотной последовательности можно осуществлять различными способами, известными специалистам в данной области, например, используя общедоступные компьютерные программы, такие как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для определения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Термин "каркасные" или "FR" остатки (или области) относится к тем остаткам вариабельной области, которые отличаются от CDR или остатков гипервариабельной области, как определено в настоящем изобретении. "Человеческая консенсусная каркасная область" обозначает каркасную область, которая представляет наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток при отборе VL or VH каркасных последовательностей человеческого иммуноглобулина.

Используемый в настоящем изобретении термин "вариабельная область" или "вариабельный домен"

относится к тому факту, что последовательности определенных частей переменных доменов значительно отличаются среди антител и используются в связывании и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако переменность не является равномерно распределенной на протяжении переменных доменов антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых областями, определяющими комплементарность (CDR), или гиперпеременными областями, в переменных доменах как легкой цепи, так и тяжелой цепи. Более высококонсервативные части переменных доменов называют каркасными (FR). Каждый из переменных доменов природных тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR-области, в значительной степени принимающие конфигурацию Р-слоя, соединенную тремя CDR, которые формируют петли, соединяющие структуру Р-слоев и в некоторых случаях формирующие ее часть. CDR в каждой цепи расположены вместе в непосредственной близости от областей FR и совместно с CDR другой цепи участвуют в формировании антигенсвязывающего участка антител (смотри Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Константные домены не вовлечены непосредственно в связывание антитела с антигеном, но они обладают различными эффекторными функциями, такими как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности. "Нумерация остатка переменного домена как у Kabat" или "нумерация положения аминокислоты как у Kabat", и его вариации, относится к системе нумерации, используемой для переменных доменов тяжелой цепи или переменных доменов легкой цепи для собраний данных по антителам у *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). При использовании этой системы нумерации действительная линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению FR или CDR переменного домена или вставке в них.

Например, переменный домен тяжелой цепи может включать единственную вставку аминокислоты (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.п. согласно Kabat) после остатка 82 тяжелой цепи FR. Нумерация остатков по Kabat можно определить для данных антител посредством выравнивания областей гомологии последовательности антител со "стандартной" занумерованной по Kabat последовательностью. Не предполагается, что CDR согласно настоящему изобретению обязательно соответствуют системе нумерации Kabat.

Используемый в настоящем изобретении термин "аффинность связывания" относится к аффинности белков, описанных в изобретении, по отношению к связывающимся с ними мишеням, и выражается численно с использованием значений "Kd". Если указано, что два или более белков обладают сравнимыми значениями аффинности связывания по отношению к связывающимся с ними мишеням, то значения Kd для связывания соответствующих белков по отношению к связывающимся с ними мишеням ± 2 -кратно отличаются друг от друга. Если указано, что два или более белков обладают сравнимыми значениями аффинности связывания по отношению к единственной связывающейся с ними мишени, то значения Kd для связывания соответствующих белков по отношению к указанной единственной связывающейся с ними мишени ± 2 -кратно отличаются друг от друга. Если указано, что белок связывается с двумя или более мишенями со сравнимыми значениями аффинности связывания, то значения Kd для связывания указанного белка с двумя или более мишенями ± 2 -кратно отличаются друг от друга. В целом, более высокое значение Kd соответствует более слабому связыванию. В некоторых вариантах осуществления "Kd" измеряют с помощью анализа связывания радиоактивно меченного антигена (RIA) или поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIAcore™-2000 or a BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.). В некоторых вариантах осуществления "скорость связывания" или "скорость ассоциации" или "скорость соединения" или " k_{on} ", и "скорость диссоциации" или "скорость разрыва" или "скорость разъединения" или " k_{off} " также определяют с помощью способа поверхностного плазмонного резонанса с использованием систем BIAcore™-2000 or a BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.). В дополнительных вариантах осуществления "Kd", " k_{on} " и " k_{off} " измеряют с использованием систем Octet® Systems (Pall Life Sciences).

В настоящем изобретении описаны белки, содержащие одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, фармацевтические композиции, а также нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессирующие векторы и клетки-хозяева для получения таких белков, содержащих одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3. Также, предлагаются способы применения раскрытых белков, содержащих одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, для предупреждения и/или лечения заболеваний, состояний и нарушений. В некоторых вариантах осуществления белки, содержащие одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, способны специфически связываться с доменом CD3, а также антигеном-мишенью, и доменом, увеличивающим период полувыведения, таким как однодоменное антитело, связывающееся с человеческим сывороточным альбумином (HSA).

CD3-связывающий домен.

Специфичность ответа Т-клеток опосредуется распознаванием антигена (отображаемого в контексте главного комплекса гистосовместимости, MHC) комплексом Т-клеточного рецептора. В составе ком-

плекса Т-клеточного рецептора CD3 представляет собой белковый комплекс, который включает цепь CD3 γ (гамма), цепь CD3 δ (дельта) и две цепи CD3 ϵ (эпсилон), которые присутствуют на поверхности клетки. CD3 ассоциируется с α (альфа) и β (бета) цепями Т-клеточного рецептора (TCR), а также с цепью CD3 ζ (дзета), которые все вместе образуют комплекс Т-клеточного рецептора. 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 белки, содержащие одноцепочечный вариативный фрагмент, связывающийся с CD3, содержат домен, который специфически связывается с CD3. В другом аспекте описанные в настоящем изобретении белки, содержащие одноцепочечный вариативный фрагмент, связывающийся с CD3, содержат домен, который специфически связывается с человеческим CD3. В одном аспекте описанные в настоящем изобретении белки, содержащие одноцепочечный вариативный фрагмент, связывающийся с CD3, содержат домен, который специфически связывается с CD3 яванского макака. В другом аспекте описанные в настоящем изобретении белки, содержащие одноцепочечный вариативный фрагмент, связывающийся с CD3, содержат домен, который связывается с человеческим CD3 и CD3 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении белки, содержащие одноцепочечный вариативный фрагмент, связывающийся с CD3, содержат домен, который специфически связывается с CD3 γ . В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении белки, содержащие одноцепочечный вариативный фрагмент, связывающийся с CD3, содержат домен, который специфически связывается с CD3 δ . В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении белки, содержащие одноцепочечный вариативный фрагмент, связывающийся с CD3, содержат домен, который специфически связывается с CD3 ϵ .

В другом аспекте предлагается мультиспецифический связывающий белок, включающий белок, содержащий одноцепочечный вариативный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок, включающий белок, содержащий одноцепочечный вариативный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением, специфически связывается с Т-клеточным рецептором (TCR). В некоторых случаях мультиспецифический белок, включающий белок, содержащий одноцепочечный вариативный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением, связывается с α -цепью TCR. В определенных случаях мультиспецифический белок, включающий белок, содержащий одноцепочечный вариативный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением, связывается с β -цепью TCR.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен описанных в настоящем изобретении белков, содержащих одноцепочечный вариативный фрагмент, связывающийся с CD3, демонстрирует не только сильное сродство к CD3-связыванию с человеческим CD3, но также и превосходную перекрестную реактивность с соответствующими белками CD3 яванского макака. В некоторых случаях CD3-связывающий домен белков, содержащих одноцепочечный вариативный фрагмент, связывающийся с CD3, является перекрестно реактивными с CD3 яванского макака. В определенных случаях значение K_d для связывания с человеческим CD3 (hK_d) является примерно таким же, как значение K_d для связывания с CD3 яванского макака (cK_d). В некоторых случаях соотношение величин hK_d и cK_d ($hK_d:cK_d$) находится в диапазоне от около 20:1 до около 1:2.

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

Таким образом, в одном аспекте 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 несколько (например, все три) из определяющей комплементарности области 1 легкой цепи (LC CDR1), определяющей комплементарность области 2 легкой цепи (LC CDR2) и определяющей комплементарность области 3 легкой цепи (LC CDR3) гуманизированного или человеческого анти-CD3-связывающего домена, описанного в настоящем изобретении, и/или одну или несколько (например, все три) из определяющей комплементарности области 1 тяжелой цепи (HC CDR1), определяющей комплементарность области 2 тяжелой цепи (HC CDR2) и определяющей комплементарность области 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 несколько, например, все три LC CDR и одну или несколько, например, все три HC CDR.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит переменную область гуманизированной или человеческой легкой цепи, специфическую для CD3, при этом переменная область легкой цепи, специфическая для CD3, содержит последовательности CDR человеческой или нечеловеческой легкой цепи в каркасной области человеческой легкой цепи. В определенных случаях каркасная область легкой цепи представляет собой каркасную область легкой цепи λ (лямбда). В других случаях каркасная область легкой цепи представляет собой каркасную область легкой цепи κ (каппа).

В некоторых вариантах осуществления гуманизированный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит переменную область гуманизированной или человеческой тяжелой цепи, специфическую для CD3, при этом переменная область тяжелой цепи, специфическая 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, TR-66 или X35-3, 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 анти-CD3-связывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной в настоящем изобретении. Используемый в настоящем изобретении термин "одноцепочечный переменный фрагмент" или "scFv" относится к фрагменту антитела, содержащему переменную область легкой цепи, и по меньшей мере одному фрагменту антитела, содержащему переменную область тяжелой цепи, при этом переменные области легкой и тяжелой цепей смежно связаны через короткий гибкий полипептидный линкер, и способны экспрессироваться в виде единой полипептидной цепи, и при этом scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он получен. В одном варианте осуществления 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, представленной в настоящем изобретении, или последовательность, имеющую 95-99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной 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, представленной в настоящем изобретении, или последовательность, имеющую 95-99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной 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 могут 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 примерно из 3-15, например 8, 10 или 15 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. Аминокислотная последовательность scFv-линкеров может быть оптимизирована, например, с помощью способов фагового дисплея для улучшения связывания с CD3 и получения большого количества scFv. Примеры пептидных scFv-линкеров, подходящих для связывания переменного домена легкой цепи и переменного домена тяжелой цепи, в scFv, включают, но без ограничения, $(GS)_n$ (SEQ ID NO: 96), $(GGS)_n$ (SEQ ID NO: 97), $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 98), $(GGSG)_n$ (SEQ ID NO: 99), $(GGSGG)_n$ (SEQ ID NO: 100), $(GGGG)_n$ (SEQ ID NO: 101), $(GGGGG)_n$ (SEQ ID NO: 102) или $(GGG)_n$ (SEQ ID NO: 103), где n равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В одном варианте осуществления линкер в scFv может быть $(GGGGG)_4$ (SEQ ID NO: 104) или $(GGGGG)_3$ (SEQ ID NO: 1). Изменение длины линкера может сохранить или повысить активность, что приводит к более высокой эффективности в исследованиях активности.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен белка, содержащего одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, обладает аффинностью к CD3 на CD3-экспрессирующих клетках со значением K_d , равным 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 белка, содержащего одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, обладает аффинностью к CD3ε, γ или δ со значением K_d , равным 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 белка, содержащего одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет низкую аффинность к CD3, то есть около 100 нМ или выше.

В определенных вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении белки, содержащие одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, связываются с человеческим CD3 с K_d человека (hK_d) и с CD3 яванского макака с K_d яванского макака (cK_d). В некоторых вариантах осуществления значения hK_d и cK_d находятся в диапазоне от около 1 нМ до около 2 нМ, от около 3 нМ до около 5 нМ, от около 6 нМ до около 10 нМ, от около 11 нМ до около 20 нМ, от около 25 нМ до около 40 нМ, от около 40 нМ до около 60 нМ, от около 70 нМ до около 90 нМ, от около 100 нМ до около 120 нМ, от около 125 нМ до около 140 нМ, от около 145 нМ до около 160 нМ, от около 170 нМ и до около 200 нМ, от около 210 нМ до около 250 нМ, от около 260 нМ до около 300 нМ.

В некоторых вариантах осуществления значения hK_d и cK_d белков, содержащих одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, являются примерно такими же, как значение K_d CD3-связывающего белка, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления значения hK_d и cK_d белков, содержащих одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, примерно в 1,1-1,5 раз выше, чем значение K_d CD3-связывающего белка, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления значения hK_d и cK_d белков, содержащих одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, примерно в 1,5-2 раза выше, чем значение K_d CD3-связывающего белка, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления значения hK_d и cK_d белков, содержащих одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, примерно в 2,5-3 раза выше, чем значение K_d CD3-связывающего белка, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления значения hK_d и cK_d белков, содержащих одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, примерно в 3-5 раз выше, чем значение K_d CD3-связывающего белка, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления значения hK_d и cK_d белков, содержащих одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, примерно в 6-15 раз выше, чем значение K_d CD3-связывающего белка, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления значения hK_d и cK_d белков, содержащих одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, примерно в 15-20 раз выше, чем значение K_d CD3-связывающего белка, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления значения hK_d и cK_d белков, содержащих одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, примерно в 20-50 раз выше, чем значение K_d CD3-связывающего белка, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления значения hK_d и cK_d белков, содержащих одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, примерно в 55-70 раз выше, чем значение K_d CD3-связывающего белка, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления значения hK_d и cK_d белков, содержащих одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, примерно в 75-100 раз выше, чем значение K_d CD3-связывающего белка, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления значения hK_d и cK_d белков, содержащих одноцепочечный переменный фрагмент, связывающийся с CD3, примерно в 120-200 раз выше, чем значение K_d CD3-связывающего белка, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между hK_d и cK_d ($hK_d:K_d$) находится в диапазоне от около 20:1 до около 1:2. Аффинность к связыванию с CD3 может быть определена, например, по

способности самого белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, или его CD3-связывающего домена связываться с CD3, нанесенным на планшет для анализа; отбражваемым на микробной клеточной поверхности; в растворе; и т.д. Связывающая активность самого белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, или его CD3-связывающего домена согласно настоящему изобретению по отношению к CD3 может быть проанализирована при помощи иммобилизации лиганда (например, CD3) или самого белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, 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 т.п., и проанализирован, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Surface Plasmon Resonance, SPR).

В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 94) и SEQ ID NO: 95.

В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, при этом hKd составляет около 3,8 нМ, и при этом cKd составляет около 3,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, при этом hKd составляет около 4,1 нМ, и при этом cKd составляет около 3,4 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, при этом hKd составляет около 4,3 нМ, и при этом cKd составляет около 4,2 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, при этом hKd составляет около 4,7 нМ, и при этом cKd составляет около 4,9 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, при этом hKd составляет около 6,4 нМ, и при этом cKd составляет около 6,6 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, при этом hKd составляет около 8 нМ, и при этом cKd составляет около 6,6 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, при этом hKd составляет около 20 нМ, и при этом cKd составляет около 17 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, при этом hKd составляет около 37 нМ, и при этом cKd составляет около 30 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, при этом hKd составляет около 14 нМ, и при этом cKd составляет около 13 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, при этом hKd составляет около 50 нМ, и при этом cKd составляет около 47 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, при этом hKd составляет около 16 нМ, и при этом cKd составляет около 16 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, при этом hKd составляет около 46 нМ, и при этом cKd составляет около 43 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, при этом hKd составляет около 18 нМ, и при этом cKd составляет около 17 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, при этом hKd составляет около 133 нМ, и при этом cKd составляет около 134 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94, при этом hKd составляет около 117 нМ, и при этом cKd составляет около 115 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 95, при этом hKd составляет около 109 нМ, и при этом cKd составляет около 103 нМ.

[illegible]

Домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения.

Человеческий сывороточный альбумин (Human serum albumin, 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 слияние альбумин-связывающего домена с фрагментом Fab привело к *in vivo* 25- и 58-кратному клиренсу и удлинению периода полувыведения в 26 и 37 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. Взяты вместе, данные этих исследований демонстрируют связь между связыванием с альбумином и пролонгированным действием.

В одном аспекте предлагается мультиспецифический связывающий белок, включающий белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением и, кроме того, содержащий домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, например домен, который специфически связывается с сывороточным альбумином. В некоторых вариантах осуществления связывающий сывороточный альбумин домен белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, может быть любым доменом, который связывается с сывороточным альбумином, включая, но без ограничения, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. В некоторых вариантах осуществления связывающий сывороточный альбумин домен представляет собой одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), однодоменное антитело, такое как вариабельный домен тяжелой цепи (VH), вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен (VHH) из полученного из верблюда однодоменного антитела, или антигенсвязывающие фрагменты HSA-связывающих антител, такие как фрагменты Fab, Fab', F(ab)2 и Fv, фрагменты, состоящие из одной или более CDR, одноцепочечные антитела (например, одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv)), дисульфидные стабилизированные (dsFv) Fv-фрагменты, гетероконъюгатные антитела (например, биспецифические антитела), pFv-фрагменты, мономеры или димеры тяжелой цепи, мономеры или димеры легкой цепи, и димеры, состоящие из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи, пептид, лиганд или низкомолекулярную группу, специфичные к сывороточному альбумину. В определенных вариантах осуществления HSA-связывающий домен является однодоменным антителом. В других вариантах осуществления связывающий сывороточный альбумин домен представляет собой пептид. В других вариантах осуществления связывающий сывороточный альбумин домен представляет собой низкомолекулярную группу. Предполагается, что связывающий сывороточный альбумин домен мультиспецифического связывающего белка, представляющего собой белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, 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, связывающий сывороточный альбумин домен имеет размер 5 кДа или менее, если он представляет собой пептид или низкомолекулярную группу.

Домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, мультиспецифического связывающего белка, представляющего собой белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, обеспечивает изменение фармакодинамики и фармакокинетики самого белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3. 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 белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в ткани. В некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, обеспечивает улучшение направленной доставки в ткани (включая опухоль), распределение в ткани, проникновение в ткани, диффузии внутри ткани и повышенную эффективность по сравнению с белком без домена, обеспечивающего удлинение периода полувыведения. В одном варианте осуществления терапевтические способы эффективно и продуктивно используют пониженное количество мультиспецифического связывающего белка, представляющего собой белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, что приводит к снижению побочных эффектов, например, к снижению неопухоловой цитотоксичности.

Кроме того, аффинность связывания домена, обеспечивающего удлинение периода полувыведения, может быть выбрана таким образом, чтобы соответствовать определенному периоду полувыведения в конкретном мультиспецифическом связывающем белке, представляющем собой белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, имеет высокую аффинность связывания. В других вариантах осуществления домен, обеспечивающий удлинение периода полувыве-

дения, имеет среднюю аффинность связывания. В других вариантах осуществления домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, имеет низкую или маргинальную аффинность связывания. Примеры аффинности связывания включают Kd-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 сывороточным альбумином определяют с помощью известных способов, таких как поверхностный плазмонный резонанс (SPR).

Домен связывания антигена-мишени.

В дополнение к описанным CD3 и домену, обеспечивающему удлинение периода полувыведения, мультиспецифические связывающие белки, описанные в настоящем изобретении в определенных вариантах осуществления, 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 паразитарной реакцией, болезнью "трансплантат против хозяина" или болезнью "хозяин против трансплантата". В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген, экспрессированный на опухолевой клетке. Альтернативно 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 клетки, бактериально инфицированной клетке, поврежденном эритроците, клетке артериальной бляшки или клетке фиброзной ткани.

Конструкция мультиспецифического связывающего белка, представляющего собой описанный в настоящем изобретении белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, 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 без ограничения, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. В некоторых вариантах осуществления домен связывания антигена-мишени представляет собой одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), однодоменное антитело, такие как вариабельный домен тяжелой цепи (VH), вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен (VHH) из полученного из верблюда однодоменного антитела. В других вариантах осуществления домен связывания антигена-мишени представляет собой не являющийся Ig связывающий домен, то есть, 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 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 белков, содержащих одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3.

Описанные в настоящем изобретении белки, содержащие одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, 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 блокирования иммуногенного домена и/или для очистки белка.

Типичные модификации включают, но без ограничения, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гема, ковалентное присоединение нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных сшивков, образование цистина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидрокселирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, 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 описанных в настоящем изобретении белках, содержащих одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, включая пептидный остов, аминокислотные боковые цепи и аминокислотные или карбоксильные концы. Некоторые общие модификации пептидов, которые являются применимыми для модификации белков, содержащих одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, включают гликозилирование, присоединение липида, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, гидрокселирование, блокирова-

ние amino- или карбоксильной группы или обеих групп в полипептиде, посредством ковалентной модификации, и АДФ-рибозилирование.

Полинуклеотиды, кодирующие белки, содержащие одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3.

Настоящее изобретение также относится, в некоторых вариантах осуществления, к полинуклеотидным молекулам, кодирующим белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, или мультиспецифический связывающий белок, включающий белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидные молекулы представлены в виде ДНК-конструкции. В других вариантах осуществления полинуклеотидные молекулы обеспечены 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 экспрессии в бактериях или других подходящих экспрессионных системах, например, в клетках CHO. В вариантах осуществления, в которых 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, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, лентивирусы и т.п.) и космиды.

Различные экспрессионные системы вектор/хозяин могут применяться, чтобы служить в качестве носителя и использоваться для экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид описанного белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3. 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, PICHIAPINK™ Yeast Expression Systems (Invitrogen), BACUVANCE™ Baculovirus Expression System (GenScript).

Таким образом, белки, содержащие одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, 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.

Получение белков, содержащих одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении раскрыт способ получения белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, в условиях, обеспечивающих экспрессию белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, и выделение и очистку полученного белка из культуры.

В дополнительном варианте осуществления предлагается способ, направленный на улучшение одного или нескольких свойств, например, аффинности, стабильности, устойчивости к высоким температурам, перекрестной реактивности и т.д. белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, и/или мультиспецифических связывающих белков, включающих белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, как описано в настоящем изобретении, по сравнению с референсным связывающим соединением. В некоторых вариантах осуществления обеспечено множество библиотек с одиночными замещениями, каждая из которых соответствует разному домену или аминокислотному сегменту белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, или референсного связывающего соединения, так что каждый член библиотеки с одиночными замещениями кодирует только одну аминокислотную замену в своем соответствующем домене или аминокислотном сегменте. (Это позволяет исследовать все потенциальные замены в крупном белке или участке связывания белка с помощью нескольких небольших библиотек.) В некото-

рых вариантах осуществления множество доменов образует или покрывает непрерывную последовательность аминокислот белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, или референсного связывающего соединения. Нуклеотидные последовательности различных библиотек с одиночными замещениями перекрываются с нуклеотидными последовательностями по меньшей мере одной другой библиотеки с одиночными замещениями. В некоторых вариантах осуществления множество библиотек с одиночными замещениями сконструированы таким образом, что каждый член перекрывается с каждым членом каждой библиотеки с одиночными замещениями, кодирующим соседний домен.

Связывающие соединения, экспрессирующиеся из таких библиотек с одиночными замещениями, отбирают отдельно для получения поднабора вариантов в каждой библиотеке, который имеет свойства, по меньшей мере, такие же, как и у референсного связывающего соединения, и полученная в результате библиотека уменьшается по размеру. (То есть число нуклеиновых кислот, кодирующих выбранный набор связывающих соединений, меньше, чем число нуклеиновых кислот, кодирующих члены исходной библиотеки с одиночными замещениями). Такие свойства включают, но без ограничения, аффинность к целевому соединению, стабильность к различным условиям, таким как тепло, высокое или низкое значение pH, ферментативное разложение, перекрестная реактивность с другими белками и т.п. Выбранные соединения из каждой библиотеки с одиночными замещениями называются в настоящем изобретении взаимозаменяемо как "предварительные соединения-кандидаты" или "предварительные белки-кандидаты". Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие предварительные соединения-кандидаты из отдельных библиотек с одиночными замещениями, затем перетасовываются в PCR для создания перетасованной библиотеки, используя методы перетасовки генов на основе PCR.

В настоящем изобретении описан иллюстративный порядок проведения процесса скрининга. Библиотеки предварительных соединений-кандидатов получали из библиотек с одиночными замещениями и отбирали с точки зрения связывания с белком(ами)-мишенью, после чего библиотеки предварительных кандидатов перетасовывали с получением библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих соединения-кандидаты, которые, в свою очередь, клонировали в подходящий экспрессионный вектор, такой как фагемидная система экспрессии. Затем экспрессирующие фаг соединения-кандидаты подвергали одному или нескольким циклам отбора для улучшения желаемых свойств, таких как аффинность связывания с молекулой-мишенью. Молекулы-мишени могут быть адсорбированы или иным образом прикреплены к поверхности лунки или другого реакционного контейнера, или молекулы-мишени могут быть дериватизированы с использованием связывающего фрагмента, такого как биотин, который после инкубации со связывающими соединениями-кандидатами может быть захвачен комплементарным фрагментом, таким как стрептавидин, связанный с частицами, такими как магнитные частицы, для промывки. В иллюстративных режимах отбора, связывающие соединения-кандидаты подвергаются стадии продолжительной промывки, таким образом, выбирают только соединения-кандидаты с очень низкими скоростями диссоциации от молекулы-мишени. Иллюстративные времена промывки для таких вариантов осуществления составляют по меньшей мере 8 ч; или, в других вариантах осуществления, по меньшей мере 24 ч; или, в других вариантах осуществления, по меньшей мере 48 ч; или, в других вариантах осуществления, по меньшей мере 72 ч. Выделенные клоны после селекции амплифицировали и подвергали дополнительному циклу отбора или анализировали, например, путем секвенирования и путем проведения сравнительных измерений аффинности связывания, например, с помощью ELISA, связывания методом поверхностного плазмонного резонанса, биослойной интерферометрии (например, Octet system, ForteBio, Menlo Park, CA) или т.п.

В некоторых вариантах осуществления процесс осуществляют для идентификации одного или нескольких белков, содержащих одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, и/или мультиспецифического связывающего белка, включающего белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, с улучшенной термической стабильностью, улучшенной перекрестной реактивностью в отношении выбранного набора мишеней для связывания по сравнению с референсным CD3-связывающим белком, таким как белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. Библиотеки с одиночными замещениями получали путем изменения кодонов в VH- и VL-областях референсного CD3-связывающего белка, включая кодоны в каркасных областях и в CDR; в другом варианте осуществления локализации, в которых изменяли кодоны, содержат CDR тяжелой и легкой цепей референсного CD3-связывающего белка, или поднабор таких CDR, например, только CDR1, только CDR2, только CDR3, или их пары. В другом варианте осуществления локализации, где изменяли кодоны, возникают только в каркасных областях. В некоторых вариантах осуществления библиотека содержит замены только одного кодона из референсного CD3-связывающего белка, только в каркасных областях как VH, так и VL с нумерацией в диапазоне от 10 до 250. В другом варианте осуществления локализации, в которых изменяли кодоны, содержат CDR3 тяжелой и легкой цепей референсного CD3-связывающего белка, или поднабор таких CD3. В другом варианте осуществления число локализаций, где кодоны VH- и VL-кодирующих областей были изменены, находится в диапазоне от 10 до 250, например, до 100 локализаций находятся в каркасной области. После получения библиотеки с одиночными замещениями, как описано выше, выполняли следующие стадии: (а) экспрессия отдельно каж-

дого члена каждой библиотеки с одиночными замещениями в качестве предварительного белка-кандидата; (b) отбор членов каждой библиотеки с одиночными замещениями, которые кодируют предварительные белки-кандидаты, которые связываются с партнером по связыванию, отличным от исходной мишени для связывания (например, желаемой перекрестно-реагирующей мишени(ей)); (c) перетасовка членов выбранных библиотек в PCR с получением комбинаторной перетасованной библиотеки; (d) экспрессия членов перетасованной библиотеки в качестве CD3-связывающих белков-кандидатов; и (e) отбор членов перетасованной библиотеки один или несколько раз в отношении CD3-связывающих белков-кандидатов, которые связываются с исходным партнером по связыванию, и (f) дополнительный отбор белков-кандидатов для связывания с желаемой перекрестно-реагирующей мишенью (мишенями), тем самым обеспечивая кодируемый нуклеиновой кислотой CD3-связывающий белок с повышенной перекрестной реактивностью для одного или нескольких веществ по отношению к референсному CD3-связывающему белку без утраты аффинности к исходному лиганду. В дополнительных вариантах осуществления способ может быть осуществлен для получения белка, содержащего одноцепочечный вариационный фрагмент, связывающийся с CD3, с пониженной реакционной способностью в отношении выбранного перекрестно-реактивного вещества (веществ) или соединения (соединений), или эпитопа (эпитопов) путем замены стадии (f) следующей стадией: деплеция связывающих соединений-кандидатов один или несколько раз из поднабора белка-кандидата, содержащего одноцепочечный вариационный фрагмент, связывающийся с CD3, которые связываются с нежелательным перекрестно-реагирующим соединением.

Фармацевтические композиции.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления предлагаются фармацевтические композиции, содержащие описанный в настоящем изобретении белок, содержащий одноцепочечный вариационный фрагмент, связывающийся с CD3, вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид белка, содержащего одноцепочечный вариационный фрагмент, связывающийся с CD3, или клетку-хозяина, трансформированную этим вектором, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает, но без ограничения, любой носитель, который не препятствует эффективности биологической активности ингредиентов и 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 могут быть введены 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 фармацевтических композиций описанный в настоящем изобретении белок, содержащий одноцепочечный вариационный фрагмент, связывающийся с CD3, инкапсулируется в наночастицах. В некоторых вариантах осуществления наночастицы представляют собой фуллерены, жидкие кристаллы, липосомы, квантовые точки, сверхпарамагнитные наночастицы, дендримеры или наностержни. В других вариантах осуществления фармацевтических композиций белок, содержащий одноцепочечный вариационный фрагмент, связывающийся с CD3, присоединен к липосомам. В некоторых случаях белок, содержащий одноцепочечный вариационный фрагмент CD3, конъюгирован с поверхностью липосом. В некоторых случаях белок, содержащий одноцепочечный вариационный фрагмент CD3, инкапсулирован в оболочку липосомы. В некоторых случаях липосома представляет собой катионную липосому.

Описанные в настоящем изобретении белки, содержащие одноцепочечный вариационный фрагмент, связывающийся с CD3, рассматриваются для применения в качестве лекарственного средства. Введение осуществляют различными способами, например, путем внутривенного, внутривнутрибрюшинного, 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.

Также в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы и применения для стимуляции иммунной системы индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение белка, содержащего одноцепочечный вариационный фрагмент, связывающийся с CD3, описанного в настоящем изобретении. В некоторых случаях введение описанного в настоящем изобретении белка,

содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, индуцирует и/или поддерживает цитотоксичность по отношению к клетке, экспрессирующей антиген-мишень. В некоторых случаях клетка, экспрессирующая антиген-мишень, представляет собой раковую или опухолевую клетку, инфицированную вирусом клетку, бактериально инфицированную клетку, аутореактивную Т- или В-клетку, поврежденные эритроциты, артериальные бляшки или фиброзную ткань.

В настоящем изобретении также предлагаются способы и применения для лечения заболевания, нарушения или состояния, связанного с антигеном-мишенью, включающие введение индивидууму, нуждающемуся в этом, описанного в настоящем изобретении белка, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3. Заболевания, нарушения или состояния, связанные с антигеном-мишенью, включают, но без ограничения, вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантата, атеросклероз или фиброз. В других вариантах осуществления заболевание, нарушение 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, нарушение или состояние, связанное с антигеном-мишенью, представляет собой рак. В одном случае рак представляет собой гематологический рак. В другом случае рак представляет собой рак с солидной опухолью.

Используемый в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении термин "лечение" или "лечить" или "подвергнутый лечению" относится к терапевтическому лечению, целью которого состоит в том, чтобы замедлить (уменьшить) нежелательное физиологическое состояние, нарушение или заболевание, или для получения благоприятных или желаемых клинических результатов. Для целей, описанных в настоящем изобретении, благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но без ограничения, облегчение симптомов; уменьшение степени состояния, нарушения или заболевания; стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) состояния, нарушения или заболевания; задержку начала или замедление прогрессирования состояния, расстройства или заболевания; коренное улучшение состояния, нарушения или болезненного состояния; и ремиссию (частичную или полную), будь то обнаруживаемая или необнаруживаемая, или облегчение или улучшение состояния, нарушения или заболевания. Лечение включает выявление клинически значимого ответа без чрезмерных уровней побочных эффектов. Лечение также включает продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если не было получено лечение. В других вариантах осуществления "лечение" или "лечить" или "подвергнутый лечению" относится к профилактическим мерам, цель которых состоит в задержке начала или уменьшении тяжести нежелательного физиологического состояния, нарушения или заболевания, например, у человека, который предрасположен к заболеванию (например, человек, который несет генетический маркер для заболевания, такого как рак молочной железы).

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем изобретении, белки, содержащие одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, вводят в комбинации со средством для лечения конкретного заболевания, нарушения или состояния. Средства включают, но без ограничения, терапии, включающие антитела, небольшие молекулы (например, химиотерапевтические препараты), гормоны (стероидные, пептидные и т.п.), радиотерапии (гамма-лучи, рентгеновские лучи и/или направленная доставка радиоизотопов, микроволновые печи, УФ-излучение и т.п.), генную терапию (например, препараты антисмысловой, антиретровирусной терапии и т.п.) и другие иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления белки, содержащие одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, вводят в комбинации с противодиарейными средствами, противорвотными средствами, анальгетиками, опиоидами и/или нестероидными противовоспалительными средствами. В некоторых вариантах осуществления белки, содержащие одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, вводят до, во время или после хирургической операции.

Примеры

Пример 1: идентификация анти-CD3 scFv вариантов с различной аффинностью к человеческим CD3ε.

Характеристика исходного анти-CD3ε фага.

Исходный анти-CD3ε показал хорошее связывание с биотин-CD3ε и низкое связывание с биотин-HSA (фиг. 1).

Анти-CD3ε 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. Аминокислотные остатки, изменяющиеся в каждом домене, проиллюстрированы в затененной области на фиг. 2. Остатки изменяли по одному посредством NNN мутагенеза.

Выбор клонов и определение аффинности связывания.

Библиотеки с одиночными замещениями связывали с биотинилированным hu-CD3ε, промывали, элюировали и подсчитывали. Биотинилированный супоCD3 (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 ~2х). Биотинилированные huCD3 (человека) использовали в качестве мишени для отбора второго раунда и промывали в течение 3 часов после связывания обеих библиотек (выбор <2х). Вставки, привнесенные посредством PCR из второго раунда отбора, субклонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.4 His6 ("His6" раскрыт как SEQ ID NO: 105). 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 (фиг. 3).

Пример 2: анализ цитотоксичности.

Биспецифическое антитело, направленное против CD20 и CD3, содержащее вариант анти-CD3 scFv, идентифицированный в примере 1, оценивали *in vitro* на его посредничество в зависимой от Т-клеток цитотоксичности по отношению к CD20⁺ клеткам-мишеням.

Флуоресцентно-меченые CD20⁺ клетки REC-1 (линия мантийноклеточной лимфомы, ATCC CRL-3004) инкубировали с выделенными РВМС случайных доноров или Т-клетками CB15 (стандартизованная линия Т-клеток) в качестве эффекторных клеток в присутствии CD20-CD3 биспецифического антитела, содержащего вариант анти-CD3 scFv, идентифицированный в примере 1. После инкубации в течение 4 ч при 37°C в инкубаторе с увлажнением, высвобождение флуоресцентного красителя из клеток-мишеней в супернатант определяли в спектрофлуориметре. Клетки-мишени, инкубированные без CD20-CD3 биспецифического антитела, содержащего вариант анти-CD3 scFv, идентифицированный в примере 1, и клетки-мишени, полностью лизированные при добавлении сапонина в конце инкубации, служили в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно.

На основании измеренных оставшихся живых клеток-мишеней рассчитывали процент специфического лизиса клеток в соответствии со следующей формулой:

$$[1 - (\text{число живых мишеней}_{\text{(образце)}} / \text{число живых мишеней}_{\text{(самопроизвольно)}})] \times 100\%$$

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

Пример 3: термическая стабильность анти-CD3 scFv вариантов с различной аффинностью к человеческим CD3ε.

Температура гидрофобного воздействия (T_h) белка соответствует производному точки перегиба пиковой флуоресценции красителя и, как известно, коррелирует с температурой плавления (T_m), которая является показателем стабильности белка. Целью данного исследования являлась оценка T_h для нескольких вариантов scFv против CD3ε человека.

Получение белка.

Последовательности анти-человеческих CD3ε scFv связывающих доменов клонировали в вектор pcDNA3.4 (Invitrogen), с предшествующей лидерной последовательностью и последующей последовательностью 6× Histidine tag (SEQ ID NO: 105). Клетки Expi293F (Life Technologies A14527) поддерживали в суспензии в колбах для оптимального роста (Thomson) в количестве от 0,2 до 8×10⁶ клеток/мл в среде для роста Expi 293. Очищенную плазмидную ДНК трансфицировали в клетки Expi293F в соответствии с протоколами Expi293 Expression System Kit (Life Technologies, A14635) и выдерживали в течение от 4 до 6 дней после трансфекции. Кондиционированные среды частично очищали аффинной и обессоливающей хроматографией. Анти-человеческие CD3ε scFv белки 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 (эксклюзионной хроматографии). Поглощение растворов очищенного белка определяли при 280 нм с использованием SpectraMax M2 (Molecular Devices) и прозрачных для ультрафиолетовых лучей 96-луночных планшетов (Corning 3635) и их концентрации рассчитывали из молярных коэффициентов экстинкции.

Дифференциальная сканирующая флуориметрия.

Очищенные анти-человеческие CD3ε scFv белки разводили до концентраций в диапазоне от 0,2 до 0,25 мг/мл вместе с 5× красителем оранжевым SYPRO (Life Technologies S6651) в конечной концентрации 0,15% DMSO в нейтральном буфере, содержащем вспомогательные вещества, в оптических микропланшетах с адгезивной пленкой MicroAmp EnduraPlate (Applied Biosystems 4483485 и 4311971). Планшет, содержащий смеси разведенного белка и красителя, нагружали на прибор для проведения Fast real-time PCR (Applied Biosystems) и подвергали многоступенчатому градиенту температуры от 25°C до 95°C. Температурный градиент состоял из выдержки в течение двух минут при каждом градусе по Цельсию при длине волны возбуждения 500 нм, и эмиссию регистрировали с помощью фильтра ROX. На фиг. 4 T_h в градусах по Цельсию показана для нескольких очищенных вариантов белка, содержащего scFv против человеческого CD3ε.

<u>SEQ ID</u> <u>NO:</u>	<u>Описание</u>	<u>AA Последовательность</u>
1	Линкер	GGGGS GGGGS GGGGS
2	HC CDR1 с положениями вариантов	GX ₁ X ₂ X ₃ NX ₄ YX ₅ X ₆ N
3	HC CDR2 с положениями вариантов	R I R S X ₇ X ₈ N X ₉ Y X ₁₀ T X ₁₁ Y X ₁₂ D X ₁₃ V K
4	HC CDR3 с положениями вариантов	H X ₁₄ N F X ₁₅ X ₁₆ S X ₁₇ I S Y W A X ₁₈
5	LC CDR1 с положениями вариантов	X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ G X ₂₃ V X ₂₄ X ₂₅ G X ₂₆ Y P N
6	LC CDR2 с положениями вариантов	G X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ X ₃₀ X ₃₁ P
7	LC CDR3 с положениями	

	вариантов	X ₃₂ L W Y X ₃₃ N X ₃₄ W X ₃₅
8	Анти-CD3, клон 2B2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK EDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAE YYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL
9	Анти-CD3, клон 9F2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFEFNKYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG GSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSFGAVTSGNYPNWVQ QKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYDNRWVFGGGTKLTVL
10	Анти-CD3, клон 5A2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSHISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG GSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGYVTSGNYPNWVQ QKPGQAPRGLIGGTSFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWIFGGGTKLTVL
11	Анти-CD3, клон 6A2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFMFNKYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKSNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWATWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG GSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSFGAVTSGNYPNWVQ QKPGQAPRGLIGGTKLLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNSWVFGGGTKLTVL
12	Анти-CD3, клон 2D2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYKDSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK EDTAVYYCVRHGNFGNSPISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVVSGNYPNWVQ QKPGQAPRGLIGGTEFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
13	Анти-CD3, клон 3F2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTYNKYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADEVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSPISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG GSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSKGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGGTEKELAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED EAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVL
14	Анти-CD3, клон 1A2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGNTFNKYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYETYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHTNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG GSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQ

		QKPGQAPRGLIGGTYFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
15	Анти-CD3, клон 1C2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNYYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADAVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSQISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTDGNYPNWV QKPGQAPRGLIGGIKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
16	Анти-CD3, клон 2E4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAVNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT EDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGESTGAVTSGNYPNWVQ QKPGQAPRGLIGGTKILAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
17	Анти-CD3, клон 10E4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYPMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKN EDTAVYYCVRHGNFNNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTKGNYPNWVQ QKPGQAPRGLIGGTKMLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
18	Анти-CD3, клон 2H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNGYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADEVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSPISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVVSGNYPNWV QKPGQAPRGLIGGTEFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
19	Анти-CD3, клон 2A4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGNTFNKYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGDSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTHGNYPNWV QKPGQAPRGLIGGTKVLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED EAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
20	Анти-CD3, клон 10B2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNYYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSGYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSYTGAVTSGNYPNWV QKPGQAPRGLIGGTKFNAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED EAEYYCVLWYANRWVFGGGTKLTVL
21	Анти-CD3, клон 1G4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFENKYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYETYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSLISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG

		GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSSGAVTSGNYPNWVQ QKPGQAPRGLIGGTKFGAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
22	wt анти-CD3	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQ QKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
23	wt анти-CD3 HC CDR1	GFTFNKYAMN
24	wt анти-CD3 HC CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVK
25	wt анти-CD3 HC CDR3	HGNFGNSYISYWAY
26	wt анти-CD3 LC CDR1	GSSTGAVTSGNYPN
27	wt анти-CD3 LC CDR2	GTKFLAP
28	wt анти-CD3 LC CDR3	VLWYSNRWV
29	HC CDR1 вариант 1	GNTFNKYAMN
30	HC CDR1 вариант 2	GFEFNKYAMN
31	HC CDR1 вариант 3	GFMFNKYAMN
32	HC CDR1 вариант 4	GFTYNKYAMN
33	HC CDR1 вариант 5	GFTFNKYAMN
34	HC CDR1 вариант 6	GFTFNKYAMN
35	HC CDR1 вариант 7	GFTFNKYAMN
36	HC CDR1 вариант 8	GFTFNKYAMN
37	HC CDR1 вариант 9	GFTFNKYPMN
38	HC CDR1 вариант 10	GFTFNKYAVN
39	HC CDR1 вариант 11	GFTFNKYAIN
40	HC CDR1 вариант 12	GFTFNKYALN
41	HC CDR2 вариант 1	RIRSGYNNYATYYADSVK
42	HC CDR2 вариант 2	RIRSKSNKYATYYADSVK
43	HC CDR2 вариант 3	RIRSKYNKYATYYADSVK
44	HC CDR2 вариант 4	RIRSKYNNYETYYADSVK
45	HC CDR2 вариант 5	RIRSKYNNYATEYADSVK
46	HC CDR2 вариант 6	RIRSKYNNYATYYKDSVK
47	HC CDR2 вариант 7	RIRSKYNNYATYYADEVK
48	HC CDR2 вариант 8	RIRSKYNNYATYYADAVK
49	HC CDR2 вариант 9	RIRSKYNNYATYYADQVK
50	HC CDR2 вариант 10	RIRSKYNNYATYYADDVK
51	HC CDR3 вариант 1	HANFGNSYISYWAY
52	HC CDR3 вариант 2	HTNFGNSYISYWAY
53	HC CDR3 вариант 3	HGNFNNSYISYWAY
54	HC CDR3 вариант 4	HGNFGDSYISYWAY

55	HC CDR3 вариант 5	HGNFGNSHISYWAY
56	HC CDR3 вариант 6	HGNFGNSPISYWAY
57	HC CDR3 вариант 7	HGNFGNSQISYWAY
58	HC CDR3 вариант 8	HGNFGNSLISYWAY
59	HC CDR3 вариант 9	HGNFGNSGISYWAY
60	HC CDR3 вариант 10	HGNFGNSYISYWAT
61	LC CDR1 вариант 1	ASSTGAVTSGNYPN
62	LC CDR1 вариант 2	GESTGAVTSGNYPN
63	LC CDR1 вариант 3	GSYTGAVTSGNYPN
64	LC CDR1 вариант 4	GSSFAGVTSGNYPN
65	LC CDR1 вариант 5	GSSKGAVTSGNYPN
66	LC CDR1 вариант 6	GSSSGAVTSGNYPN
67	LC CDR1 вариант 7	GSSTGYVTSGNYPN
68	LC CDR1 вариант 8	GSSTGAVVSGNYPN
69	LC CDR1 вариант 9	GSSTGAVTDGNYPN
70	LC CDR1 вариант 10	GSSTGAVTKGNYPN
71	LC CDR1 вариант 11	GSSTGAVTHGNYPN
72	LC CDR1 вариант 12	GSSTGAVTVGNYPN
73	LC CDR1 вариант 13	GSSTGAVTSGYYPN
74	LC CDR2 вариант 1	GIKFLAP
75	LC CDR2 вариант 2	GTEFLAP
76	LC CDR2 вариант 3	GTYFLAP
77	LC CDR2 вариант 4	GTSFLAP
78	LC CDR2 вариант 5	GTNFLAP
79	LC CDR2 вариант 6	GTKLLAP
80	LC CDR2 вариант 7	GTKELAP
81	LC CDR2 вариант 8	GTKILAP
82	LC CDR2 вариант 9	GTKMLAP
83	LC CDR2 вариант 10	GTKVLAP
84	LC CDR2 вариант 11	GTKFNAP
85	LC CDR2 вариант 12	GTKFGAP
86	LC CDR2 вариант 13	GTKFLVP
87	LC CDR3 вариант 1	TLWYSNRWV
88	LC CDR3 вариант 2	ALWYSNRWV
89	LC CDR3 вариант 3	VLWYDNRWV
90	LC CDR3 вариант 4	VLWYANRWV
91	LC CDR3 вариант 5	VLWYSNSWV
92	LC CDR3 вариант 6	VLWYSNRWI
93	LC CDR3 вариант 7	VLWYSNRWA
94	Анти-CD3, клон 2G5	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYALNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATEYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT

		EDTAVYYCVRHGNFGNSPISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWVQ KPGQAPRGLIGGTNFLAPGTPERFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAE YYCVLWYSNRWAFGGGTKLTVL
95	Анти-CD3, клон 8A5	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNEYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADDVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKT EDTAVYYCVRHGNFGNSGISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTVGNYPNWWVQ QKPGQAPRGLIGGTEFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
96	Иллюстративная линкерная последовательность	(GS)n
97	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGS)n
98	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGGS)n
99	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGSG)n
100	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGSGG)n
101	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGGGS)n
102	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGGGG)n
103	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGG)n
104	Иллюстративная линкерная последовательность	(GGGGS)4
105	6X Histidine	NNNNNN

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH), вариабельную область легкой цепи (VL) и линкер, при этом VH содержит определяющие комплементарность области VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, при этом VL содержит определяющие комплементарность области VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, где

(a) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 30, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 43, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 25, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 64, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 27 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 89;

(b) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 23, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 24, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 55, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 67, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 77 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 92;

(c) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 31, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 42, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 60, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 64, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 79 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 91;

(d) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 35, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 46, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 56, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 68, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 75 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 28;

(e) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 32, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 47, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 56, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 65, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 80 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 87;

(f) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 29, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 44, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 52, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 73, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 76 и VL CDR3 со-

держит SEQ ID NO: 28;

(g) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 33, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 48, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 57, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 69, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 74 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 28;

(h) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 38, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 24, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 25, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 62, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 81 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 28;

(i) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 37, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 24, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 53, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 70, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 82 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 88;

(j) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 34, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 47, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 56, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 68, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 75 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 28;

(k) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 29, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 24, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 54, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 71, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 83 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 28;

(l) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 33, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 41, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 25, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 63, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 84 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 90;

(m) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 30, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 44, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 58, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 66, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 85 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 28;

(n) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 40, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 45, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 56, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 26, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 78 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 93; или

(o) VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 36, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 50, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 59, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 72, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 75 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 28.

2. Белок, содержащий одноцепочечный варибельный фрагмент, связывающийся с CD3, по п.1, причем указанный белок имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22.

3. Белок, содержащий одноцепочечный варибельный фрагмент, связывающийся с CD3, по п.1, причем VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 30, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 43, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 25, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 64, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 27 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 89.

4. Белок, содержащий одноцепочечный варибельный фрагмент, связывающийся с CD3, по п.1, причем VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 29, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 44, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 52, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 73, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 76 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 28.

5. Белок, содержащий одноцепочечный варибельный фрагмент, связывающийся с CD3, по п.1, причем VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 29, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 24, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 54, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 71, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 83 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 28.

6. Белок, содержащий одноцепочечный варибельный фрагмент, связывающийся с CD3, по п.1, причем VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 40, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 45, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 56, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 26, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 78 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 93.

7. Белок, содержащий одноцепочечный варибельный фрагмент, связывающийся с CD3, по п.1, причем указанный белок имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 94 и SEQ ID NO: 95.

8. Белок, содержащий одноцепочечный варибельный фрагмент, связывающийся с CD3, по п.7, причем указанный белок имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

9. Белок, содержащий одноцепочечный варибельный фрагмент, связывающийся с CD3, по п.7, причем указанный белок имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14.

10. Белок, содержащий одноцепочечный варибельный фрагмент, связывающийся с CD3, по п.7, причем указанный белок имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19.

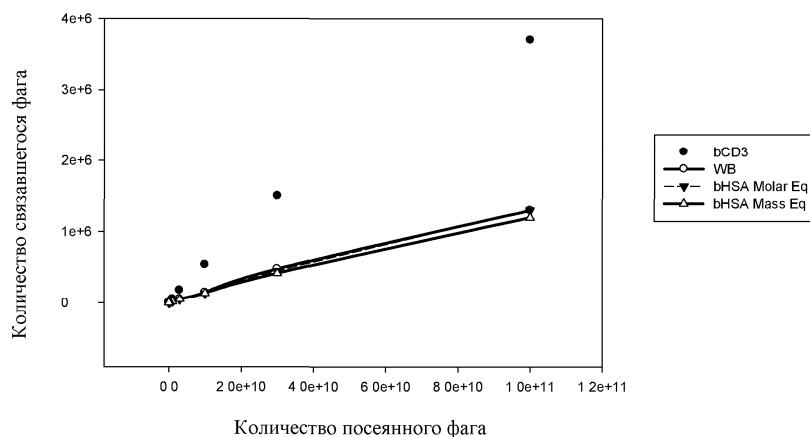
11. Белок, содержащий одноцепочечный варибельный фрагмент, связывающийся с CD3, по п.7, причем указанный белок имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94.

12. Белок, содержащий одноцепочечный варибельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержащий варибельную область тяжелой цепи (VH), варибельную область легкой цепи (VL) и линкер, при этом

VH содержит определяющие комплементарность области VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3, при этом VL содержит определяющие комплементарность области VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3, где

VH CDR1 содержит SEQ ID NO: 39, VH CDR2 содержит SEQ ID NO: 49, VH CDR3 содержит SEQ ID NO: 51, VL CDR1 содержит SEQ ID NO: 61, VL CDR2 содержит SEQ ID NO: 86 и VL CDR3 содержит SEQ ID NO: 87.

13. Белок, содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент, связывающийся с CD3, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH), вариабельную область легкой цепи (VL) и линкер, причем указанный белок имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.



Фиг. 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWW
RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR
DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY
WAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQE
PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ
APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE
DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL

Фиг. 2

анти-CD3e scFv	KD (нМ) hum CD3e	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD (нМ) cyno CD3e	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	cyno/hum отношение
wt	4.4	4.71E+05	2.07E-03	3.9	4.63E+05	1.83E-03	0.9
2B2	3.8	6.08E+05	2.32E-03	3.5	5.57E+05	1.93E-03	0.9
9F2	4.1	3.61E+05	1.33E-03	3.4	3.38E+05	1.05E-03	0.8
5A2	4.3	5.66E+05	2.36E-03	4.2	4.75E+05	1.93E-03	1.0
6A2	4.7	5.22E+05	2.48E-03	4.9	4.56E+05	2.22E-03	1.0
2D2	6.4	5.27E+05	3.38E-03	6.6	4.71E+05	3.09E-03	1.0
3F2	8.0	7.04E+05	5.02E-03	6.6	7.12E+05	4.38E-03	0.8
2E4	14.4	4.16E+05	5.99E-03	13.2	4.04E+05	5.32E-03	0.9
2H2	16.0	5.87E+05	9.06E-03	16.0	5.25E+05	8.37E-03	1.0
10B2	17.9	4.90E+05	8.74E-03	16.6	4.93E+05	8.15E-03	0.9
1A2	19.9	5.99E+05	1.19E-02	17	5.31E+05	9.03E-03	0.9
1C2	36.8	6.63E+05	2.44E-02	30	6.69E+05	1.97E-02	0.8
2A4	46.3	3.64E+05	1.66E-02	43.4	3.53E+05	1.53E-02	0.9
10E4	49.8	5.22E+05	2.60E-02	46.8	5.08E+05	2.38E-02	0.9
8A5	109	7.46E+05	8.10E-02	103	7.23E+05	7.44E-02	0.9
2G5	117	9.94E+05	1.15E-01	115	9.64E+05	1.11E-01	1.0
1G4	132.9	1.67E+05	2.20E-02	133.7	1.64E+05	2.19E-02	1.0

Фиг. 3

Варианты анти- huCD3ε	T _h (°C)
WT	59.2
2B2	57.4
3F2	52.2
2E4	55
2H2	53
10B2	51.5
2A4	56.2
2G5	58
1G4	60.3

Фиг. 4

