

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042775**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.03.23**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201792193**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.04.18**

---

(54) **КОНСТРУКЦИИ БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА ДЛЯ CDH3 И CD3**

---

(31) **15164154.5**

(32) **2015.04.17**

(33) **EP**

(43) **2018.05.31**

(86) **PCT/EP2016/058482**

(87) **WO 2016/166360 2016.10.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЭМДЖЕН РИСЕРЧ (МЬЮНИК)  
ГмбХ (DE)**

(72) Изобретатель:  
**Вайсс Бертрам, Фриск Анн-Лена,  
Цирц Рупрехт, Куфер Петер, Раум  
Тобиас, Рау Дорис, Анлар Йонас,  
Луттербюзе Ральф, Нарвольд Лиза,  
Дальхофф Кристоф, Блюмель  
Клаудиа, Гофман Патрик (DE)**

(74) Представитель:  
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В., Билык А.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2010001585  
WO-A1-2007102525  
US-A1-2014221620  
WO-A2-2012145183  
EP-A1-2426149  
WO-A1-2016001810  
WO-A2-2008119567**

(57) Данное изобретение относится к конструкции биспецифического антитела, содержащей первый связывающий домен человека, который связывается с CDH3 человека на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с CD человека на поверхности T-клетки. Кроме того, в данном изобретении предложены полинуклеотид, кодирующий конструкцию антитела, вектор, содержащий указанный полинуклеотид, и клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная указанным полинуклеотидом или вектором. Кроме того, в данном изобретении предложен способ получения конструкции антитела по изобретению, медицинское применение указанной конструкции антитела и набор, содержащий указанную конструкцию антитела.

**042775**  
**B1**

**042775**  
**B1**

Данное изобретение относится к конструкции биспецифического антитела, содержащей первый связывающий домен человека, который связывается с CDH3 человека на поверхности клетки-мишени, и второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки. Кроме того, в данном изобретении предложен полинуклеотид, кодирующий конструкцию антитела, вектор, содержащий указанный полинуклеотид, и клетку-хозяина, трансформированную или трансфицированную указанным полинуклеотидом или вектором. Кроме того, в данном изобретении предложен способ получения конструкции антитела по изобретению, медицинское применение указанной конструкции антитела и набор, содержащий указанную конструкцию антитела.

#### Введение

Надсемейство кадгеринов охватывает более 100 членов у людей, включая так называемые классические кадгерины Р-кадгерин, Е-кадгерин, N-кадгерин и R-кадгерин, каждый из которых активен в отдельном наборе тканей (Takeichi M. *Development*, 102:639-55(1988), van Roy R, *Nature Rev.*, V14:121-134 (2014)). Кадгерины, в частности, играют важную роль в развитии тканей и органов взрослого человека, а также в гомеостазе различных тканей (Copacci-Sorrell M., et al., *J Clin Invest*, 109:987-91, (2002)). Кадгерины представляют собой трансмембранные гликопротеины, которые регулируют процессы адгезии "клетка-клетка" путем образования кальций-зависимых связей и путем превращения механических раздражителей в электрохимическую активность, процесс, называемый механотрансдукцией (Gumbiner J. *Cell Biol.*, 148:399-404 (2000); Yagi, et al., *Genes Dev.*, 14:1169-1180 (2000, Parades et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1826, 297-311 (2012)).

Плацентарный кадгерин (Р-кадгерин), также известный как кальций-зависимый "клетка-клетка" адгезионный белок 3 (CDH3), представляет собой белок 118 кДа с большим внеклеточным доменом (ECD), равным около 800 аминокислот. ECD CDH3 содержит пять повторов кадгерина, обозначенных в данном документе как (внеклеточные) домены 1-5/Dom1-Dom5/D1-D5, каждый из которых содержит около 110 аминокислот. Белки с наибольшей гомологией последовательности к Р-кадгерину представляют собой Е-кадгерин с гомологией последовательностей, равной 53% и N-кадгерин с 39% гомологией. Уровень экспрессии Р-кадгерина считается низким у здоровых взрослых людей и ограничивается базальными или нижними слоями стратифицированного эпителия, включая простату и кожу, миоэпителиальные клетки молочной железы (Takeichi M. *J Cell Biol* 103:2649-58, (1986) и Shimoyama Y, et al., *Cancer Res.*, 49:2128-33(1989)). Было показано, что, не будучи летальным у мышей с нокаутным геном, потеря функции Р-кадгерина связана с дефектами развития, а также с гиперплазией и дисплазией эпителия молочной железы. (G.L. Radice et al. *J. Cell Biol.* 139: 1025-1032 (1997)).

В отличие от низкого уровня экспрессии генов у здоровых лиц экспрессия Р-кадгерина регулируется в контексте некоторых заболеваний, включая, например, иммунные заболевания, такие как болезнь Крона и колиты (Hardy, et al., *Gut* 50:513-519 (2002)). Кроме того, считается, что Р-кадгерин играет важную роль в отношении проинвазивного характера раковых клеток (Furukawa, et al., *Microscopy Res. Technique* 38 (4):343-352 (1997), Parades et al. *Clin Cancer Res.* 11(16), 5869-5877 (2005), Parades et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1826, 297-311 (2012)). Увеличение синтеза Р-кадгерина было описано в различных опухолях, включая колоректальную, легочную (НМРЛ), грудную (трижды негативная), поджелудочной железы, головы и шеи, щитовидной железы, шейки матки, яичника и желудка (Milic et al. *Cancer Res* 68: (19) 7760-7768 (2008)., Imai et al. *Clin Cancer Res* 14(20) 6487-6495 (2008), Paredes et al. *Clin Cancer Res* 11 (16) 5869-5877 (2005), Dasgupta et al. *Oral Oncology* 42, 306-316 (2006), Jarzab et al. *Cancer Res*; 65: (4) 1587-1597 (2005)., Patel et al. *Int. J. Cancer*: 106, 172-177 (2003), Kim et al. *Human Pathology* 41, 877-885 (2010)). Кроме того, было обнаружено, что повышенная экспрессия Р-кадгерина коррелирует с низкой выживаемостью пациентов при различных типах рака (Sun L et al. *Am J Pathol.* 2011; 179:380-90; Gamallo, *Modern Pathology*, 14:650-654, (2001); Stefansson, et al., *J. Clin. Oncol.* 22(7): 1242-1252 (2004), Parades et al. *Cancer Res.* 64, 8309-8317 (2004)), Taniuchi K et al. *Cancer Res.* 2005; 65:3092-9; Paredes J et al. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:5869-77; Hardy RG et al. *Gut.* 2002; 50:513-9; Peralta Soler A et al. *Cancer.* 1999; 86:1263-72).

После сердечно-сосудистых заболеваний новообразования занимают второе место среди смертоносных заболеваний в категории неинфекционных заболеваний, что привело в 2013 г. во всем мире к гибели около 8,3 млн человек (GBD 2013 *Lancet* 2015; 385: 117-71). С 1990 г. абсолютное число случаев рака увеличилось на 45,6%, что объясняется тем, что население мира растет, что люди становятся старше и что распространенность установленных факторов риска (например, курения, избыточного веса, физической бездеятельности) также увеличивается (GBD 2013 *Lancet* 2015; 385: 117-71, Torre LA et al. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65:87-108). У мужчин рак легкого является основной причиной смерти с предполагаемым числом около 1,1 млн случаев в год, за которым следует рак печени и желудка. У женщин рак молочной железы является основной причиной смерти с около 0,5 млн случаев в год, за которым следует рак легкого и толстой кишки. По оценкам, около 14 млн новых случаев рака в 2012 г. во всем мире во главе с раком легкого с ~ 1,2 миллиона случаев у мужчин и рака молочной железы с ~1,7 млн у женщин (Torre LA et al. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65:87-108). Всеохватывающий рак представляет собой большую нагрузку на общество во всем мире, и существует высокая потребность в вариантах лечения для борьбы с этой болезнью.

Общие стратегии лечения рака включают хирургическое вмешательство, а затем химиотерапию, лучевую терапию или, в последнее время, целенаправленную терапию или их комбинации (например, рекомендации NCCN по онкологии). Химиотерапевтические агенты включают нуклеотидные аналоги, такие как 5-флуороацил (5-FU), повреждающие ДНК агенты, такие как ингибиторы оксалиплатин и ингибиторы топоизомеразы, такие как иринотекан или микротрубочки, такие как доцетаксел, которые все приводят к ингибированию пролиферации опухолевых клеток. Целенаправленная терапия включает, например, малые молекулы, которые селективно ингибируют мутантные онкогенные киназы, такие как селективное соединение BRAF V600E вемурафениб (Garbe C. et al., *Recent Results Cancer Res.* 2014; 201:215-25), который одобрен для лечения меланомы или ингибиторов киназы анапластической лимфомы (ALK) кризотиниб и церитиниб, одобренных для лечения рака легкого (Pall G. *Curr Opin Oncol.* 2015; 27:118-24). Кроме того, существуют соединения на основе антител, такие как цетуксимаб и панитумумаб, которые распознают и инактивируют эпидермальный рецептор фактора роста (EGFR) и которые одобрены для лечения рака толстой кишки дикого типа KRAS (Tol J, Punt CJ. *Clin Ther.* 2010; 32:437-53) или трастузумаб, который распознает Her2 и одобрен для лечения рака молочной железы (Ahmed S. et al. *Breast Cancer.* 2015; 22:101-16).

Несмотря на развитие широкого спектра терапевтических вмешательств, за исключением спорадических случаев нет лечения данного гетерогенного заболевания. Неоднородность отдельных опухолей приводит к тому, что только ограниченное число пациентов реагирует на определенную терапию и, кроме того, во время прогрессирования опухоли развивается резистентность к терапевтическим агентам (Jamal-Hanjani M. et al. *Clin Cancer Res.* 2015; 21:1258-1266). Наконец, побочные эффекты лекарственных препаратов также могут привести к прерыванию или прекращению лечения, хотя недавно разработанные целевые терапии, как предполагается, лучше переносятся (<http://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/chemotherapy/side-effects-chemotherapy>; Sun GC et al. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015 Mar 17 [Онлайн публикация до выхода печатной версии]).

Кроме того, по этим причинам все еще существует высокая медицинская потребность в разработке новых лекарственных препаратов.

Сверхэкспрессия CDH3 в опухолевых клетках обеспечивает основу для нового подхода к лечению рака, используя биспецифическое антитело, которое распознает сверхэкспрессирующие CDH3 опухолевые клетки и убивает их путем перенаправления цитотоксических Т-клеток, которые распознаются CD3-связывающей частью этого антитела. Экспрессионные анализы, которые были проведены либо на уровне РНК, либо на уровне белка с использованием в основном иммуногистохимии, демонстрируют, что CDH3 экспрессируется на высоком и хорошо обнаруживаемом уровне в широком диапазоне различных типов рака, включая рак толстого кишечника (Milic et al., Kita et al., Imai et al., <http://www.proteinatlas.org/>), легкого, включая немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легкого (Imai et al., атлас белков человека), молочной железы, предпочтительно тройной негативный рак (Perou et al., Paredes et al., Turashvili et al., Imai et al.), поджелудочной железы (Imai et al., Taniuchi et al.), головы и шеи, включая плоскоклеточную карциному языка (Dasgupta et al.; собственные неопубликованные данные), щитовидной железы (Jarzab et al., Rocha et al., атлас белков человека), шейки матки (Imai et al., Han et al.), яичника, предпочтительно на стадии II и выше (Patel et al атлас белков человека), желудка (Kim et al; Imai et al), эндометрия (Sugiyama Y et al. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:5589-600; атлас белков человека), холангиокарциному (Baek S et al. *Anat Cell Biol.* 2010; 43:110-7; Imai et al), мочевого пузыря (Imai et al., собственные неопубликованные данные), предстательной железы (Imai et al.; собственные неопубликованные данные), яичек (Imai et al) саркому мягких тканей (Imai et al), пищевода (собственные неопубликованные данные), почек (собственные неопубликованные данные).

Будущие анализы могут демонстрировать повышенную экспрессию в дополнительных опухолях или подтипах, которые затем могут также стать актуальными для такой терапии. Fotouhi et al., например, продемонстрировали снижение метилирования CDH3-промотора в нейроэндокринных опухолях тонкого кишечника, что может привести к повышенной экспрессии белка CDH3 (Fotouhi O et al. *Epigenetics.* 2014; 9:987-97). Положительная корреляция наблюдалась между повышенной экспрессией CDH3 и miR-205, микро РНК, которая, по-видимому, является специфическим маркером для плоскоклеточной карциномы легкого (Huang W et al. *Chin Med J (Engl).* 2014; 127:272-8).

В отличие от повышенной экспрессии CDH3 в ткани опухоли его экспрессия в нормальной ткани низкая или не обнаруживается (Milic et al., Imai et al., Taniuchi et al., Rocha et al., Dasgupta et al., Han et al., Patel., Kim et al., Sugiyama et al., Jarzab et al., атлас белков человека). В совокупности это свидетельствует о том, что CDH3 является подходящей мишенью для предлагаемого подхода с биспецифическим антителом.

Было описано множество антител, связывающихся с Р-кадгерином, и наиболее тщательно охарактеризованные были опубликованы в следующих патентах: WO 9919477, WO 02/097395, WO 04/110345, WO 06/114704, WO 07/102525, WO 2010/001585, WO 2010126137; WO 2010054007, WO 2011056997, WO 2011080796, WO 2011071541.

Некоторые из антител, известных в данной области, блокируют функцию CDH3, например, путем вмешательства в его адгезионные свойства, такие как анти CDH3-антитело PF-03732010 (Zhang CC et al.

Clin Cancer Res. 2010; 16:5177-88). In vitro данное антитело приводит к нарушению 3D-спероидов с изменениями внутриклеточного сигналинга, такого как диссоциация  $\beta$ -катенина в наномолярных концентрациях, но не ингибирует пролиферацию. In vivo ингибирование роста опухоли и образование метастазов, а также длительная выживаемость наблюдались в доклинических моделях при дозах 10 мг/кг и способом, который зависит от уровня экспрессии CDH3. Механически не исключено, что противоопухолевые эффекты in vivo дополнительно опосредуются процессом антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), которая включает уничтожение клетки путем связывания цитотоксических Т-клеток с Fc-доменом иммуноглобулинов. Такой механизм действия был приписан некоторым заявленным антителам против CDH3. Хотя блокирование активности Р-кадгерина было описано как подход к ингибированию роста опухолей, экспрессирующих Р-кадгерин, достигнутые результаты часто остаются неудовлетворительными, поскольку они задерживают рост опухоли или, в лучшем случае, индуцируют застой опухоли, но не устраняют опухоль.

Чтобы улучшить их ингибирующее действие на рост опухоли, антитела могут быть конъюгированы с цитотоксическими или цитостатическими агентами (например, химиотерапевтическим агентом, токсином, радиоактивным изотопом или тому подобным), что приводит к образованию конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) или в целом иммуноконъюгатов. Иммуноконъюгаты позволяют осуществлять целенаправленную доставку лекарственного фрагмента в опухоль и внутриклеточное их накопление. Эффективность таких иммуноконъюгатов в отношении уничтожения опухолевых клеток сильно зависит от различных параметров, таких как интернализационное поведение молекулы-мишени, которая обычно находится в клеточной мембране, с внеклеточным доменом, а также механизм действия соответствующего иммуноконъюгата. В целом, было показано, что связь с иммуноконъюгатом значительно повышает противоопухолевую эффективность различных антител.

В последнее время биспецифические молекулы, связывающиеся с молекулой-мишенью, а также с Т-клетками, показали многообещающие результаты, обходящие многие из вышеупомянутых недостатков. Эти молекулы лекарственного средства не полагаются на полную блокировку функции мишени или на состояние пролиферации клетки-мишени, так как они используют очень эффективный естественный эффект уничтожения Т-клеток. Одним из примеров таких биспецифических молекул являются конструкторы биспецифического антитела антицель x анти-CD3 одноцепочечное антитело, которые, как было показано ранее, опосредуют Т-клеточно опосредованное уничтожение клеток-мишеней с очень высокой эффективностью, см., например, блинатумомаб.

Чтобы отличить биспецифическую молекулу scFv от хорошего лекарственного вещества, которое в конечном итоге поможет вылечить пациентов, необходимо выполнить множество разных критериев. Сочетание и строгость этих критериев делают появление молекул, удовлетворяющих эти потребности, крайне редким и непредсказуемым событием. Наиболее очевидным критерием является эффективность лекарственных средств-кандидатов.

Эффективность таких молекул зависит от множества параметров на домене связывания мишени, а также на части рекрутинга Т-клеток биспецифической молекулы. Особенно на целевой связывающей части биспецифической молекулы scFv непредсказуемы, так как они сильно варьируют в зависимости от природы молекулы-мишени, включая ее третичную, а также четвертичную структуру. Среди определяющих эффективность параметров кинетика связывания между мишенью и биспецифической связывающей молекулой, а также область точного связывания, так называемый связывающий эпитоп, играют важную роль.

Анти-CDH3-моноклональные антитела - как правило, справедливо для любых других моноклональных антител - функционируют посредством высокоспецифического распознавания их молекул-мишеней. Они распознают только один сайт или эпитоп на их целевой молекуле CDH3. Кроме того, было обнаружено, что многие антитела проявляют свою функцию видоспецифическим образом. Однако эта видовая специфичность, присущая не только моноклональным антителам CDH3 (и их фрагментам), но и моноклональным антителам в целом, является значительным препятствием для их развития в качестве терапевтических агентов для лечения заболеваний человека. Чтобы получить одобрение на рынке, любое новое лекарственное средство-кандидат должно пройти тщательное испытание.

Это испытание подразделяется на доклинические и клинические фазы; тогда как последнее выполняется на пациентах-людях, первое - на животных. Цель доклинического испытания заключается в том, чтобы доказать, что лекарственное средство-кандидат имеет желаемую активность и, что самое важное, является безопасным. Только тогда, когда безопасность в отношении животных и возможная эффективность лекарственного средства-кандидата были установлены при доклиническом испытании, это лекарственное средство-кандидат, скорее всего, будет одобрено для клинического испытания на людях соответствующим регулирующим органом. Лекарственные средства-кандидаты могут быть проверены на предмет безопасности для животных тремя способами: (i) на релевантных видах, то есть видах, у которых лекарственные средства-кандидаты могут распознавать ортогенные антигены, (ii) на трансгенном животном, содержащем антигены человека и (iii) с использованием суррогата для лекарственного средства-кандидата, который может связывать ортогенные антигены, присутствующие у животного. Ограничения трансгенных животных заключаются в том, что эта технология обычно ограничена грызунами.

Между грызунами и человеком существуют существенные различия в физиологии, и результаты безопасности не могут быть легко экстраполированы на людей. Ограничения суррогата для лекарственного средства-кандидата представляют собой различный состав вещества по сравнению с фактическим лекарственным средством-кандидатом, а часто используемыми животными являются грызуны с ограничением, которое обсуждалось выше. Поэтому доклинические данные, полученные у грызунов, имеют ограниченную прогностическую способность по отношению к лекарственному средству-кандидату

Подход выбора для испытания безопасности - использование соответствующего вида, предпочтительно примата, и из-за генетического сходства - шимпанзе. Тем не менее, шимпанзе считаются находящимися под угрозой исчезновения видами, и из-за их человекоподобной природы использование таких животных для испытания безопасности лекарственных средств было запрещено в Европе и сильно ограничено в других местах. Хотя Т-клеточные биспецифические одноцепочечные антитела, описанные в данной области техники, обладают большим терапевтическим потенциалом для лечения злокачественных заболеваний, большинство из этих биспецифических молекул ограничены тем, что они являются видоспецифическими, и распознают только человеческий антиген и, вероятно, аналог от примата, т.е. макака. Более того, большинство указанных биспецифических молекул дополнительно ограничены тем, что они не могут выполнять свою желаемую функцию через границы видов, так что они могут распознавать гомологи человека и приматов, но не могут оказывать, например, опосредуемую Т-клетками цитотоксичность.

### Сущность изобретения

Поскольку по-прежнему существует потребность в дополнительных вариантах лечения различных типов рака, описанных в данном документе, в данном документе предлагаются средства и способы для решения данной проблемы в форме конструкции биспецифического антитела с одним связывающим доменом, нацеленным на CDH3 и со вторым связывающим доменом, нацеленным на CD3 на Т-клетках.

В данном изобретении предложена, в первом аспекте, конструкция биспецифического антитела, содержащая первый (предпочтительно человеческий) связывающий домен, который связывается с кластером эпитопа CDH3 человека на поверхности клетки-мишени и содержащая второй (предпочтительно человеческий) связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, причем кластер эпитопа CDH3 человека находится в аминокислотных положениях 291-363 (SEQ ID NO: 36) CDH3 человека. В предпочтительном варианте реализации данного изобретения конструкция биспецифического антитела характеризуется тем, что первый связывающий домен также связывается с CDH3 макака, предпочтительно с CDH3 *Macaca fascicularis*.

Эта функциональность по всем видам означает, что одну и ту же молекулу можно использовать в доклинических исследованиях на животных, а также в клинических исследованиях на людях. Это приводит к высоко сопоставимым результатам и значительно увеличивающейся прогнозирующей способности исследований на животных по сравнению с видоспецифическими суррогатными молекулами. Поскольку как CD3, так и CDH3-связывающий домен CDH3xCD3 биспецифических конструкций антител по изобретению являются кросс-видоспецифическими и функциональными, т.е. реакционноспособными с антигенами человека и макака, оказывающими сопоставимый эффект Т-клеточной опосредованной цитотоксичности, его можно использовать как для доклинической оценки безопасности, активности и/или фармакокинетического профиля данных связывающих доменов у приматов, так и в идентичной форме, в качестве лекарственного средства у людей. Понятно, что в предпочтительном варианте реализации изобретения кросс-видовая специфичность первого и второго связывающего домена конструкций антитела по изобретению является идентичной.

Ввиду вышеизложенного, необходимость конструировать суррогатную конструкцию биспецифического антитела CDH3xCD3 для испытания в филогенетически удаленном (от человека) виде исчезает. В результате идентичная молекула может быть использована в доклинических испытаниях животных, в том виде как предполагается, для введения людям в клинических испытаниях, так и для дальнейшего утверждения на рынке и введения терапевтического лекарственного средства. Способность использовать ту же самую молекулу для доклинического тестирования на животных, как при последующем введении людям, практически исключает или, по крайней мере, значительно снижает опасность того, что данные, полученные при доклиническом испытании на животных, имеют ограниченную применимость к случаю с человеком. Вкратце, получение доклинических данных о безопасности у животных с использованием той же самой молекулы, которая будет фактически введена человеку, многое делает для обеспечения применимости данных к соответствующему сценарию у человека. Напротив, в обычных подходах, использующих суррогатные молекулы, указанные суррогатные молекулы должны быть молекулярно адаптированы к испытательной системе животных, используемой для доклинической оценки безопасности. Таким образом, молекула, которая будет использоваться в терапии человека, на самом деле отличается в последовательности и, вероятно, по структуре от суррогатной молекулы, используемой при доклиническом испытании в фармакокинетических параметрах и/или биологической активности, вследствие чего данные, полученные при доклиническом испытании на животных, имеют ограниченную применимость и переносимость на случаи человека. Использование суррогатных молекул требует конструирования, производства, очистки и оценки совершенно новой конструкции. Это требует дополнительных затрат на

разработку и время, необходимое для получения этой молекулы. В сумме суррогаты должны разрабатываться отдельно в дополнение к фактическому препарату, который должен использоваться в терапии человека, так что необходимо провести две линии разработки для двух молекул. Поэтому основным преимуществом предпочтительной конструкции биспецифического антитела человека CDH3×CD3 по изобретению, проявляющей кросс-видовую специфичность и функциональность (то есть реакционную способность), описанную в данном документе, является то, что идентичная молекула может использоваться для терапевтических агентов у людей и для доклинического испытания на животных.

При использовании кросс-видоспецифичной конструкции CDH3×CD3 биспецифических антител по изобретению также не требуется приспособлять тестируемое животное к лекарственному средству-кандидату предназначенному для введения людям, например, создавать трансгенных животных. Конструкция биспецифического антитела CDH3×CD3 (предпочтительная для человека) по изобретению, проявляющая кросс-видовую специфичность и реакционную способность в соответствии с применениями и способами изобретения, может быть непосредственно применена для доклинического испытания у приматов, отличных от шимпанзе, таких как макаки, без каких-либо генетических манипуляций с животными. Как хорошо известно специалистам в данной области техники, подходы, в которых тестируемое животное адаптировано к лекарственному средству-кандидату, всегда несут риск того, что результаты, полученные в доклиническом испытании безопасности, менее репрезентативны и прогностичны для человека из-за модификации животного. Например, у трансгенных животных белки, кодируемые трансгенами, часто сильно надэкспрессированы. Таким образом, данные, полученные для биологической активности антитела против этого белкового антигена, могут быть ограничены в их "предсказательной ценности для людей, в которых белок экспрессируется на гораздо более низких, более физиологических уровнях.

Еще одним преимуществом предпочтительно человеческой конструкции биспецифического антитела CDH3×CD3 по изобретению является способность экстрагировать многочисленные образцы крови при ее использовании в качестве части доклинического испытания животных, например, в ходе фармакокинетических исследований на животных. Множественные экстракты крови могут быть гораздо легче получены с приматом, отличным от шимпанзе, чем с более примитивными животными, например, мышью. Извлечение нескольких образцов крови позволяет проводить непрерывное тестирование параметров крови для определения биологических эффектов, индуцируемых конструкцией биспецифического антитела CDH3×CD3 по изобретению. Кроме того, извлечение нескольких образцов крови позволяет исследователю оценить фармакокинетический профиль конструкции биспецифического антитела CDH3×CD3 (предпочтительно человека) по изобретению, как определено в данном документе. Кроме того, потенциальные побочные эффекты, которые могут быть индуцированы указанной конструкцией биспецифического антитела CDH3×CD3 по изобретению, отраженные в параметрах крови, могут быть измерены в разных образцах крови, экстрагированных в ходе введения указанного антитела.

Преимущества конструкции биспецифического антитела CDH3×CD3 по изобретению, как определено в данном документе, демонстрирующую кросс-видовую специфичность, можно кратко обобщить следующим образом:

Во-первых, конструкция биспецифического антитела CDH3×CD3 по изобретению, как определено в данном документе, применяемая для доклинического испытания, является такой же, как и в терапии человека. Таким образом, не нужно разрабатывать две независимые молекулы, которые могут различаться по своим фармакокинетическим свойствам и биологической активности. Это очень важно в том, что, например, фармакокинетические результаты более непосредственно переносятся и применимы к условиям человека, чем, например, в обычных суррогатных подходах.

Во-вторых, применение конструкции биспецифического антитела CDH3×CD3 по изобретению, как определено в данном документе для получения терапевтических средств у человека, менее затратно и трудоемко, чем суррогатные подходы.

В-третьих, конструкция биспецифического антитела CDH3×CD3 по изобретению, как определено в данном документе, может быть применена для доклинического испытания не только у одного вида приматов, но и у ряда разных видов приматов, что ограничивает риск потенциальных различий между приматами и человеком.

В-четвертых, шимпанзе, в качестве исчезающего вида для тестирования на животных, можно избежать, если это необходимо.

В-пятых, для обширных фармакокинетических исследований можно извлечь несколько образцов крови.

В-шестых, из-за человеческого происхождения конструкций антител в соответствии с предпочтительным вариантом реализации изобретения, проявление иммунной реакции против указанных связывающих молекул минимальна при введении пациентам-людям. Индукция иммунного ответа с антителами, специфичными для лекарственного средства-кандидата, полученного из видов, отличных от человека, например, мыши, приводящая к развитию антимишиных антител человека (НАМА) к терапевтическим молекулам мышино происхождения.

Терапевтическое применение конструкции биспецифического антитела CDH3×CD3 по изобретению обеспечивает новый и изобретательский терапевтический подход к раку, предпочтительно солидным опухолям, более предпочтительно карциномам и другим показаниям рака, как указано ниже, как показано в следующих примерах, конструкция биспецифического антитела CDH3×CD3 по изобретению обеспечивает преимущество в качестве инструмента для уничтожения CDH3-экспрессирующих раковых клеток человека. Кроме того, цитотоксическая активность конструкций биспецифического антитела CDH3×CD3 по изобретению обеспечивает предпочтительный способ действия по сравнению с классическими (моноспецифическими) молекулами IgG или ADC.

Для характеристики лекарственных средств-кандидатов в моделях животных необходима перекрестная реакционная способность вида к соответствующему виду животных, а межвидовой разрыв аффинности должен поддерживаться в 10-кратной разнице аффинности для обеспечения предсказательной модели животных. Обезьяны макаки (и особенно яванский макак) считаются одними из наиболее значимых видов для испытания эффективности и токсичности с наивысшей прогностической ценностью. Чтобы проанализировать, соответствуют ли критерии антитела критериям эффективности, необходимо разработать и квалифицировать соответствующие анализы цитотоксичности.

Чтобы предотвратить неблагоприятные побочные эффекты, необходимо обеспечить, чтобы целевая связывающая часть конструкции биспецифического антитела специфически связывалась с Р-кадгеринном, а не с одним из его вышеописанных ближайших гомологов или других белков, присутствующих в организме.

Антитела по данному изобретению предпочтительно не связываются с внеклеточным доменом D1 CHD3 (положения 108-215 SEQ ID NO: 1), они предпочтительно не связываются с внеклеточным доменом D4 CHD3 (положения 441-546 SEQ ID NO: 1), и они предпочтительно не связываются с внеклеточным доменом D5 CHD3 (положения 547-650 SEQ ID NO: 1).

В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом реализации данного изобретения конструкция биспецифического антитела отличается тем, что первый связывающий домен связывается с эпитопом, который находится в положениях аминокислот 291-327 (SEQ ID NO: 34) CDH3 человека. Антитела, специфически связывающиеся с положениями аминокислот 291-327 (SEQ ID NO: 34), предпочтительно не связываются с внеклеточным доменом D3 CHD3 CDH3 человека (положения 328-440 SEQ ID NO: 1).

Предпочтительная конструкция антитела в соответствии с изобретением также может быть определена как конструкция биспецифического антитела, содержащая первый связывающий домен (предпочтительно человека), который связывается с эпитопом CDH3 человека на поверхности клетки-мишени и вторым связывающий домен (предпочтительно человека), который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, причем конструкция антитела связывается с тем же эпитопом, что или конкурирует за связывание с CDH3 с антителом, обозначенным CDH3-11, CDH3-12, CDH3-13 или CDH3-14, то есть антителом, содержащим:

участок VH, как показано в SEQ ID NO: 155 и участок VL, как показано в SEQ ID NO: 156,  
участок VH, как показано в SEQ ID NO: 165 и участок VL, как показано в SEQ ID NO: 166,  
участок VH, как показано в SEQ ID NO: 175 и участок VL, как показано в SEQ ID NO: 176; или  
участок VH, как показано в SEQ ID NO: 185 и участок VL, как показано в SEQ ID NO: 186.

В другом аспекте данного изобретения конструкция биспецифического антитела отличается тем, что первый связывающий домен связывается с эпитопом, который находится в положениях аминокислот 328-363 (SEQ ID NO: 35) CDH3 человека.

Предпочтительная конструкция антитела в соответствии с изобретением также может быть определена как конструкция биспецифического антитела, содержащая первый связывающий домен (предпочтительно человека), который связывается с эпитопом CDH3 человека на поверхности клетки-мишени и вторым связывающий домен (предпочтительно человека), который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, причем конструкция антитела связывается с тем же эпитопом, что или конкурирует за связывание с CDH3 с антителом, обозначенным CDH3-24, то есть антителом, содержащим участок VH, как показано в SEQ ID NO: 285 и участок VL, как показано в SEQ ID NO: 286.

Другая предпочтительная конструкция антитела в соответствии с изобретением также может быть определена как конструкция биспецифического антитела, содержащая первый связывающий домен (предпочтительно человека), который связывается с эпитопом CDH3 человека на поверхности клетки-мишени и вторым связывающий домен (предпочтительно человека), который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, причем конструкция антитела связывается с тем же эпитопом, что или конкурирует за связывание с CDH3 с антителом, обозначенным CDH3-25, CDH3-26 или CDH3-27, то есть антителом, содержащим

участок VH, как показано в SEQ ID NO: 295 и участок VL, как показано в SEQ ID NO: 296,  
участок VH, как показано в SEQ ID NO: 305 и участок VL, как показано в SEQ ID NO: 306; или  
участок VH, как показано в SEQ ID NO: 315 и участок VL, как показано в SEQ ID NO: 316.

Независимо от того, конкурирует ли конструкция антитела в отношении связывания с другой дан-

ной конструкцией антитела, в конкурентном анализе, таком как конкурентный ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) или клеточный конкурентный анализ. Также можно использовать авидин-связанные микрочастицы (шарики). Подобно покрытой авидином пластинке ELISA, при взаимодействии с биотинилированным белком, каждый из этих гранул может быть использована в качестве субстрата, на котором может быть проведен анализ. Антиген наносят на шарик и затем предварительно покрывают первым антителом. Второе антитело добавляют и определяют любое дополнительное связывание. Считывание происходит с помощью проточной цитометрии.

В другом варианте реализации данного изобретения конструкция биспецифического антитела отличается тем, что первый связывающий домен связывается с эпитопом, который находится в положениях аминокислот 328-363 (SEQ ID NO: 35) CDH3 человека и с эпитопом, который находится в положениях аминокислот 404-440 (SEQ ID NO: 390) CDH3 человека.

Кроме того, конструкции антител по данному изобретению предпочтительно не связываются с эпитопом, который находится в положениях аминокислот 216-252 или 253-290 CDH3 человека, как показано в SEQ ID NO: 1.

Кроме того, конструкции антител по данному изобретению предпочтительно не связываются с эпитопом, который находится в положениях аминокислот 364-403 CDH3 человека, как показано в SEQ ID NO: 1.

Конструкции антител, специфически связывающиеся с эпитопом, который находится в положениях аминокислот 328-363 (SEQ ID NO: 35), предпочтительно не связываются с внеклеточным доменом D2 CHD3 CDH3 человека (положения 216-327 SEQ ID NO: 1).

Одним из преимуществ данного изобретения является предоставление конструкции биспецифического антитела, содержащей связывающий домен, который связывается с CD3 и связывающий домен, способным связываться с CDH3, тогда как оба связывающих домена проявляют кросс-видовую специфичность для CDH3 человека и макака. Неожиданно было обнаружено, что конструкции биспецифического антитела CDH3×CD3 по изобретению не только специфически связываются с гомологами CDH3 CDH3 и CD3 человека и макака, но также оказывают Т-клеточно-опосредованную цитотоксичность в системах анализа CDH3 человека и макака. Преимущественно в данном изобретении предлагаются конструкции биспецифического антитела CDH3×CD3, которые проявляют Т-клеточно опосредованную цитотоксичность у человека и макака. Это преимущество достигается конструкциями биспецифического антитела CDH3×CD3, которые связываются с эпитопным кластером, который находится в аминокислотных положениях 291-363 (SEQ ID NO: 36) CDH3 человека.

Следует отметить, что формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Так, например, ссылка на "реагент" включает один или более таких различных реагентов, а ссылка на "способ" включает ссылку на эквивалентные этапы и способы, известные специалистам в данной области техники, которые могут быть модифицированы или заменены на способы, описанные в данном документе.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует рассматривать как относящийся к каждому элементу в ряду. Специалисты в данной области техники поймут или смогут определить множество эквивалентов конкретных вариантов реализации изобретения, описанных в данном документе, с применением не более чем стандартных экспериментов. Такие эквиваленты охватываются настоящим изобретением.

Термин "и/или" везде, где он используется в данном документе, включает значение "и", "или" и "все или любую другую комбинацию элементов, связанных указанным термином". Используемый в данном документе термин "около" или "приблизительно" означает в пределах  $\pm 20\%$ , предпочтительно в пределах  $\pm 15\%$ , более предпочтительно в пределах  $\pm 10\%$  и наиболее предпочтительно в пределах  $\pm 5\%$  от заданного значения или диапазона.

В данном описании и формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержит" и его вариации, такие как "включает" и "содержащий", следует понимать, как включающее указанное целое значение или этап, или группу целых значений или этапов, но не исключающее любое другое целое значение или этап или группу целых значений или этапов. При использовании в данном документе термин "содержащий" может быть заменен термином "который содержит" или "включающий" или иногда, когда используемым в данном описании термином "имеющий".

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

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

Термин "конструкция антитела" относится к молекуле, в которой структура и/или функция основа(ны) на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной или цельной молекулы иммуноглобулина. Таким образом, конструкция антитела способна связываться с ее специфической мишенью

или антигеном. Кроме того, конструкция антитела в соответствии с изобретением содержит минимальные структурные требования к антителу, которые позволяют связывать мишень. Это минимальное требование может, например, определяться наличием по меньшей мере трех CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 участка VL) и/или трех CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 участка VH), предпочтительно из всех шести CDR. Антитела, на которых основаны конструкции в соответствии с изобретением, включают, например, моноклональные, рекомбинантные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные и человеческие антитела.

В определении "конструкций антител" в соответствии с изобретением представлены полноразмерные или целые антитела, включая верблюжьи антитела и другие иммуноглобулиновые антитела, полученные способами или процессами биотехнологической, или белковой инженерии. Эти полноразмерные антитела могут представлять собой, например, моноклональные, рекомбинантные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные и человеческие антитела. Также в определении "конструкций антител" представлены фрагменты полноразмерных антител, таких как VH, VHH, VL, (s) dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F (ab')<sub>2</sub> или "r IgG", ("половинное антитело"). Конструкции антител в соответствии с изобретением также могут представлять собой модифицированные фрагменты антител, также называемые вариантами антител, такими как scFv, di-scFv или bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-молния, scFab, Fab2, Fab3, диатела, одноцепочечные диатела, тандемные диатела (Tandab), тандемные di-scFv, тандемные три-scFv, "мини-антитела", примером которых является структура, которая выглядит следующим образом: (VH-VL-CH3)<sub>2</sub>, (scFv-CH3)<sub>2</sub>, ((scFv)<sub>2</sub>-CH3 + CH3), ((scFv)<sub>2</sub>-CH3) или (scFv-CH3-scFv)<sub>2</sub>, мультитела, такие как триатела или тетратела, и однодоменные антитела, такие как наночастицы или антитела с одним варибельным доменом, содержащие только один варибельный домен, который может представлять собой VHH, VH или VL, которые специфически связывают антиген или эпитоп независимо от других V-участков или доменов.

Кроме того, определение термина "конструкции антитела" включает моновалентные, двухвалентные и поливалентные/многовалентные конструкции и, таким образом, моноспецифические конструкции, специфически связывающиеся только с одной антигенной структурой, а также с биспецифические и полиспецифические/мультиспецифические конструкции, которые специфически связывают более, чем одну антигенную структуру, например, две, три или более, через различные связывающие домены. Более того, определение термина "конструкции антитела" включает молекулы, состоящие только из одной полипептидной цепи, а также молекулы, состоящие из более чем одной полипептидной цепи, причем цепи могут быть либо идентичными (гомодимеры, гомотримеры, или гомогенные олигомеры), либо различными (гетеродимер, гетеротример или гетероолигомер). Примеры указанных выше антител и их вариантов или производных описаны, в частности, в Harlow and Lane, *Antibodies a laboratory manual*, CSHL Press (1988) and *Using Antibodies: a laboratory manual*, CSHL Press (1999), Kontermann and Dübel, *Antibody Engineering*, Springer, 2nd ed. 2010 and Little, *Recombinant Antibodies for Immunotherapy*, Cambridge University Press 2009.

Конструкции антител по данному изобретению предпочтительно представляют собой "конструкции антител, созданные *in vitro*". Данный термин относится к конструкции антитела в соответствии с вышеприведенным определением, в которой весь или часть варибельного участка (например, по меньшей мере, один CDR) генерируется в селекции неиммунных клеток, например, в фаговом дисплее *in vitro*, белковом чипе или любом другой способе, в котором кандидатные последовательности могут быть испытаны на их способность связываться с антигеном. Таким образом, данный термин предпочтительно исключает последовательности, генерируемые исключительно геномной перегруппировкой в иммунной клетке у животного. "Рекомбинантное антитело" представляет собой антитело, полученное с применением технологии рекомбинантной ДНК или генной инженерии.

В данном контексте термин "моноклональные антитела" (mAb) или моноклональная конструкция антитела относится к антителу, полученному из популяции по существу однородных антител, т.е., из популяции, отдельные антитела в которой являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, которые направлены против одного антигенного сайта или детерминанты антигена, в отличие от обычных (поликлональных) антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных детерминант (или эпитопов). Кроме своей специфичности моноклональные антитела обладают тем преимуществом, что они синтезируются культурой гибридомы, следовательно, незагрязненной другими иммуноглобулинами. Модификатор "моноклональное" указывает на то, что антитело получено из практически однородной популяции антител; его не следует интерпретировать как требование о продукции антитела посредством какого-либо конкретного способа.

Для получения моноклональных антител можно использовать любую методику, обеспечивающую антитела, полученные непрерывными культурами клеточных линий. Например, моноклональные антитела, которые следует использовать, могут быть получены с помощью гибридомного метода, впервые описанного Koehler et al., *Nature*, 256: 495 (1975) или могут быть получены методами рекомбинантных ДНК (см, например, патент США № 4816567). Примеры дополнительных способов получения человеческих моноклональных антител включают методику триомы, методику гибридомы В-клеток человека (Kozbor,

Immunology Today 4 (1983), 72) и методику EBV-гибридомы (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96).

Гибридомы затем подвергают скринингу с использованием стандартных методов, таких как иммуноферментный анализ (ИФА) и поверхностный плазмонный резонанс (BIAcore™), для идентификации одной или более гибридом, которые продуцируют антитело, которое специфически связывается с указанным антигеном. В качестве иммуногена можно использовать любую форму соответствующего антигена, например, рекомбинантный антиген, природные формы, любые его варианты или их фрагменты, а также их антигенный пептид. Поверхностный плазмонный резонанс, используемый в системе BIAcore, может быть использован для повышения эффективности фаговых антител, которые связываются с эпитопом целевого антигена, таким как CDH3 или CD3 эпсилон (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13).

Другой типичный способ получения моноклональных антител включает скрининговые библиотеки экспрессии белка, например, фаговый дисплей или библиотеки рибосомного дисплея. Фаговый дисплей описан, например, в Ladner et al., Патент США № 5223409; Smith (1985) Science 228:1315-1317, Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991).

В дополнение к использованию библиотек дисплея соответствующий антиген может быть использован для иммунизации животного, не относящегося к человеку, например, грызуна (такого как мышь, хомяк, кролик или крыса). В одном варианте реализации изобретения животное, не относящееся к человеку, включает по меньшей мере часть гена человеческого иммуноглобулина. Например, можно сконструировать мышинные штаммы, дефицитные в отношении продуцирования мышинных антител, с большими фрагментами локусов Ig человека. Используя гибридную технологию, можно продуцировать и выбирать антигенспецифические моноклональные антитела, полученные из генов с желаемой специфичностью. См., например, XENOMOUSE™, Green et al. (1994) Nature Genetics 7:13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096 и WO 96/33735.

Моноклональное антитело также может быть получено от животного, не являющегося человеком, а затем модифицировано, например, гуманизованное, деиммунизованное, визуализированное химерное и т.д., с использованием методов рекомбинантной ДНК, известных в данной области. Примеры модифицированных конструкций антител включают гуманизованные варианты антител, нечеловеческого происхождения, "антитела с созревшей аффинностью" (см., например, Hawkins et al. J. Mol. Biol. 254, 889-896 (1992) и Lowman et al., Biochemistry 30, 10832- 10837 (1991)) и мутанты антитела с измененной эффекторной функцией(ями) (см., например, патент США № 5648260, Kontermann and Dübel (2010), loc. cit. и Little (2009), loc. cit).

В иммунологии созревание аффинности представляет собой процесс, посредством которого В-клетки продуцируют антитела с повышенным сродством к антигену в течение иммунного ответа. При повторном воздействии на тот же антиген хозяин будет продуцировать антитела с последовательно большей аффинностью. Как и естественный прототип, созревание аффинности *in vitro* основано на принципах мутации и селекции. Созревание аффинности *in vitro* успешно использовалось для оптимизации антител, конструкций антител и фрагментов антител. Случайные мутации внутри CDR вводятся с использованием радиации, химических мутагенов или ПЦР с внесением ошибок. Кроме того, генетическое разнообразие может быть увеличено путем перетасовок цепей. Два или три раунда мутации и выбора с использованием методов дисплея, таких как фаговый дисплей обычно приводит к фрагментам антител с аффинностью в области низких наномолекул.

Предпочтительный тип аминокислотной замещающей варианизации конструкций антител включает замещение одного или более остатков гипервариабельного участка исходного антитела (например, гуманизованного или человеческого антитела). Как правило, полученный вариант(ы), отобранные для дальнейшей модификации, будут иметь улучшенные биологические свойства по отношению к исходному антителу, из которого они получены. Подходящий способ получения таких вариантов, полученных путем замены, включает аффинное созревание при использовании фагового дисплея. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельного участка (например, 6-7 сайтов) подвергают мутагенезу с получением всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Полученные таким образом варианты антитела далее выявляют в моновалентной форме на поверхности частиц нитчатого бактериофага в форме их слияния с продуктом гена III бактериофага M13, упакованного в каждую частицу. Фагодисплейные варианты затем скринируют на их биологическую активность (например, аффинность связывания), как описано в данном документе. Для того чтобы идентифицировать возможные сайты модификации гипервариабельных областей, можно осуществить аланин-сканирующий мутагенез, позволяющий идентифицировать остатки гипервариабельных областей, которые в значительной степени обеспечивают связывание антигена. В альтернативном варианте или дополнительно может оказаться полезным проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для того, чтобы идентифицировать точки контакта между связывающим доменом и, например, CDH3 человека. Такие контактирующие остатки и соседние остатки являются потенциальными мишенями для замены, согласно методам, представленным в данном документе. После создания таких вариантов их подвергают скринингу, как описано в данном документе,

и антитела с улучшенными свойствами, как это устанавливается в одном или более соответствующих исследованиях, отбирают для дальнейшей модификации.

Моноклональные антитела и конструкции антител по данному изобретению конкретно включают "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых участок тяжелой и/или легкой цепи идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям антител, полученных от конкретного вида или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остаток цепи (цепей) идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям антител, полученным от другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител при условии, что они проявляют заданную биологическую активность (Патент США № 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Рассматриваемые в данном документе химерные антитела включают "приматизированные" антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности варибельного домена, происходящие из антитела примата, не являющегося человеком (например, Мартышковых, человекообразных обезьян и т.д.) и последовательности константного участка человека. Описаны различные подходы к созданию химерных антител. См., например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda et al., Nature 314:452, 1985, Cabilly et al., патент США № 4816567; Boss et al., патент США № 4816397; Tanaguchi et al., EP 0171496; EP 0173494 и GB 2177096.

Антитело, конструкция антитела или фрагмент антитела также могут быть модифицированы путем специфической делеции эпитопов Т-клеток человека (метод, называемый "деиммунизация") способами, описанными, например, в WO 98/52976 или WO 00/34317. Вкратце, варибельные участки тяжелой и легкой цепей антитела могут быть проанализированы на пептиды, которые связываются с ГКГС (главный комплекс гистосовместимости) класса II; эти пептиды представляют собой потенциальные Т-клеточные эпитопы (как определено в WO 98/52976 и WO 00/34317). Для обнаружения потенциальных Т-клеточных эпитопов может быть применен компьютерный подход моделирования, названный "peptide threading", и, кроме того база данных связующих пептидов МНС класса II человека может быть исследована на наличие мотивов, присутствующих в VH и VL последовательностях, как описано в WO 98/52976 и WO 00/34317. Эти мотивы связываются с любым из 18 основных DR аллотипов МНС класса II, и, таким образом, составляют потенциальные Т-клеточные эпитопы. Обнаруженные потенциальные Т-клеточные эпитопы могут быть исключены путем замены небольшого числа аминокислотных остатков в варибельных доменах, или предпочтительно, одиночными аминокислотными заменами. Обычно, выполняются консервативные замены. Часто, но не исключительно, можно использовать аминокислоту, общую для положения в последовательностях антител зародышевой линии человека. Последовательности зародышевой линии человека раскрыты, например, в Tomlinson, et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G.P et al. (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242 и Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14: 14:4628-4638. Каталог V BASE представляет собой полный каталог последовательностей варибельных участков иммуноглобулина человека (составленный Tomlinson LA и др. Центр модификаций белков MRC, Кембридж, Великобритания). Эти последовательности могут быть использованы в качестве источника последовательности человека, например, для каркасных областей и CDR. Консенсусные каркасные участки человека также могут быть использованы, например, как описано в патенте США № 6300064.

"Гуманизированные" антитела, конструкции антител или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител) представляют собой антитела или иммуноглобулины, в основном последовательности людей, которые содержат (а) минимальные последовательность(и), полученная из иммуноглобулина, отличного от человеческого. В большинстве случаев гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиента), в которых остатки из гиперварибельного участка (также CDR) реципиента замещены остатками из гиперварибельного участка (антитело-донор) видов, отличных от человека (например, грызунов), таких как, мышь, крыса, хомяк или кролик, обладающих желаемой специфичностью, сродством и эффективностью. В некоторых случаях остатки каркасного участка Fv (FR) иммуноглобулина человека замещают соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, "гуманизированные антитела", используемые в данном документе, могут также содержать остатки, которые не обнаружены ни в антителе-реципиенте, ни в антителе-доноре. Эти модификации вносят для дальнейшей очистки и оптимизации функционирования антител. Гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере фрагмент константного участка иммуноглобулина (Fc), обычно происходящий из иммуноглобулина человека. Дополнительную информацию см. в публикациях Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988) и Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

Гуманизированные антитела или их фрагменты могут быть получены путем замены последовательностей варибельного домена Fv, которые непосредственно не связаны с связыванием антигена с эквивалентными последовательностями из варибельных доменов Fv человека. Типичные способы получения гуманизированных антител или их фрагментов представлены Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214 и в US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 5859205 и US 6407213. Эти способы включают выделение, манипулирование и экспрессию последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют все или часть варибельных участков Fv иммуноглобулина по меньшей мере из одной тяжелой или легкой цепи. Такие нуклеиновые кислоты могут быть получены из гибридомы, про-

дуцирующей антитело против заданной мишени, как описано выше, а также из других источников. Рекомбинантную ДНК, кодирующую гуманизованное антитело, можно затем клонировать в соответствующий вектор экспрессии.

Гуманизированные антитела также могут быть получены с использованием трансгенных животных, таких как мыши, которые экспрессируют гены тяжелой и легкой цепи человека, но неспособны экспрессировать эндогенные гены тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина мыши. Winter описывает типовой способ пересадки CDR, который может быть использован для приготовления гуманизированных антител, описанных в данном документе (патент США № 5225539). Все CDR конкретного антитела человека могут быть заменены, по меньшей мере, частью нечеловеческого CDR, или только некоторые из CDR могут быть заменены CDR, отличными от человека. Необходимо только заменить количество CDR, необходимых для связывания гуманизованного антитела с заданным антигеном.

Гуманизованное антитело может быть оптимизировано путем введения консервативных замещений, замещений консенсусной последовательности, замещений зародышевой линии и/или обратных мутаций. Такие измененные молекулы иммуноглобулина могут быть получены любым из нескольких методов, известных в данной области техники (например, Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor et al., Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson et al., Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982 и EP 239400).

Термин "человеческое антитело", "конструкция человеческого антитела" и "связывающий домен человека" включает антитела, конструкции антител и связывающие домены, имеющие участки антител, такие как переменные и константные участки или домены, которые по существу соответствуют последовательностям иммуноглобулина зародышевой линии человека, известным в данной области, включая, например, те, которые описаны Kabat et al. (1991) (loc. cit). Человеческие антитела, конструкции антител или связывающие домены согласно изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, введенные методом случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Человеческие антитела, конструкции антител или связывающие домены могут иметь по меньшей мере одно, два, три, четыре, пять или более положений, замещенных аминокислотным остатком, который не кодируется последовательностью иммуноглобулина зародышевой линии человека. Определение человеческих антител, конструкций антител и связывающих доменов, используемое в данном документе, также рассматривает полностью человеческие антитела, которые содержат только не искусственно и/или генетически измененные последовательности человеческих антител, поскольку они могут быть получены с использованием технологий или систем, таких как Xenomouse.

В некоторых вариантах реализации изобретения конструкция антитела по изобретению представляют собой "изолированные" или "по существу чистые" конструкции антител. "Изолированный" или "по существу чистый" при использовании для описания конструкции антитела, раскрытой в данном документе, означает конструкцию антитела, которая была идентифицирована, отделена и/или выделена из компонента его производственной среды. Предпочтительно конструкция антитела является свободной или практически не связана со всеми другими компонентами из ее производственной среды. Загрязняющие компоненты из его природно-окружающей среды такие как те, которые получены из рекомбинантных трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые могут отрицательно влиять на диагностическое или терапевтическое применения полипептида, и могут включать в себя ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворимые вещества. Конструкции антител могут составлять, например, по меньшей мере около 5% или по меньшей мере около 50% от общей массы белка в данном образце. Понятно, что выделенный белок может составлять от 5 до 99,9 мас.% от общего содержания белка в зависимости от обстоятельств. Полипептид может быть получен в значительно более высокой концентрации за счет использования индуцибельного промотора или высокоэкспрессирующего промотора, так что он продуцируется в повышенных концентрациях. Определение включает в себя получение конструкции антитела в самых разных организмах и/или клетках-хозяевах, которые известны в данной области техники. В предпочтительных вариантах реализации изобретения конструкция антитела будет очищено (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков на N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности путем использования секвенатора с вращающейся чашкой или (2) до гомогенности, полученной методом ДСН-ПААГ электрофореза в невозстанавливающих или восстанавливающих условиях, используя Кумасси синий или, предпочтительно, окрашивание серебром. При этом, как правило, выделенную конструкцию антитела получают с использованием по меньшей мере одного этапа очистки.

Термин "связывающий домен" характеризует в связи с настоящим изобретением домен, который (в частности) связывается с/взаимодействует с/распознает данный целевой эпитоп или данный целевой сайт на молекулах-мишенях (антигенах) CDH3 и CD3 соответственно. Структура и функция первого связывающего домена (распознающего CDH3) и предпочтительно также структура и/или функция второго связывающего домена (CD3) являются/основаны на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной или цельной молекулы иммуноглобулина. Согласно изобретению первый связывающий

домен характеризуется наличием трех CDR легкой цепи (то есть, CDR1, CDR2 и CDR3 участка VL) и трех CDR тяжелой цепи (то есть CDR1, CDR2 и CDR3 участка VH). Второй связывающий домен предпочтительно также содержит минимальные структурные требования к антителу, которые позволяют связывать мишень. Более предпочтительно, второй связывающий домен содержит по меньшей мере три CDR легкой цепи (то есть CDR1, CDR2 и CDR3 участка VL) и/или три CDR тяжелой цепи (то есть CDR1, CDR2 и CDR3 участка VH). Предполагается, что первый и/или второй связывающий домен получают или получают с помощью методов скрининга фагового дисплея или библиотеки, а не путем замены CDR-последовательностей из ранее существовавшего (моноклонального) антитела в каркас.

В соответствии с настоящим изобретением связывающие домены предпочтительно находятся в форме полипептидов. Такие полипептиды могут включать белковые части и небелковые части (например, химические линкеры или химические сшивающие агенты, такие как глутаровый альдегид). Белки (включая их фрагменты, предпочтительно биологически активные фрагменты и пептиды, обычно имеющие менее 30 аминокислот) содержат две или более аминокислот, связанных друг с другом посредством ковалентной пептидной связи (с образованием аминокислотной цепи). Используемый в данном документе термин "полипептид" описывает группу молекул, которые обычно состоят из более чем 30 аминокислот. Полипептиды могут дополнительно образовывать мультимеры, такие как димеры, тримеры и высшие олигомеры, то есть состоящие из более чем одной молекулы полипептида. Молекулы полипептидов, образующие такие димеры, тримеры и т.д., могут быть идентичными или неидентичными. Соответствующие структуры более высокого порядка таких мультимеров, следовательно, называются гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и т.д. Примером для данного гетероцикла является молекула антитела, которая в своей естественной форме состоит из двух идентичных легких полипептидных цепей и двух идентичных тяжелых полипептидных цепей. Термины "пептид", "полипептид" и "белок" также относятся к естественно модифицированным пептидам/полипептидам/белкам, в которых модификация осуществляется, например, путем посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и тому подобное. "Пептид", "полипептид" или "белок", упоминаемый в данном документе, также могут быть химически модифицированными, такими как пегилированные. Такие модификации хорошо известны в данной области техники и описаны ниже.

Как упоминалось выше, связывающий домен может обычно содержать вариабельный участок легкой цепи антитела (VL) и вариабельный участок тяжелой цепи антитела (VH) однако он не должен содержать оба. Fd-фрагменты, например, имеют два участка VH и часто сохраняют некоторую антигенсвязывающую функцию интактного антигенсвязывающего домена. Примеры (модифицированных) антигенсвязывающих фрагментов антитела включают (1) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, имеющий VL, VH, CL и CH1-домены; (2) фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, двухвалентный фрагмент, имеющий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (3) фрагмент Fd, имеющий два домена VH и CH1; (4) фрагмент Fv, имеющий домены VL и VH одного плеча антитела, (5) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), который имеет домен VH; (6) изолированный участок определения комплементарности (CDR) и (7) одноцепочечный Fv (scFv), причем последний является предпочтительным (например, полученный из scFV-библиотеки). Примерами вариантов реализации конструкций антител в соответствии с изобретением являются, например, описанные в WO 00/006605, WO 2005/040220, WO 2008/119567, WO 2010/037838, WO 2013/026837, WO 2013/026833, US 2014/0308285, US 2014/0302037, WO 2014/144722, WO 2014/151910 и WO 2015/048272.

Предпочтительно связывающий домен, который связывается с CDH3 и/или связывающим домен, который связывается с CD3, является/являются связывающими доменами человека. Антитела и конструкции антител, содержащие по меньшей мере один связывающий домен человека, позволяют избежать некоторых проблем, связанных с антителами или конструкциями антител, которые обладают вариабельными и/или константными участками, полученными не от человека, такими как участки грызунов (например, мыши, крысы, хомяка или кролика). Наличие таких белков, полученных от грызунов, может приводить к быстрому клиренсу антител или конструкций антител, или может приводить к возникновению иммунного ответа против антитела или конструкции антитела пациентом. Чтобы избежать использования антител или конструкций антител, происходящих от грызунов, можно получить полностью человеческие антитела или конструкции антител путем введения функции человеческого антитела в организм грызуна таким образом, чтобы грызун продуцировал полностью человеческие антитела.

Способность клонировать и восстанавливать человеческие локусы размером в тысячи оснований (мегабаз) в YAC и вводить их в зародышевую линию мыши обеспечивает мощный подход к выяснению функциональных компонентов очень больших или грубо картируемых локусов, а также создание полезных моделей заболеваний человека. Кроме того, использование такой технологии для замещения локусов мыши их человеческими эквивалентами может обеспечить уникальное понимание экспрессии и регуляции генных продуктов человека во время развития, их связь с другими системами и их участие в индукции и прогрессировании болезни.

Важным практическим применением такой стратегии является "гуманизация" гуморальной иммунной системы мыши. Введение локусов иммуноглобулина человека (Ig) мышам, у которых инактивированы эндогенные гены Ig, дает возможность изучить механизмы, лежащие в основе запрограммированной

экспрессии и сборки антител, а также их роль в развитии В-клеток. Более того, такая стратегия могла бы стать идеальным источником для производства полностью человеческих моноклональных антител (mAbs) - важной вехой в достижении перспективной терапии антителом при заболеваниях человека. Ожидается, что полностью человеческие антитела или конструкции антител минимизируют иммуногенные и аллергические реакции, присущие моноклональным антителам мыши или полученным от мыши и, таким образом, для повышения эффективности и безопасности вводимых антител/конструкций антител. Можно ожидать, что использование полностью человеческих антител или конструкций антител станет существенным преимуществом при лечении хронических и рецидивирующих заболеваний человека, таких как воспаление, аутоиммунные заболевания и рак, которые требуют повторных сложных введений.

Один из подходов к данной цели заключался в том, чтобы сконструировать мышинные штаммы, дефицитные в отношении продуцирования антител мыши, с большими фрагментами локусов Ig человека в ожидании того, что такие мыши будут продуцировать большой репертуар антител человека в отсутствие мышинных антител. Большие фрагменты Ig человека сохраняют большое разнообразие вариабельных генов, а также правильную регуляцию продуцирования и экспрессии антител. Путем использования мышинового механизма для диверсификации и селекции антител и устранения иммунологической толерантности к человеческим белкам репродуцированный репертуар антител человека в этих штаммах мыши должен давать антитела с высоким сродством к любому интересующему антигену, включая антигены человека. Используя гибридную технологию, антигенспецифичные человеческие mAb с желаемой специфичностью могут быть легко получены и отобраны. Эта общая стратегия была продемонстрирована в связи с получением первых штаммов мышей XenoMouse (см. Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)). Штаммы XenoMouse были сконструированы с помощью искусственных хромосом дрожжей (YAC), содержащих фрагменты конфигурации зародышевой линии размером 245 кб и 190 кб в локусе тяжелой цепи человека и локусе легкой цепи каппа, соответственно, который содержал последовательности вариабельного и константного участков Ig человека, содержащий YAC, оказался совместимым с системой мыши как для перегруппировки, так и для экспрессии антител и был способен заменять инактивированные гены Ig мыши. Это было продемонстрировано их способностью индуцировать развитие В-клеток, продуцировать подобный взрослому человеческий репертуар полностью человеческих антител и генерировать антиген-специфические mAb человека. Эти результаты также предполагали, что введение больших порций локусов Ig человека, содержащих большее количество V-генов, дополнительных регуляторных элементов и константных областей Ig человека, может в значительной степени воспроизвести полный репертуар, характерный для гуморального ответа человека на инфекцию и иммунизацию. Работа Green и др. недавно была расширена в отношении введения более чем примерно 80% репертуара человеческих антител за счет введения фрагментов YAC мегабазного размера с конфигурацией зародышевой линии локусов тяжелой цепи человека и локусов легкой цепи каппа соответственно. См. Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) и патентную заявку США № 08/759620.

Получение мышей XenoMouse далее обсуждается и охарактеризовано в патентных заявках США №№ 07/466008, 07/610515, 07/919297, 07/922649, 08/031801, 08/112848, 08/234145, 08/376279, 08/430938, 08/464584, 08/464582, 08/463191, 08/462837, 08/486853, 08/486857, 08/486859, 08/462513, 08/724752 и 08/759620 и патентах США №№ 6162963; 6150584; 6114598; 6075181 и 5939598 и патентах Японии № 3068180 B2, 3068506 B2 и 3068507 B2. См. также Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) и Green and Jakobovits J. *Exp. Med.* 188:483-495 (1998), EP 0463151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 и WO 03/47336.

В альтернативном подходе другие, включая GenPharm International, Inc., использовали подход "мини-локус". В мини-локусном подходе экзогенный локус Ig имитируется путем включения кусочков (отдельных генов) из локуса Ig. Таким образом, один или более генов VH, один или более генов DH, один или более генов JH, константная область mu и вторая константная область (предпочтительно константная область gamma) объединяются в конструкцию для введения животному. Этот подход описан в патенте США № 5545807 Surani et al. и патентах США №№ 5545806; 5625825; 5625126; 5633425; 5661016; 5770429; 5789650; 5814318; 5877397; 5874299 и 6255458 каждый Lonberg и Kay, патенты США № 5591669 и 6023010 Krimpenfort и Berns, патенты США № 5612205; 5721367 и 5789215 Berns et al., и патент США № 5643763 Choi и Dunn, и GenPharm International заявка на патент США №№ 07/574748, 07/575962, 07/810279, 07/853408, 07/904068, 07/990860, 08/053131, 08/096762, 08/155301, 08/161739, 08/165699, 08/209741. См. также EP 0546073 B1, WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 и WO 98/24884, и патент США № 5981175. См. также Taylor et al. (1992), Chen et al. (1993), Tuailon et al. (1993), Choi et al. (1993), Lonberg et al. (1994), Taylor et al. (1994) и Tuailon et al. (1995), Fishwild et al. (1996).

Kigin также продемонстрировал образование человеческих антител у мышей, у которых посредством слияния микроклеток были введены большие фрагменты хромосом или целые хромосомы. См. европейские патентные заявки № 773288 и 843961. Xenetex Biosciences разрабатывают технологию для потенциального создания антител человека. В этой технологии мышей SCID восстанавливают лимфатическими клетками человека, например, В-и/или Т-клетками. Мышей затем иммунизируют антигеном и могут вызывать иммунный ответ против антигена. См. патент США №№ 5476996; 5698767 и 5958765.

Реакции человеческого антимышиного антитела (НАМА) привели к тому, что промышленность готовила химерные или иначе гуманизированные антитела. Тем не менее, ожидается, что некоторые человеческие ответы против химерного антитела (НАСА) будут наблюдаться, особенно при использовании хронического или многодозового использования антитела. Таким образом, было бы желательно предоставить конструкции антител, содержащие полностью человеческий связывающий домен против CDH3 и полностью человеческий связывающий домен против CD3, чтобы усилить последствия и/или ответы НАМА или НАСА.

Термины "(специфически) связывается с", "(специфически) распознает", "(специфически) направленный на" и "(специфически) реагирует с" означает в соответствии с настоящим изобретением, что связывающий домен взаимодействует или специфически взаимодействует с одним или более предпочтительно, по меньшей мере, двумя, более предпочтительно по меньшей мере тремя и наиболее предпочтительно по меньшей мере четырьмя аминокислотами эпитопа, расположенного на целевом белке или антигене (CDH3/CD3). Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым специфически связывается связывающий домен, такой как антитело или иммуноглобулин, или производное или фрагмент антитела, или иммуноглобулина. "Эпитоп" является антигенным, и поэтому термин эпитоп иногда также упоминается в данном документе как "антигенная структура" или "антигенная детерминанта". Таким образом, домен связывания представляет собой "сайт взаимодействия антигена". Указанное связывание/взаимодействие также понимается как "специфическое распознавание".

"Эпитопы" могут быть образованы как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, которые сближаются в результате свертывания белка в третичную структуру. "Линейный эпитоп" представляет собой эпитоп, в котором первичная аминокислотная последовательность содержит распознанный эпитоп. Линейный эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 и более обычно по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 или по меньшей мере 7, например, от 8 до 10 аминокислот в уникальной последовательности, а также может быть более длинным и содержать по меньшей мере 15 или 20 аминокислот, по меньшей мере 25 или 30 аминокислот или даже более.

"Конформационный эпитоп", в отличие от линейного эпитопа, представляет собой эпитоп, в котором первичная аминокислотная последовательность, содержащая эпитоп, не является единственным определяющим компонентом распознаваемого эпитопа (например, эпитоп, в котором первичная аминокислотная последовательность не обязательно распознается связывающим доменом). Обычно конформационный эпитоп содержит увеличенное количество аминокислот относительно линейного эпитопа. Что касается распознавания конформационных эпитопов, то связывающий домен распознает трехмерную структуру антигена, предпочтительно пептида или белка, или его фрагмента (в контексте данного изобретения антиген для одного из связывающих доменов находится в пределах CDH3). Например, когда молекула белка укладывается для образования трехмерной структуры, некоторые аминокислоты и/или полипептидный скелет, образующие конформационный эпитоп, становятся сопоставимыми, позволяя антителу распознавать эпитоп. Методы определения конформации эпитопов включают, но не ограничиваются ими, рентгеноструктурную кристаллографию, двумерную спектроскопию ядерного магнитного резонанса (2D-ЯМР) и сайт-направленную спиновое мечение и электронно-парамагнитный резонанс (ЭПР)-спектроскопию.

Приведенные примеры описывают еще один способ для характеристики данного связывающего домена, который включает проверку, связывается ли данный связывающий домен с одним или более эпитопом(ами) данного белка, в частности CDH3.

Используемый в данном документе термин "эпитопный кластер" обозначает эпитопы, лежащие в определенном смежном участке антигена. Эпитопный кластер может содержать один, два или более эпитопа. Конструкция антитела может также связываться с эпитопом внутри эпитопного кластера и в дополнение с другим эпитопом вне этого кластера, который затем может соответствовать прерывистому эпитопу. Прерывистый эпитоп обычно характеризуется тем, что он охватывает аминокислотные отрезки антигена, которые не являются смежными. Например, конструкция антитела может связываться с внеклеточными субдоменами D3A и D3C, но не с D3B. Понятие "кластеризация эпитопов" также используется в характеристике особенностей конструкций антител по изобретению. Эпитопные кластеры и эпитопы, которые были определены в контексте данного изобретения, во внеклеточном домене CDH3 описаны выше и показаны на фиг. 1.

Когда внеклеточный домен (D1-D5) или его субдомен (A, B, C) в белке CDH3 человека заменяют соответствующим внеклеточным доменом (D1-D5) или субдоменом (A, B, C) его антигена CDH3 человека (например, цыпленка или мыши) (в результате получается конструкция, содержащая человеческий CDH3, в котором один внеклеточный домен человека или его субдомен заменен его другим внеклеточным доменом или его субдоменом, полученными не от человека), произойдет снижение связывания связывающего домена. Указанное снижение предпочтительно составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50%, более предпочтительно по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 95 или даже 100% по сравнению с соответствующим эпитопным кластером в белке CDH3 человека, причем связывание с соответствующим внеклеточным доменом (D1-D5) или его субдоменом в белке CDH3 человека устанавливается равным 100%. Предполагается, что вышеупомянутые химеры CDH3/ нечеловеческий CDH3 экспрессируются в клетках

СНО. Также предполагается, что химерные человеческий CDH3/нечеловеческий CDH3 слиты с транс-мембранным доменом и/или цитоплазматическим доменом другого связанного с мембраной белка, такого как ЕрСАМ.

Способ проверки этой потери связывания за счет обмена с соответствующим внеклеточным доменом (D1-D5) или его субдоменом нечеловеческого (например, мыши, но также можно предположить и другие, такие как крысы, хомяка, кролика, курицы и т.д.) CDH3-антигена описан в примере 2. Еще один способ определения вклада конкретного остатка целевого антигена в распознавание с помощью конструкции антитела или связывающего домена представляет собой сканирование аланина (см., например, Morrison KL & Weiss GA. *Cur Opin Chem Biol.* 2001 Jun;5(3):302-7), в котором каждый остаток, подлежащий анализу, заменяется аланином, т.е. через сайт-направленный мутагенез. Аланин используется из-за его небольшого объема, химически инертной, функционально-функциональной группы, которая тем не менее имитирует признаки вторичной структуры, которыми обладают многие другие аминокислоты. Иногда крупные аминокислоты, такие как валин или лейцин, могут быть использованы в тех случаях, когда желательно сохранение размера мутированных остатков. Аланиновое сканирование представляет собой не новую технологию, которая используется в течение длительного периода времени.

Взаимодействие между связывающим доменом и эпитопом или эпитопным кластером подразумевает, что связывающий домен проявляет заметное сродство к эпитопу или эпитопному кластеру на конкретном белке или антигене (в данном случае: CDH3 и CD3 соответственно) и, как правило, не обладает значительной реакционной способностью с белками или антигенами, отличными от CDH3 или CD3. "Заметное сродство" включает связывание с аффинностью около  $10^{-6}$  М (KD) или более сильной. Предпочтительно связывание считается специфическим, когда сродство связывания составляет от  $10^{-12}$  до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-12}$  до  $10^{-9}$  М, от  $10^{-12}$  до  $10^{-10}$  М, от  $10^{-11}$  до  $10^{-8}$  М, предпочтительно от  $10^{-11}$  до  $10^{-9}$  М. Независимо от того, специфично ли связывающий домен специфически реагирует с мишенью или связывается с ним, можно, в частности, сравнить реакцию указанного связывающего домена с белком-мишенью или антигеном с реакцией указанного связывающего домена с белками или антигенами, отличными от CDH3 или CD3. Предпочтительно связывающий домен по изобретению по существу или по существу не связывается с белками или антигенами, отличными от CDH3 или CD3 (т.е. первый связывающий домен не способен связываться с белками, отличными от CDH3, а второй связывающий домен не способен связываться с белками, отличными от CD3).

Термин "существенно не связывается" или "не способен связываться" означает, что связывающий домен по данному изобретению не связывает белок или антиген, отличный от CDH3 или CD3, то есть не демонстрирует реакционную способность более 30%, предпочтительно не более 20%, более предпочтительно не более 10%, особенно предпочтительно не более 9, 8, 7, 6 или 5% с белками или антигенами, отличными от CDH3 или CD3, причем связывание с CDH3 или CD3, соответственно, установлено на 100%.

Считается, что специфическое связывание осуществляется конкретными мотивами в аминокислотной последовательности связывающего домена и антигена. Таким образом, связывание достигается в результате их первичной, вторичной и/или третичной структуры, а также в результате вторичных модификаций указанных структур. Специфическое взаимодействие сайта взаимодействия антигена с его специфическим антигеном может привести к простому связыванию указанного сайта с антигеном. Более того, специфическое взаимодействие сайта взаимодействия антигена с его специфическим антигеном может альтернативно или дополнительно приводить к иницированию сигнала, например, из-за индукции изменения конформации антигена, олигомеризации антигена и т. д.

В другом аспекте в данном изобретении предложена конструкция биспецифического антитела, содержащая первый (предпочтительно человеческий) связывающий домен, который связывается с CDH3 человека на поверхности клетки-мишени и второй (предпочтительно человеческий) связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, причем первый связывающий домен содержит участок VH, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 и участок VL, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из:

а) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 149, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 150, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 151, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 152, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 153, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 154;

б) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 159, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 160, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 161, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 162, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 163, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 164;

в) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 169, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 170, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 171, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 172, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 173, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 174;

г) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 179, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 180, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 181, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 182, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 183, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 184;

е) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 189, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 190, CDR-H3, как

показано в SEQ ID NO: 191, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 192, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 193, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 194;

f) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 199, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 200, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 201, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 202, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 203, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 204;

g) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 209, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 210, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 211, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 212, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 213, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 214;

h) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 219, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 220, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 221, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 222, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 223, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 224;

i) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 229, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 230, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 231, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 232, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 233, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 234; и

j) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 239, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 240, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 241, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 242, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 243, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 244.

В другом аспекте в данном изобретении предложена конструкция биспецифического антитела, содержащая первый (предпочтительно человеческий) связывающий домен, который связывается с CDH3 человека на поверхности клетки-мишени и второй (предпочтительно человеческий) связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, причем первый связывающий домен содержит участок VH, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 и участок VL, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из:

a) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 279, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 280, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 281, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 282, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 283, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 284;

b) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 289, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 290, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 291, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 292, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 293, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 294;

c) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 299, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 300, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 301, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 302, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 303 и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 304;

d) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 309, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 310, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 311, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 312, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 313, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 314;

e) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 319, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 320, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 321, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 322, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 323, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 324;

f) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 329, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 330, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 331, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 332, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 333, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 334;

g) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 339, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 340, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 341, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 342, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 343, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 344; и

h) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 349, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 350, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 351, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 352, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 353, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 354.

Термин "вариабельный" относится к частям антител или доменов иммуноглобулина, которые проявляют изменчивость в их последовательности и которые участвуют в определении специфичности и аффинности связывания конкретного антитела (то есть "вариабельного домена(ов)"). Спаривание вариабельной тяжелой цепи (VH) и вариабельной легкой цепи (VL) вместе образует один антигенсвязывающий сайт. Домен CH, наиболее близкий к VH, обозначается как CH1. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или более дисульфидными связями в зависимости от изотипа H-цепи.

Вариабельность распределяется неравномерно по всем вариабельным доменам антител; он сосредоточен в субдоменах каждой из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Эти субдомены называются "гипервариабельными участками" или "участками, определяющими комплементарность" (CDR). Более консервативные (то есть, не гипервариабельные) части вариабельных доменов называются "каркасными" участками (FRM или FR), они обеспечивают основу для шести CDR в трехмерном пространстве для образования антигенсвязывающей поверхности. Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре участка FRM (FR1, FR2, FR3 и FR4), преимущественно принимающих конфигурацию бета-листа, соединенных тремя гипервариабельными участками, которые обра-

зуют петли, соединяющие структуру бета-листа, а в некоторых случаях - образующие часть структуры бета-листа. Гипервариабельными участки каждой цепи объединены друг с другом в непосредственной близости с помощью FRM и, вместе с гипервариабельными участками другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта (см. Kabat et al., loc. cit). Константные домены непосредственно не вовлечены в связывание антигена, но проявляют различные эффекторные функции, такие как, например, зависимость от антител, клеточно-опосредованная цитотоксичность и активация комплемента.

Термины "CDR" и его множественные "CDR" относятся к области определения комплементарности, из которых три составляют связывающий характер вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3) и три составляющие связывающий характер вариабельного участка тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3). CDR содержат большую часть остатков, ответственных за специфические взаимодействия антитела с антигеном и, следовательно, способствуют функциональной активности молекулы антитела: они являются основными детерминантами антигенной специфичности.

Конкретные границы и длины CDR определяются в разных системах классификации и нумерации. Поэтому CDR могут ссылаться на Kabat, Chothia, контакт или любые другие определения границ, включая описанную в данном документе систему нумерации. Несмотря на разные границы, каждая из этих систем имеет некоторую степень перекрытия в том, что составляет так называемые "гипервариабельные области" в переменных последовательностях. Таким образом, определения CDR в соответствии с этими системами могут различаться по длине и граничным областям относительно смежной каркасной области. См., например, Kabat (подход, основанный на межвидовой изменчивости последовательности), Chothia (подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело) и/или MacCallum (Kabat et al., loc. cit.; Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901-917; и MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 1996, 262: 732). Еще одним стандартом для характеристики сайта связывания антигена является определение AbM, используемое программным обеспечением AbM Oxford Molecular для моделирования антител. См., например, *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. E: Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). В той мере, в которой два метода идентификации остатков определяют участки перекрывающихся, но не идентичных участков, их можно объединить для определения гибридного CDR. Однако нумерация в соответствии с так называемой системой Kabat является предпочтительной.

Как правило, CDR образуют петлевую структуру, которая может быть классифицирована как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к конформации основной цепи, которая принимается петлями связывания антигена (CDR). Из сравнительных структурных исследований было установлено, что пять из шести антигенсвязывающих петель имеют только ограниченный репертуар доступных конформаций. Каждая каноническая структура может быть охарактеризована углами кручения полипептидной скелета. Таким образом, корреляционные петли между антителами могут иметь очень похожие трехмерные структуры, несмотря на высокую вариабельность аминокислотной последовательности в большинстве частей петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 1987, 196: 901; Chothia et al., *Nature*, 1989, 342: 877; Martin and Thornton, *J. Mol. Biol.*, 1996, 263: 800). Кроме того, существует взаимосвязь между адаптированной структурой петли и ее аминокислотными последовательностями. Конформация конкретного канонического класса определяется длиной петли и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях внутри петли, а также в пределах консервативной структуры (то есть, вне петли). Таким образом, назначение конкретного канонического класса может быть основано на наличии этих ключевых аминокислотных остатков.

Термин "каноническая структура" может также включать соображения относительно линейной последовательности антитела, например, как каталогизировано в Kabat (Kabat et al., loc. lit.). Схема (система) нумерации Kabat является широко принятым стандартом для нумерации аминокислотных остатков вариабельного домена антитела согласованным образом и является предпочтительной схемой, применяемой в данном изобретении, как также упоминалось в другом месте в данном документе. Дополнительные структурные соображения также могут быть использованы для определения канонической структуры антитела. Например, эти различия, не полностью отраженные нумерацией Kabat, могут быть описаны системой нумерации Chothia et al. и/или выявлены другими методами, например, кристаллографией и двух- или трехмерным вычислительным моделированием. Соответственно, данная последовательность антител может быть помещена в канонический класс, который позволяет, среди прочего, идентифицировать соответствующие последовательности шасси (например, исходя из желания включить в библиотеку множество канонических структур). Kabat-нумерацию аминокислотных последовательностей антител и структурные соображения, как описано Chothia et al., loc. cit. и их последствия для толкования канонических аспектов структуры антител описаны в литературе. Хорошо известны в данной области техники субъединичная структура и трехмерная конфигурация различных классов иммуноглобулинов. Для обзора структуры антител см. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988.

CDR3 легкой цепи и, в особенности, CDR3 тяжелой цепи могут формировать наиболее важные антигенсвязывающие детерминанты в границах вариабельных областей легкой и тяжелой цепи. В некоторых конструкциях антител CDR3 тяжелой цепи составляет основную площадь контакта между антиге-

ном и антителом. Схемы *in vitro* отбора, в которых варьируется только CDR3, можно использовать, чтобы варьировать связывающие свойства антитела или определить, какие остатки вносят вклад в связывание антигена. Следовательно, CDR3, как правило, является самым большим источником молекулярного разнообразия в сайте, связывающем антитело. H3, например, может быть короче, чем два аминокислотных остатка или иметь более 26 аминокислот.

Последовательность генов антител после сборки и соматической мутации сильно варьирует, и эти разнообразные гены, по оценкам, кодируют 10 различных молекул антител (Immunoglobulin Genes, 2<sup>nd</sup> ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995). Соответственно, иммунная система обеспечивает репертуар иммуноглобулинов. Термин "репертуар" относится по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, полученной полностью или частично из по меньшей мере одной последовательности, кодирующей по меньшей мере один иммуноглобулин. Последовательность(и) может быть сгенерирована путем перегруппировки *in vivo* V, D и J сегментов тяжелых цепей и V и J сегментов легких цепей. Альтернативно последовательность(и) может быть получена из клетки, в ответ на которую происходит перегруппировка, например, стимуляция *in vitro*. Альтернативно, часть или вся последовательность(и) могут быть получены путем сплайсинга ДНК, синтеза нуклеотидов, мутагенеза и других способов, см., например, патент США № 5565332. Репертуар может включать только одну последовательность или может включать множество последовательностей, в том числе в генетически разнообразной коллекции.

В одном варианте реализации изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит участок VH, выбранный из группы, состоящей из участков VH, как показано в SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 235 и SEQ ID NO: 245.

В еще одном варианте реализации конструкции антитела по изобретению первый связывающий домен содержит участок VL, выбранный из группы, состоящей из участков VL, как показано в SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 236 и SEQ ID NO: 246.

В другом варианте реализации конструкции антитела по изобретению первый связывающий домен содержит участок VH и участок VL, выбранные из группы, состоящей из пар участка VH и участка VL, как показано в SEQ ID NO: 155+156, SEQ ID NO: 165+166, SEQ ID NO: 175+176, SEQ ID NO: 185+186, SEQ ID NO: 195+196, SEQ ID NO: 205+206, SEQ ID NO: 215+216, SEQ ID NO: 225+226, SEQ ID NO: 235+236 и SEQ ID NO: 245+246.

В другом варианте реализации изобретения первый связывающий домен конструкции антитела по изобретению содержит участок VH, выбранный из группы, состоящей из участков VH, как показано в SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 305, SEQ ID NO: 315, SEQ ID NO: 325, SEQ ID NO: 335, SEQ ID NO: 345 и SEQ ID NO: 355.

В еще одном варианте реализации конструкции антитела по изобретению первый связывающий домен содержит участок VL, выбранный из группы, состоящей из участков VL, как показано в SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 306, SEQ ID NO: 316, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 336, SEQ ID NO: 346 и SEQ ID NO: 356.

В другом варианте реализации конструкции антитела по изобретению первый связывающий домен содержит участок VH и участок VL, выбранные из группы, состоящей из пар участка VH и участка VL, как показано в SEQ ID NO: 285+286, SEQ ID NO: 295+296, SEQ ID NO: 305+306, SEQ ID NO: 315+316, SEQ ID NO: 325+326, SEQ ID NO: 335+336, SEQ ID NO: 345+346 и SEQ ID NO: 355+356.

Используемый в данном документе термин "биспецифический" относится к конструкции антитела, которая является "по меньшей мере биспецифической", то есть она содержит по меньшей мере первый связывающий домен и второй связывающий домен, причем первый связывающий домен связывается с одним антигеном или мишенью (в данном описании: CDH3), а второй связывающий домен связывается с другим антигеном или мишенью (в данном документе: CD3). Соответственно конструкции антител по изобретению содержат специфичности по меньшей мере для двух разных антигенов или мишеней. Термин "конструкция биспецифического антитела" по изобретению также охватывает конструкции мультиспецифических антител, такие как триспецифические конструкции антител, последние из которых включают три связывающих домена или конструкции, имеющие более трех (например, четыре, пять ...) специфик.

Учитывая, что конструкции антител в соответствии с изобретением являются (по меньшей мере) биспецифическими, они не встречаются естественным образом, и они заметно отличаются от естественных продуктов. Таким образом, "биспецифическая" конструкция антитела или иммуноглобулин является искусственным гибридным антителом или иммуноглобулином, имеющим по меньшей мере два различных сайта связывания с различной специфичностью. Биспецифические антитела можно получать различными способами, в том числе посредством сливания гибридом или связывания фрагментов Fab'. См. например, публикации Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990).

По меньшей мере, два связывающих домена и переменных домена конструкции антитела по данному изобретению могут содержать или не содержать пептидные линкеры (спейсерные пептиды). Тер-

мин "пептидный линкер" определяет в соответствии с настоящим изобретением аминокислотную последовательность, посредством которой аминокислотные последовательности одного (вариабельного и/или связывающего) домена и другого (вариабельного и/или связывающего) домена конструкции антитела по изобретению связаны друг с другом. Существенной технической особенностью такого пептидного линкера является то, что он не содержит никакой активности полимеризации. Среди подходящих пептидных линкеров те, которые описаны в патентах США 4751180 и 4935233 или WO 88/09344.

В том случае, если используется линкер, этот линкер предпочтительно имеет длину и последовательность, достаточные для обеспечения того, чтобы каждый из первого и второго доменов мог независимо друг от друга сохранять свои дифференциальные специфичности связывания. Для пептидных линкеров, которые соединяют по меньшей мере два связывающих домена в конструкции антитела по изобретению (или два вариабельных домена), эти пептидные линкеры являются предпочтительными, которые содержат только несколько аминокислотных остатков, например, 12 аминокислотных остатков или менее. Таким образом, предпочтительным является пептидный линкер, состоящий из 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислотных остатков. Предполагаемый пептидный линкер с менее чем 5 аминокислотами содержит 4, 3, 2 или одну аминокислоту(ы), причем Gly-богатые линкеры являются предпочтительными. Особенно предпочтительной "единственной" аминокислотой в контексте указанного "пептидного линкера" является Gly. Соответственно, указанный пептидный линкер может состоять из одной аминокислоты Gly. Другой предпочтительный вариант реализации пептидного линкера характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, то есть Gly<sub>4</sub>Ser (SEQ ID NO: 393), или их полимерами, т.е. (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>x</sub>, где x равняется целым числом, равным 1 или более. Характеристики указанного пептидного линкера, которые включают отсутствие промотирования вторичных структур, известны в данной области техники и описаны, например, в Dall'Acqua et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) и Raag and Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Предпочтительными являются пептидные линкеры, которые также не способствуют образованию каких-либо вторичных структур. Связывание указанных доменов друг с другом может быть обеспечено, например, с помощью генной инженерии, как описано в примерах. Способы получения слитых и функционально связанных биспецифических одноцепочечных конструкций и экспрессия их в клетках бактерий или млекопитающих хорошо известны в данной области техники (например, WO 99/54440 или Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).

Таким образом, в данном изобретении предложен предпочтительный вариант реализации, в котором конструкция антитела находится в формате, выбранном из группы, состоящей из (scFv)<sub>2</sub>, однодоменного-scFv mAb, диатела и олигомеров любого из вышеперечисленных форматов. Термин "находится в формате" не исключает, что конструкция может быть дополнительно модифицирована, например, путем прикрепления или слияния с другими фрагментами, как описано в данном документе.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом реализации изобретения конструкция антитела по изобретению представляет собой "биспецифическую одноцепочечную конструкцию антитела", более предпочтительно биспецифическую "одноцепочечную Fv" (scFv). Несмотря на то, что два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть объединены с помощью стандартных рекомбинантных методов посредством синтетического линкера, который обеспечивает возможность их получения в качестве единой белковой цепи, в которой области VL и VH спарены с образованием одновалентной молекулы; см., например, Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Эти фрагменты антител получают с использованием обычных методов, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты оценивают на функцию таким же образом, как и целые или полноразмерные антитела.

Одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) является, следовательно, слитым белком вариабельного участка тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) иммуноглобулинов, обычно связанным с коротким линкерным пептидом от около 10 до около 25 аминокислот, предпочтительно от около 15 до 20 аминокислот. Линкер обычно богат глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости и может либо соединить N-конец VH с C-концом VL, либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление постоянных областей и введение линкера.

Биспецифические одноцепочечные молекулы известны в данной области техники и описаны в WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Способы, описанные для производства одноцепочечных антител (см., в частности, патент США № 4946778, Kontermann and Dübel (2010), loc. cit. and Little (2009), loc. cit), могут быть адаптированы для получения одноцепочечных конструкций антител специфически распознающих избранную цель(и).

Двухвалентные (также называемые двухвалентными) или биспецифические одноцепочечные вариабельные фрагменты (bi-scFvs или di-scFvs, имеющие формат (scFv)<sub>2</sub>, могут быть сконструированы путем связывания двух молекул scFv. Если эти две молекулы scFv имеют одинаковую специфичность связывания, полученную (scFv)<sub>2</sub> молекулу предпочтительно будут называть двухвалентной (то есть она имеет две валентности для одного и того же целевого эпитопа). Если две молекулы scFv имеют разную

специфичность связывания, полученную (scFv)<sub>2</sub> молекулу предпочтительно будут называть биспецифической. Связывание может быть выполнено путем создания единственной пептидной цепи с двумя участками VH и двумя участками VL, получая тандемные scFvs (см., например, Kufer P. et al., (2004) Trends in Biotechnology 22(5):238-244). Другая возможность заключается в создании молекул scFv с линкерowymi пептидами, которые слишком коротки, чтобы два переменных участка складывались (например, около пяти аминокислот), заставляя scFvs димеризоваться. Этот тип известен как диатела (см., например, Hollinger, Philipp et al., (July 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (14): 6444-8.).

В соответствии с еще одним предпочтительным вариантом конструкции антитела по изобретению тяжелая цепь (VH) и легкая цепь (VL) связывающего домена (связывающаяся либо с целевым антигеном CDH3, либо с CD3) непосредственно не связаны через пептидный линкер, как описано выше, но связывающие домены образуются, как описано для диатела. Таким образом, VH домена связывания CD3 может быть слит с VL домена связывания CDH3 с помощью пептидного линкера, а VH домена связывания CDH3 слит с VL домена связывания CD3 через такой пептидный линкер.

Однодоменные антитела содержат только один (мономерный) переменный домен антитела, который способен избирательно связываться с определенным антигеном независимо от других V-областей или доменов. Первые однодоменные антитела были сконструированы из антител с тяжелой цепью, обнаруженных у верблюжьих, и они называются фрагментами V<sub>H</sub>H. У хрящевых рыб также есть антитела с тяжелой цепью (IgNAR), из которых могут быть получены однодоменные антитела, называемые фрагментами V<sub>NAR</sub>. Альтернативный подход заключается в разделении доменов с димерной переменной от общих иммуноглобулинов, например, от человека или грызунов на мономеры, следовательно, получение VH или VL в виде однодоменного Ат. Хотя в данное время большинство исследований в отношении однодоменных антител основано на переменных доменах тяжелой цепи, было показано, что наночастицы, полученные из легких цепей, специфически связываются с целевыми эпитопами. Примеры однодоменных антител называются sdAb, наночастицами или антителами с одним переменным доменом.

Таким образом (однодоменное mAb)<sub>2</sub> представляет собой конструкцию моноклонального антитела, состоящую из (по меньшей мере) двух моноклональных антител с одним доменом, которые индивидуально выбирают из группы, включающей VH, VL, V<sub>H</sub>H и V<sub>NAR</sub>. Линкер предпочтительно находится в форме пептидного линкера. Аналогично, "scFv-однодоменное mAb" представляет собой моноклональное антитело, состоящее из по меньшей мере одного однодоменного антитела, как описано выше, и одной молекулы scFv, как описано выше. Опять же линкер предпочтительно находится в форме пептидного линкера.

В одном варианте реализации изобретения первый связывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из тех последовательностей, которые показаны в SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 237 и SEQ ID NO: 247.

В другом варианте реализации изобретения первый связывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из тех последовательностей, которые показаны в SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 347 и SEQ ID NO: 357.

Также предполагается, что конструкция антитела по изобретению имеет помимо своей функции связывания с молекулами-мишенями CDH3 и CD3 еще одну функцию. В данном формате конструкция антитела представляет собой трифункциональную или многофункциональную конструкцию антител, функционирующую путем нацеливания на клетки-мишени посредством связывания с CDH3, опосредуя цитотоксическую активность Т-клеток посредством связывания CD3 и обеспечивая дополнительную функцию, такую как антитело-зависимая клеточная цитотоксичность, опосредованная полностью функциональным константным доменом Fc, путем рекрутинга эффекторных клеток, таких как НК-клетки, метки (флуоресцентные и т.д.), терапевтические агенты, такие как токсин или радионуклид, и/или средства увеличения периода полувыведения в сыворотке и т.д.

Примеры способов продления периода полувыведения в сыворотке конструкций антител по изобретению включают пептиды, белки или домены белков, которые слиты или иным образом присоединены к конструкциям антител. Группа пептидов, белков или доменов белка включает пептиды, связывающиеся с другими белками с предпочтительным фармакокинетическим профилем в организме человека, такие как сывороточный альбумин (см. WO 2009/127691). Один из них представлен в SEQ ID NO: 437. Альтернативное понятие таких пептидов с увеличенным периодом полувыведения (HLE) включает пептиды, связывающиеся с рецептором Fc новорожденных (FcRn, см. WO 2007/098420), которые также используются в некоторых конструкциях по данному изобретению. Понятие присоединения более крупных доменов белков или полных белков включает, например, слияние сывороточного альбумина человека, вариантов или мутантов сывороточного альбумина человека (см. WO 2011/051489, WO 2012/059486, WO 2012/150319, WO 2013/135896, WO 2014/072481, WO 2013/075066) или их доменов, а также слияние константной области иммуноглобулинов (доменов Fc) и их вариантов. Такие варианты доменов Fc могут быть оптимизированы/модифицированы для обеспечения желаемого спаривания димеров или мультиме-

ров, для предотвращения связывания Fc-рецептора (например, рецептора Fc) или по другим причинам. Если вышеописанные молекулы HLE состоят только из одной единственной полипептидной цепи, они имеют то преимущество, что (i) нет необходимости в двух отдельных системах экспрессии, и (ii) они могут быть выделены с высокой степенью чистоты из-за отсутствия "фиктивной цепи". Еще одной концепцией, известной в данной области техники для продления периода полувыведения небольших белковых соединений в организме человека, является пэгилирование этих соединений, таких как конструкция антитела по данному изобретению.

В предпочтительном варианте реализации изобретения конструкции биспецифического антитела по изобретению могут быть связаны (например, с помощью пептидной связи) с партнером по слиянию (таким как белок или полипептид, или пептид), например, с целью продления срока полувыведения конструкции в сыворотке. Эти партнеры по слиянию могут быть выбраны из сывороточного альбумина человека ("HSA" или "HALB") в виде его вариантов последовательности, пептидов, связывающихся с HSA, пептидов, связывающихся с FcRn ("FcRn BP") или конструкций, содержащих (полученный из антитела) участок Fc. Иллюстративные последовательности этих партнеров слияния представлены в SEQ ID NO: 406-421 и 437-444. В общем, партнеры по слиянию могут быть связаны с N-концом или с C-концом конструкций биспецифического антитела по изобретению либо непосредственно (например, посредством пептидной связи), либо через пептидный линкер, такой как (GGGS)<sub>n</sub> (где "n" представляет собой целое число, равное 2 или более, например 2 или 3, или 4). Подходящие пептидные линкеры представлены в SEQ ID NO: 392-400.

Конструкция антитела, названная CDH3-13 (полноразмерная последовательность биспецифической молекулы, представленная в SEQ ID NO: 178) была соединена в рамке с группой слитых белков или слитых пептидов (см., например, SEQ ID NO: 437-444) с целью продления срока полувыведения конструкции в сыворотке. Соответствующие последовательности этих конструкций слияния представлены в SEQ ID NO: 379-389. Последовательности этих партнеров по слиянию с "голой" биспецифической конструкцией антитела также могут быть связаны (C- или N-концом, так, как это соответствует, и показано для CDH3-13), с любыми другими конструкциями антител, описанными в данном документе. Следовательно, предполагается, что конструкция биспецифического антитела по изобретению дополнительно содержит полипептид как представлено в SEQ ID NO: 437 или альбумин, предпочтительно альбумин человека или его вариант (имеющий улучшенные свойства, такие как сродство к рецептору FcRn и длительный период полувыведения в плазме), наиболее предпочтительно альбумин, как показано в SEQ ID NO: 443 или 444. Эти фрагменты предпочтительно слиты в рамке с C-концом конструкции биспецифического антитела.

В примере 15 также показано неожиданное преимущество, которое заключается в C-концевом слиянии альбумина с конструкцией биспецифического антитела по изобретению. Для этих биспецифических T-клеточных взаимодействующих молекул, содержащих связывающий домен, специфичный для человека и *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* или *Saimiri sciureus* CD3ε, где эпитоп является частью аминокислотной последовательности, состоящей из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 4, 6, или 8 WO 2008/119567 и содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность Gln-Asp-Gly-Asn-Glu, было обнаружено, что эти молекулы, при использовании в очень высоких концентрациях, проявляют цитотоксичность T-клеток даже в отсутствие клеток-мишеней. Такие проблемы с высокой концентрацией могут стать актуальными для конкретных путей введения или в сочетании с конкретными целевыми настройками и требуемыми концентрациями соединений. Предпочтительные примеры таких вторых связывающих доменов, которые связываются с CD3 человека на поверхности T-клетки, описаны ниже и представлены в SEQ ID NO: 445-537. Когда сывороточный альбумин сливается с C-концом такой биспецифической конструкции, цитотоксичность T-клеток избегается, см. фиг. 13. Без намерения быть связанным теорией активация T-клеток в присутствии высокой концентрации T-клеток, взаимодействующих с биспецифическими конструкциями антител, и в отсутствие клеток-мишеней может быть объяснена димеризацией или мультимеризацией конструкций антител через CD3 связывающий домен. Такая ди- или мультимеризация стерически нарушается путем слияния альбумина или его варианта с C-концом конструкции антитела, сохраняя при этом характеристики конструкции антитела для способа активации взаимодействия с T-клеткой. Следовательно, предпочтительная конструкция антитела по данному изобретению содержит в N-C-концевой порядок:

первый связывающий домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 347 и SEQ ID NO: 357;

пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 392-400;

второй связывающий домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 453, SEQ ID NO: 462, SEQ ID NO: 471, SEQ ID NO: 480, SEQ ID NO: 489, SEQ ID NO: 498, SEQ ID NO: 507, SEQ ID NO: 516, SEQ ID NO: 525, SEQ ID NO: 534 и SEQ ID NO: 537; и

необязательно, пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 392-400; и

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 437, 443 и 444.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом реализации изобретения конструкция биспецифического антитела по изобретению содержит (в дополнение к двум связывающим доменам) третий домен, который содержит два полипептидных мономера, каждый из которых содержит шарнир, CH2 и CH3-домен, причем указанные два полипептида (или полипептидные мономеры) слиты друг с другом с помощью пептидного линкера. Предпочтительно указанный третий домен содержит в N-С-концевом порядке: шарнир-CH2-CH3-линкер-шарнир-CH2-CH3. Предпочтительные аминокислотные последовательности для указанного третьего домена представлены в SEQ ID NO: 414-421. Каждый из указанных полипептидных мономеров предпочтительно имеет аминокислотную последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из SEQ ID NO: 406-413, или по меньшей мере на 90% идентичны тем последовательностям. В другом предпочтительном варианте реализации изобретения первый и второй связывающие домены конструкции биспецифического антитела по изобретению слиты с третьим доменом через пептидный линкер, который, например, выбран из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 392-400, предпочтительно из группы, состоящей из любой из SEQ ID NO: 392, 393, 395, 396, 397, 399 и 400.

В соответствии с настоящим изобретением "шарнир" представляет собой шарнирный участок IgG. Этот участок может быть идентифицирован по аналогии с использованием нумерации Kabat, см. позиции Kabat 223-243. В соответствии с вышеизложенным минимальным требованием для "шарнира" являются аминокислотные остатки, соответствующие участку последовательности IgG1 от D231 до P243 в соответствии с нумерацией Kabat. Термины CH2 и CH3 относятся к константным участкам 2 и 3 тяжелой цепи иммуноглобулина. Эти участки также можно идентифицировать по аналогии с использованием нумерации Kabat, см. позиции Kabat 244-360 для CH2 и позиции Kabat 361-478 для CH3. Подразумевается, что между иммуноглобулинами существует определенная вариация между их областью Fc IgG1, Fc IgG2, областью Fc IgG3, участком Fc IgG4, участком Fc IgM, участком IgA Fc, участком Fc IgD и участком Fc IgE (см., например, Padlan, Molecular Immunology, 31(3), 169-217 (1993)). Термин Fc-мономер относится к последним двум константным областям тяжелой цепи IgA, IgD и IgG и к последним трем константным участкам тяжелой цепи IgE и IgM. Мономер Fc также может содержать гибкий шарнирный N-конец к этим доменам. У IgA и IgM мономер Fc может содержать J-цепь. У IgG Fc-часть содержит иммуноглобулиновые домены CH2 и CH3 и шарнир между первыми двумя доменами и CH2. Хотя границы Fc-части иммуноглобулина могут изменяться, пример для Fc-части тяжелой цепи IgG человека, содержащей функциональный шарнир, домен CH2 и CH3, может быть определен, например, содержащий остатки D231 (шарнирного домена) до P476 (С-конца домена CH3) или соответственно от D231 до L476 для IgG4, где нумерация соответствует Kabat.

Конструкция антитела по изобретению может, следовательно, содержать в порядке от N- до С-конца:

- (a) первый связывающий домен;
- (b) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 393, 399 и 400;
- (c) второй связывающий домен;
- (d) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 392, 393, 395, 396, 397, 399 и 400;
- (e) первый полипептидный мономер третьего домена (содержащий шарнир, CH2 и домен CH3);
- (f) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 402, 403, 404 и 405; и
- (g) второй полипептидный мономер третьего домена (содержащий шарнир, CH2 и домен CH3);

Также предпочтительно, чтобы конструкция антитела по изобретению содержала в порядке от N- до С-конца:

(a) первый связывающий домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 347 и SEQ ID NO: 357;

(b) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 393, 399 и 400;

(c) второй связывающий домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 453, SEQ ID NO: 462, SEQ ID NO: 471, SEQ ID NO: 480, SEQ ID NO: 489, SEQ ID NO: 498, SEQ ID NO: 507, SEQ ID NO: 516, SEQ ID NO: 525, SEQ ID NO: 534 и SEQ ID NO: 537;

(d) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, со-

стоящей из SEQ ID NO: 392, 393, 395, 396, 397, 399 и 400; и

(е) третий домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 414-421.

Следовательно, в предпочтительном варианте реализации изобретения конструкция антитела по данному изобретению содержит или состоит из полипептида, выбранного из группы, состоящей из тех, которые представлены в SEQ ID NO: 422, SEQ ID NO: 423, SEQ ID NO: 424, SEQ ID NO: 425, SEQ ID NO: 426, SEQ ID NO: 427, SEQ ID NO: 428, SEQ ID NO: 429, SEQ ID NO: 430, SEQ ID NO: 431, SEQ ID NO: 432, SEQ ID NO: 433, SEQ ID NO: 434 и SEQ ID NO: 435.

Также приведена ссылка на пример 15, в котором показана одна из вышеописанных конструкций Fc и ее противоопухолевую активность в модели мышиноного ксенотрансплантата. Ковалентные модификации конструкций антител также включены в объем данного изобретения и обычно, но не всегда, выполняются посттрансляционно. Например, в молекулу вносят несколько типов ковалентных модификаций конструкции антитела путем приведения конкретных аминокислотных остатков конструкции антитела в реакцию с органическим дериватирующим агентом, который способен вступать в реакцию с выбранными боковыми цепями N- или C-концевых остатков.

Остатки цистеинила наиболее часто приводят в реакцию с  $\alpha$ -галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, чтобы получить карбоксиметильные или карбоксиамидометильные производные. Остатки цистеинила также дериватируют посредством реакции с бромтрифторацетоном,  $\alpha$ -бром- $\beta$ -(5-имидозоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлорртутьбензоатом, 2-хлорртуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Остатки гистидила дериватируют посредством реакции с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, поскольку этот агент является относительно специфичным в отношении боковой цепи гистидила. Также применим пара-бромфенацилбромид; реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М растворе какодилата натрия при pH 6,0. Лизиниловые и аминоконцевые остатки приводят в реакцию с янтарным ангидридом или ангидридами других карбоновых кислот. Дериватизация этими агентами может приводить к изменению заряда остатков лизинила. Другие подходящие реагенты для дериватизации альфа-аминосодержащих остатков включают имидоэфиры, такие как метилпиколинимидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборогидрид; тринитробензолсульфовую кислоту; O-метилизомочевина; 2,4-пентандион; и катализируемую трансаминазой реакцию с глиоксилатом.

Остатки аргинила модифицируют путем реакции с одним или несколькими традиционными реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Для дериватизации остатков аргинина необходимо, чтобы реакцию проводили в щелочной среде из-за высокой pKa гуанидиновой функциональной группы. Кроме того, такие реагенты могут взаимодействовать с группами лизина, а также с epsilon-аминогруппой аргинина.

Можно проводить конкретные модификации остатков тирозила, в особенности интересны случаи введения спектральных меток в остатки тирозила при помощи реакции с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометаном. Наиболее часто применяют N-ацетилимидизол и тетранитрометан для образования видов O-ацетилтирозила и 3-нитропроизводных, соответственно. Остатки тирозила йодируют, применяя  $^{125}\text{I}$  или  $^{131}\text{I}$ , для получения меченых белков для применения в радиоиммунологическом анализе, при этом подходящим является описанный выше метод с хлорамином T.

Карбоксильные боковые группы (аспартил или глутамил) селективно модифицируют при помощи реакции с карбодиимидами ( $\text{R}'\text{-N}=\text{C}=\text{N--R}'$ ), где R и R' необязательно представляют собой разные алкильные группы, такие как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азониа-4,4-диметилфенил)карбодиимид. Кроме того, остатки аспартила и глутамила превращают в остатки аспарагинила и глутаминила при помощи реакции с ионами аммония.

Дериватизацию с бифункциональными агентами применяют для перекрестного сшивания конструкций антител по данному изобретению с нерастворимой в воде матричной подложной или поверхностью для применения в различных способах. Обычно применяемые перекрестносшивающие агенты включают, например, 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаральдегид, N- гидроксисукцинимид эфиры, например, сложные эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные сложные имидоэфиры, включая дисукцинимидилэфиры, такие как 3,3'-дитио-бис-(сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимида-1,8-октан. При помощи дериватирующих агентов, таких как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]пропиоимидат, получают фотоактивируемые промежуточные соединения, которые способны образовывать перекрестные связи в присутствии света. В альтернативном варианте для иммобилизации белка применяют нерастворимые в воде матрицы, такие как активируемые бромистым цианогеном углеводы и реактивные субстраты, описанные в патентах США №№ 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440.

Остатки глутаминила и аспарагинила часто деаминируют до соответствующих остатков глутамила и аспартила соответственно. В альтернативном варианте эти остатки дезаминируют в умеренно кислых условиях. Любая форма этих остатков входит в объем данного изобретения.

Другие модификации включают гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп остатков серила или треонила, метилирование  $\alpha$ -аминогрупп лизина, аргинина и боковых цепей гистидина (Т. Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилирование N-концевой аминогруппы и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации конструкций антител, входящий в объем данного изобретения, включает изменение профиля гликозилирования белка. Как известно в данной области техники, профили гликозилирования могут зависеть как от последовательности белка (например, присутствия или отсутствия конкретных аминокислотных остатков гликозилирования, обсуждаемых ниже), так и от клетки-хозяина или организма-хозяина, в которых вырабатывается белок. Конкретные системы экспрессии рассматриваются ниже.

Гликозилирование полипептидов, как правило, бывает N-связанным или O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводной группы к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X является любой аминокислотой за исключением пролина, представляют последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного компонента к боковой цепи аспарагина. Следовательно, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей создает потенциальный участок гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, наиболее часто серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление участков гликозилирования к раскрытой конструкции антитела удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности так, чтобы она содержала одну или более из вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-связанных участков гликозилирования). Изменение также можно проводить путем добавления или замещения на один или более остатков серина или треонина в исходной последовательности (для O-связанных сайтов гликозилирования). Для удобства аминокислотную последовательность конструкции антитела предпочтительно изменяют на уровне ДНК, в частности, мутируя ДНК, кодирующую полипептид-мишень, в предварительно выбранных основаниях так, чтобы сгенерированные кодоны транслировались в необходимые аминокислоты.

Другим способом повышения числа углеводных компонентов в конструкции антитела является химическое или ферментативное сопряжение гликозидов с белком. Эти процедуры являются преимущественными, так как они не требуют выработки белка в клетке-хозяине, которая обладает способностью осуществлять N- или O-связанное гликозилирование. В зависимости от используемого способа соединения, сахар(а) может быть присоединен к (а) аргинину и гистидину, (б) свободным карбоксильным группам, (в) свободным сульфгидрильным группам, таким как сульфгидрильные группы цистеина, (г) свободным гидроксильным группам, таким как гидроксильные группы серина, треонина или гидроксипролина, (д) ароматическим остаткам, таким как ароматические остатки фенилаланина, тирозина или триптофана, или (е) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO 87/05330, и Aplin and Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306.

Удаление углеводных остатков, присутствующих в исходной конструкции антитела, может быть осуществлено химически или ферментативно. Для химического дегликозилирования необходимо подвергнуть белок действию соединения трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Эта обработка приводит к расщеплению большинства или всех сахаров, кроме связующего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), при этом полипептид остается интактным. Химическое дегликозилирование описано в Nakimuddin et al., 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 и by Edge et al., 1981, *Anal. Biochem.* 118:131. Ферментативное расщепление углеводных остатков на полипептидах может быть достигнуто за счет использования ряда эндо- и экзогликозидаз, как описано в Thotakura et al., 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350. Гликозилирование в потенциальных сайтах гликозилирования можно предотвратить, используя соединение туникамицин, как описано в Duskin et al., 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105. Туникамицин блокирует образование связей белок-N-гликозид.

Другие модификации конструкции антитела также рассматриваются в данном документе. Например, другой тип ковалентной модификации конструкции антитела включает связывание конструкции антитела с различными небелковыми полимерами, включая, но не ограничиваясь ими, различные полиолы, такие как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, полиоксипалкилены или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, способом, описанным в патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Кроме того, как известно в данной области техники, аминокислотные замены могут быть сделаны в различных положениях в пределах конструкции антитела, чтобы способствовать добавлению полимеров, таких как ПЭГ.

В некоторых вариантах реализации изобретения ковалентная модификация конструкций антител согласно изобретению включает добавление одной или более меток. Метящая группа может быть сопряжена с конструкцией антитела посредством спейсерных ножек различной длины для снижения потенциального стерического несоответствия. В данной области техники известны различные способы мечения белков, которые можно применять для осуществления данного изобретения. Термин "метка" или "метя-

шая группа" означает любую детектируемую метку. В общем случае метки делятся на различные классы в зависимости от метода их выявления - следующие примеры включают, но не ограничиваются ими:

- a) изотопные метки, которые могут быть радиоактивными или тяжелыми изотопами, такими как радиоизотопы или радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ );
- b) магнитные метки (например, магнитные частицы);
- c) окислительно-восстановительные активные группы;
- d) оптические красители (включая, но не ограничиваясь ими, хромофоры, люминофоры и флуорофоры), такие как флуоресцентные группы (например, FITC, родамин, люминофосфаты лантаноидов), хемилюминесцентные группы и флуорофоры, которые могут представлять собой либо "низкомолекулярные" флуорофоры, либо белковые флуорофоры;
- e) ферментативные группы (например, пероксидаза хрена,  $\beta$ -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза);
- f) биотинилированные группы;
- g) предопределенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновых молний, участки связывания вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки и т.п.).

"Флуоресцентная метка" может представлять собой любую молекулу, которую можно выявить вследствие присущих ей флуоресцентных свойств. Подходящие флуоресцентные метки включают, но не ограничиваются ими, флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, желтый люцифер, каскад голубой J, тexasский красный, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, зеленый Орегон, красители Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), каскад голубой, каскад желтый и R-фикоэритрин (ФЭ) (Молекуляр Пробс, Юджин, штат Орегон), ФИТЦ, родамин и тexasский красный (Пирс, Рокфорд, штат Иллинойс), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Амершам Лайф Сайнс, Питсбург, штат Пенсильвания). Подходящие оптические красители, включая флуорофоры, описаны в *Molecular Probes Handbook* by Richard P. Haugland.

Подходящие белковые флуоресцентные метки также включают, но не ограничиваются ими, зеленый флуоресцентный белок, включая GFP видов *Renilla*, *Ptilosarcus* или *Aequorea* (Chalfie et al., 1994, *Science* 263:802-805), EGFP (усиленный зеленый флуоресцентный белок) (Clontech Laboratories, Inc., номер доступа Genbank U55762), синий флуоресцентный белок (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim et al., 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), усиленный желтый флуоресцентный белок (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), люциферазу (Ichiki et al., 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417),  $\beta$ галактозидазу (Nolan et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2603-2607) и *Renilla* (WO 92/15673, WO 95/07463, WO 98/14605, WO 98/26277, WO 99/49019, патенты США №№ 5292658; 5418155; 5683888; 5741668; 5777079; 5804387; 5874304; 5876995; 5925558).

Домены лейциновой молнии представляют собой пептиды, которые способствуют олигомеризации белков, в которых они обнаружены. Лейциновые молнии были первоначально идентифицированы в нескольких ДНК-связывающих белках (Landschulz et al., 1988, *Science* 240: 1759) и с тех пор были обнаружены во множестве различных белков. Среди известных лейциновых молний встречаются встречающиеся в природе пептиды и их производные, которые димеризуют или тримеризуют. Примеры доменов лейциновой молнии, подходящих для получения растворимых олигомерных белков, описаны в заявке РСТ WO 94/10308, а лейциновая молния, полученная из белка D сурфактанта легкого (SPD), описана в Норре et al., 1994, *FEBS Letters* 344:191. Использование модифицированной лейциновой молнии, которая обеспечивает стабильную тримеризацию гетерологичного белка, слитого с ней, описано в Fanslow et al., 1994, *Semin. Immunol.* 6:267-78. В одном из подходов рекомбинантные слитые белки, содержащие фрагмент CDH3-антитела или производные, слитые с пептидом лейциновой молнии, экспрессируются в подходящих клетках-хозяевах, а растворимые олигомерные фрагменты CDH3-антитела или производные, которые образуются, выделяют из надосадочной жидкости культуры.

Конструкция антитела по изобретению может также содержать дополнительные домены, которые, например, полезны при выделении молекулы или относятся к адаптированному фармакокинетическому профилю молекулы. Домены, полезные для выделения конструкции антитела, могут быть выбраны из пептидных мотивов или вторично введенных фрагментов, которые могут быть захвачены методом выделения, например, изолирующей колонкой. Неограничивающие варианты реализации таких дополнительных доменов включают пептидные мотивы, известные как Myc-tag, HA-tag, TAP-tag, GST-tag, связывающий домен хитина (CBD-tag), мальтозосвязывающий белок (MBC-tag), Flag-tag, Strep-tag и их варианты (например, StrepII-tag) и His-tag. Все описанные в данном документе конструкции антител, характеризующиеся идентифицированными CDR, предпочтительно, содержат домен His-tag, который обычно известен как повтор последовательных His остатков в аминокислотной последовательности молекулы, предпочтительно пяти, и более предпочтительно шести His остатков (гексагистидин, см. SEQ ID NO:

436). His-tag может быть расположена, например, на N- или C-конце конструкции антитела, предпочтительно она расположена на C-конце. Наиболее предпочтительно гексагистидиновая метка (НННННН) связана посредством пептидной связи с C-концом конструкции антитела в соответствии с изобретением.

Первый связывающий домен конструкции антитела по данному изобретению связывается с CDH3 человека на поверхности клетки-мишени. Аминокислотная последовательность CDH3 человека представлена в SEQ ID NO: 1. Понятно, что термин "на поверхности" в контексте данного изобретения означает, что связывающий домен специфически связывается с эпитопом или эпитопным кластером, содержащимся во внеклеточном домене CDH3 (CDH3 ECD). Первый домен связывания по изобретению, следовательно, предпочтительно связывается с CDH3, когда он экспрессируется естественным образом экспрессирующими клетками или клеточными линиями, и/или клетками или клеточными линиями, трансформированными или (стабильно/временно) трансфицированными CDH3. В предпочтительном варианте реализации первый связывающий домен также связывается с CDH3, когда CDH3 используется в качестве молекулы "мишень" или "лиганд" в анализе связывания *in vitro*, таком как BIAcore или Scatchard. "Целевая клетка" может быть любой прокариотической или эукариотической клеткой, экспрессирующей CDH3 на ее поверхности; предпочтительно клетка-мишень является клеткой, которая является частью тела человека или животного, такой как опухольная или раковая клетка.

Термин "CDH3 ECD" относится к форме CDH3, которая по существу не содержит трансмембранных и цитоплазматических доменов CDH3. Специалисту в данной области техники будет понятно, что трансмембранный домен, идентифицированный для CDH3-полипептида по данному изобретению, идентифицируется в соответствии с критериями, обычно используемыми в данной области для идентификации этого типа гидрофобного домена. Точные границы трансмембранного домена могут варьировать, но, скорее всего, не более чем на 5 аминокислотах на обоих концах домена, конкретно упомянутых в данном документе. Предпочтительный ECD CDH3 человека показан в SEQ ID NO: 3.

Сродство первого связывающего домена для CDH3 человека предпочтительно составляет  $\leq 15$  нМ, более предпочтительно  $\leq 10$  нМ, еще более предпочтительно  $\leq 5$  нМ, еще более предпочтительно  $\leq 1$  нМ, еще более предпочтительно  $\leq 0,5$  нМ, еще более предпочтительно  $\leq 0,1$  нМ и наиболее предпочтительно  $\leq 0,05$  нМ. Аффинность может быть измерена, например, в анализе BIAcore или в анализе Scatchard, например, как описано в примерах. Другие способы определения сродства хорошо известны специалисту в данной области техники.

T-клетки или T-лимфоциты представляют собой тип лимфоцитов (сам по себе тип лейкоцитов), которые играют центральную роль в клеточно-опосредованном иммунитете. Существует несколько подмножеств T-клеток, каждая из которых имеет определенную функцию. T-клетки можно отличить от других лимфоцитов, таких как B-клетки и NK-клетки, наличием T-клеточного рецептора (ТКР) на поверхности клетки. TCR отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами крупных гистосовместимых комплексов (МНС), и состоит из двух различных белковых цепей. В 95% T-клеток TCR состоит из альфа-( $\alpha$ ) и бета-( $\beta$ ) цепи. Когда TCR взаимодействует с антигенным пептидом и МНС (комплекс пептид/МНС), T-лимфоцит активируется посредством ряда биохимических событий, опосредуемых связанными ферментами, корецепторами, специализированными адаптивными молекулами и активированными или высвобождаемыми транскрипционными факторами.

CD3-рецепторный комплекс представляет собой белковый комплекс и состоит из четырех цепей. У млекопитающих комплекс содержит цепь CD3 $\gamma$  (гамма), цепь CD3 $\delta$  (дельта) и две цепи CD3 $\epsilon$  (эпсилон). Эти цепи связываются с T-клеточным рецептором (TCR) и так называемой  $\zeta$  (дзета) цепью с образованием комплекса CD3-рецептора T-клеток и генерируют сигнал активации в T-лимфоцитах. Цепи CD3 $\gamma$  (гамма), CD3 $\delta$  (дельта) и CD3 $\epsilon$  (эпсилон) представляют собой сильно связанные белки клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулина, содержащего один внеклеточный домен иммуноглобулина. Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один консервативный мотив, известный как мотив активации на основе тирозина на основе иммунорецепторов, или короткий кратковременный, который необходим для сигнальной способности TCR. Молекула CD3-эпсилон представляет собой полипептид, который у человека кодируется геном CD3E, который находится на хромосоме 11. Наиболее предпочтительный CD3-связывающий эпитоп соответствует аминокислотным остаткам 1-27 внеклеточного домена CD3 эпсилон человека.

Переадресованный лизис клеток-мишеней посредством рекрутирования T-клеток с помощью мультиспецифической, по крайней мере биспецифической конструкции антител включает образование цитолитического синапса и доставку перфорина и гранзимов. Задействованные T-клетки способны к серийному лизису клеток-мишеней и на них не влияют механизмы иммунной эвакуации, мешающие обработке и представлению пептидного антигена или клональной дифференцировке T-клеток; см., например, WO 2007/042261.

Цитотоксичность, опосредованная конструкциями биспецифических антител CDH3/CD3, может быть измерена различными способами. Эффекторными клетками могут представлять собой, например, стимулированные обогащенные (человеческие) CD8-положительные T-клетки или нестимулированные (человеческие) мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). Если клетки-мишени имеют проис-

хождение макака или экспрессируются или трансфицированы CDH3 макака, эффекторные клетки также должны быть макакового происхождения, такого как линия Т-клеток макака, например, 4119LpRx. Клетки-мишени должны экспрессировать (по меньшей мере внеклеточный домен) CDH3, например, человека или макака CDH3. Клетки-мишени могут представлять собой клеточную линию (такую как СНО), которая стабильно или временно трансфицирована CDH3, например CDH3 человека или макака. Альтернативно, клетки-мишени могут представлять собой клеточную линию, естественно экспрессирующую CDH3. Как правило, ожидается, что значения  $EC_{50}$  будут ниже с целевыми клеточными линиями, экспрессирующими более высокие уровни CDH3 на поверхности клетки. Коэффициент эффектора для целевой клетки (Е:Т) обычно составляет около 10:1, но может также изменяться. Цитотоксическую активность конструкций биспецифического антитела CDH3/CD3 можно измерить в анализе высвобождения 51-хрома (время инкубации около 18 ч) или в анализе цитотоксичности на основе FACS (время инкубации около 48 ч). Модификации времени инкубации анализа (цитотоксическая реакция) также возможны. Другие методы измерения цитотоксичности хорошо известны специалисту в данной области и включают анализы МТТ или МТС, анализы на основе АТФ, включая биолюминесцентные анализы, анализ сульфоподамина В (SRB), анализ WST, клоногенный анализ и технологию ECIS.

Цитотоксическую активность, опосредованную конструкциями биспецифических антител CDH3/CD3 по данному изобретению, предпочтительно измеряют в анализе цитотоксичности на основе клеток. Его также можно измерить в анализе высвобождения 51-хрома. Он представлен значением  $EC_{50}$ , которое соответствует половине максимальной эффективной концентрации (концентрация конструкции антитела, которая индуцирует цитотоксический ответ на полпути между базовой линией и максимумом). Предпочтительно, значение  $EC_{50}$  конструкций биспецифического антитела CDH3×CD3 составляет  $\leq 5000$  пг/мл или  $\leq 4000$  пг/мл, более предпочтительно  $\leq 3000$  пг/мл или  $\leq 2000$  пг/мл, еще более предпочтительно  $\leq 1000$  пг/мл или  $\leq 500$  пг/мл, еще более предпочтительно  $\leq 400$  пг/мл или  $\leq 300$  пг/мл, еще более предпочтительно  $\leq 200$  пг/мл, еще более предпочтительно  $\leq 100$  пг/мл, еще более предпочтительно  $\leq 50$  пг/мл, еще более предпочтительно  $\leq 20$  пг/мл или  $\leq 10$  пг/мл и наиболее предпочтительно  $\leq 5$  пг/мл.

Вышеуказанные значения  $EC_{50}$  могут быть измерены в разных тестах. Специалист в данной области техники осознает, что ожидается, что значение  $EC_{50}$  будет ниже, когда стимулированные/обогащенные CD8+ Т-клетки используются в качестве эффекторных клеток по сравнению с нестимулированным РВМС. Кроме того, можно ожидать, что значения  $EC_{50}$  ниже, когда клетки-мишени экспрессируют большое количество целевого антигена по сравнению с крысой с ограниченной целевой экспрессией. Например, когда стимулированные/обогащенные человеческие CD8+ Т-клетки используются в качестве эффекторных клеток (и в качестве клеток-мишеней используются также трансфицированные CDH3 клетки, такие как клетки СНО или CDH3-позитивная линия естественно экспрессирующих клеток, такие как A431), значение  $EC_{50}$  CDH3×CD3 биспецифической конструкции антитела предпочтительно составляет  $\leq 1000$  пг/мл, более предпочтительно  $\leq 500$  пг/мл, еще более предпочтительно  $\leq 250$  пг/мл, еще более предпочтительно  $\leq 100$  пг/мл, еще более предпочтительно  $\leq 50$  пг/мл, еще более предпочтительно  $\leq 10$  пг/мл и наиболее предпочтительно  $\leq 5$  пг/мл. Когда РВМС человека используются в качестве эффекторных клеток, значение  $EC_{50}$  конструкции биспецифического антитела CDH3×CD3 предпочтительно составляет  $\leq 5000$  пг/мл или  $\leq 4000$  пг/мл (в частности, когда клетки-мишени являются CDH3-положительной клеточной линией естественно экспрессирующей, такой как A431), более предпочтительно  $\leq 2000$  пг/мл (в частности, когда клетки-мишени являются трансфицированными CDH3 клетками, такими как клетки СНО), более предпочтительно  $\leq 1000$  пг/мл или  $\leq 500$  пг/мл, еще более предпочтительно  $\leq 200$  пг/мл, еще больше предпочтительно  $\leq 150$  мкг / мл, еще более предпочтительно  $\leq 100$  пг/мл и наиболее предпочтительно  $\leq 50$  пг/мл или ниже. Когда в качестве эффекторных клеток используют линию Т-клеток макака, такую как LnPx4119, и трансфицированную клеточную линию с CDH3 макака, такую как клетки СНО, используют в качестве линии клеток-мишеней, значение  $EC_{50}$  конструкции биспецифического антитела CDH3×CD3 предпочтительно составляет  $\leq 2000$  пг/мл или  $\leq 1500$  пг/мл, более предпочтительно  $\leq 1000$  пг/мл или  $\leq 500$  пг/мл, еще более предпочтительно  $\leq 300$  пг/мл или  $\leq 250$  пг/мл, еще более предпочтительно  $\leq 100$  пг/мл и наиболее предпочтительно  $\leq 50$  пг/мл.

Предпочтительно конструкции биспецифического антитела CDH3/CD3 по данному изобретению не индуцируют/не опосредуют лизис или не вызывают, по существу, индуцирование/опосредование лизиса CDH3-негативных клеток, таких как клетки СНО. Термин "не индуцирует лизис", "не вызывает по существу лизис", "не опосредует лизис" или "по существу не опосредует лизис", означает, что конструкция антитела по данному изобретению не индуцирует или не опосредует лизис на не более 30%, предпочтительно не более 20%, более предпочтительно не более 10%, особенно предпочтительно не более 9, 8, 7, 6 или 5% отрицательных клеток CDH3, в результате чего лизис клеточной линии CDH3, такой как A431 установлен на 100%. Это обычно применяется для концентраций конструкции антител до 500 нМ. Специалист в данной области техники знает, как измерить лизис клеток без дополнительных этапов. Кроме того, в данном документе приведены конкретные инструкции по измерению клеточного лизиса.

Различие в цитотоксической активности между мономерной и димерной изоформой индивидуальных конструкций CDH3/CD3-биспецифических антител называется "разрывом специфической активно-

сти". Этот разрыв в специфической активности может, например, рассчитываться как соотношение между значениями EC<sub>50</sub> мономерной и димерной формы молекулы. Разрывы специфической активности конструкций биспецифических антител CDH3/CD3 по данному изобретению предпочтительно составляют  $\leq 5$ , более предпочтительно  $\leq 4$ , еще более предпочтительно  $\leq 3$ , еще более предпочтительно  $\leq 2$  и наиболее предпочтительно  $\leq 1$ . В качестве примера, разрыв специфической активности для CDH3-13 определяли равным 0,5, определяли, что разрыв специфической активности для CDH3-13xCD3-HLE (Fc) составляет 0,9, разрыв специфической активности для CDH3-25 составляет 0,7, а разрыв специфической активности для CDH3-25xCD3-HALB также был определен как 0,7.

Первый и/или второй (или любой другой) связывающий домен(ы) конструкции антитела по изобретению является/являются, предпочтительно, кросс-видовыми, специфичными для отряда млекопитающих - приматов. Кросс-видовые специфические CD3-связывающие домены, например, описаны в WO 2008/119567. Согласно одному варианту реализации изобретения первый и/или второй связывающий домен в дополнение к связыванию с CDH3 человека и CD3 человека соответственно будут также связываться с CDH3/CD3 приматов, включая (но не ограничиваясь ими) приматов Нового Света (таких как *Callithrix jacchus*, *Saguimim Oedipus* или *Saimiri sciureus*), приматов Старого Света (таких как бабуины и макаки), гиббонов и нечеловеческих гоминид.

В одном аспекте изобретения первый связывающий домен связывается с CDH3 человека и далее связывается с CDH3 макака таким, как CDH3 *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 5), и более предпочтительно с ECD CDH3 макака. Сродство первого связывающего домена для CDH3 макака предпочтительно составляет  $\leq 15$  нМ, более предпочтительно  $\leq 10$  нМ, еще более предпочтительно  $\leq 5$  нМ, еще более предпочтительно  $\leq 1$  нМ, еще более предпочтительно  $\leq 0,5$  нМ, еще более предпочтительно  $\leq 0,1$  нМ и наиболее предпочтительно  $\leq 0,05$  нМ или даже  $\leq 0,01$  нМ.

Предпочтительно разрыв аффинности конструкций антител по изобретению для связывания CDH3 макака по сравнению с CDH3 человека [та CDH3:hu CDH3] (как определено, например, методом *BiaCore* или *Scatchard*, см. примеры) составляет от 0,1 до 10, более предпочтительно от 0,2 до 5, еще более предпочтительно от 0,3 до 2,5, еще более предпочтительно от 0,4 до 2 и наиболее предпочтительно от 0,5 до 1.

В одном варианте реализации конструкции антитела по изобретению второй связывающий домен связывается с CD3 эpsilon человека и *Callithrix jacchus*, *Saguimim Oedipus* или *Saimiri sciureus*. Предпочтительно, второй связывающий домен связывается с внеклеточным эпитопом этих цепей CD3 эpsilon. Также предполагается, что второй связывающий домен связывается с внеклеточным эпитопом цепи CD3 эpsilon человека и Макаса. Наиболее предпочтительный эпитоп CD3 эpsilon состоит из аминокислотных остатков 1-27 внеклеточного домена CD3 эpsilon человека. Более конкретно, эпитоп содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность Gln-Asp-Gly-Asn-Glu. *Callithrix jacchus* и *Saguimim oedipus* являются приматами Нового Света, принадлежащими к семейству *Callitrichidae*, в то время как *Saimiri sciureus* является приматом Нового Света, принадлежащим к семейству *Cebidae*.

Особенно предпочтительно для конструкции антитела по данному изобретению, что второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, содержит участок VL, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранный из:

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

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

(c) CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 153 WO 2008/119567, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 154 WO 2008/119567 и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 155 WO 2008/119567;

В альтернативном предпочтительном варианте реализации конструкции антитела по данному изобретению второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, содержит участок VH, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, выбранный из:

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

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

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

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

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

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

(g) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 120 WO 2008/119567, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO:

121 WO 2008/119567 и CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 122 WO 2008/119567;

(h) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 138 WO 2008/119567, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 139 WO 2008/119567, и CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 140 WO 2008/119567;

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

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

Также предпочтительно для конструкции антитела по данному изобретению, что второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, содержит участок VL, выбранный из группы, состоящей из участка VL, как показано в SEQ ID NO: 35, 39, 125, 129, 161 или 165 WO 2008/119567.

Альтернативно предпочтительно, что второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, содержит участок VH, выбранный из группы, состоящей из участка VH, как показано в SEQ ID NO: 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 или 181 WO 2008/119567.

Более предпочтительно конструкция антитела по данному изобретению характеризуется вторым связывающим доменом, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, содержащей участок VL и участок VH, выбранный из группы, состоящей из:

(a) участка VL, как показано в SEQ ID NO: 17 или 21 WO 2008/119567, и участка VH, как показано в SEQ ID NO: 15 или 19 WO 2008/119567;

(b) участка VL, как показано в SEQ ID NO: 35 или 39 WO 2008/119567, и участка VH, как показано в SEQ ID NO: 33 или 37 WO 2008/119567;

(c) участка VL, как показано в SEQ ID NO: 53 или 57 WO 2008/119567, и участка VH, как показано в SEQ ID NO: 51 или 55 WO 2008/119567;

(d) участка VL, как показано в SEQ ID NO: 71 или 75 WO 2008/119567, и участка VH, как показано в SEQ ID NO: 69 или 73 WO 2008/119567;

(e) участка VL, как показано в SEQ ID NO: 89 или 93 WO 2008/119567, и участка VH, как показано в SEQ ID NO: 87 или 91 WO 2008/119567;

(f) участка VL, как показано в SEQ ID NO: 107 или 111 WO 2008/119567, и участка VH, как показано в SEQ ID NO: 105 или 109 WO 2008/119567;

(g) участка VL, как показано в SEQ ID NO: 125 или 129 WO 2008/119567, и участка VH, как показано в SEQ ID NO: 123 или 127 WO 2008/119567;

(h) участка VL, как показано в SEQ ID NO: 143 или 147 WO 2008/119567, и участка VH, как показано в SEQ ID NO: 141 или 145 WO 2008/119567;

(i) участка VL, как показано в SEQ ID NO: 161 или 165 WO 2008/119567, и участка VH, как показано в SEQ ID NO: 159 или 163 WO 2008/119567; и

(j) участка VL, как показано в SEQ ID NO: 179 или 183 WO 2008/119567, и участка VH, как показано в SEQ ID NO: 177 или 181 WO 2008/119567.

Вышеуказанные связывающие домены, которые связываются с CD3 человека и описаны в WO 2008/119567, также представлены в настоящих SEQ ID NO: 445-537.

Согласно предпочтительному варианту реализации конструкции антитела по данному изобретению связывающие домены и, в частности, второй связывающий домен (который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки) имеют следующий формат: Пары участков VH и участков VL находятся в формате одноцепочечного антитела (scFv). Участки VH и VL расположены в порядке VH-VL или VL-VH. Предпочтительно, чтобы участок VH был помещен N-концом к линкерной последовательности, а участок VL был позиционирован с C-конца последовательности линкера.

Предпочтительный вариант реализации описанной выше конструкции антитела по данному изобретению характеризуется вторым связывающим доменом, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 или 187 WO 2008/119567.

В одном варианте реализации данного изобретения конструкция антитела имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из тех последовательностей, которые представлены в SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 238 и SEQ ID NO: 248.

В другом варианте реализации данного изобретения конструкция антитела имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из тех последовательностей, которые представлены в SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 380, SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 382, SEQ ID NO: 383, SEQ ID NO: 384, SEQ ID NO: 385, SEQ ID NO: 386, SEQ ID NO: 387, SEQ ID NO: 388 и SEQ ID NO: 389.

В другом варианте реализации данного изобретения конструкция антитела имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из тех последовательностей, которые представлены в SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 308, SEQ ID NO: 318, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO:

338, SEQ ID NO: 348 и SEQ ID NO: 358.

Также предполагаются модификации аминокислотных последовательностей конструкций антител, описанных в данном документе. Например, может быть желательным улучшение средства и/или других биологических свойств конструкции антитела. Варианты аминокислотных последовательностей конструкций антитела получают путем внесения соответствующих нуклеотидных модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую конструкцию антитела, или путем пептидного синтеза. Все описанные ниже модификации аминокислотной последовательности должны приводить к конструкции антитела, которая по-прежнему сохраняет желаемую биологическую активность (связывание с CDH3 и CD3) немодифицированной родительской молекулы.

Термин "аминокислота" или "аминокислотный остаток" обычно относится к аминокислоте, имеющей признанное в области техники определение, такой как аминокислота, выбранная из группы, состоящей из: аланина (Ala или A); аргинин (Arg или R); аспарагина (Asn или N); аспарагиновой кислоты (Asp или D); цистеина (Cys или C); глутамина (Gln или Q); глутаминовой кислоты (Glu или E); глицина (Gly или G); гистидина (His или H); изолейцина (Ile или I); лейцина (Leu или L); лизина (Lys или K); метионина (Met или M); фенилаланина (Phe или F); пролина (Pro или P); серина (Ser или S); треонина (Thr или T); триптофана (Trp или W); тирозина (Tyr или Y) и валина (Val или V), хотя могут быть использованы модифицированные, синтетические или редкие аминокислоты. Как правило, аминокислоты могут быть сгруппированы как имеющие неполярную боковую цепь (например, Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); отрицательно заряженную боковую цепь (например, Asp, Glu); положительно заряженную боковую цепь (например, Arg, His, Lys); или незаряженную полярную боковую цепь (например, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp и Tyr).

Аминокислотные модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях конструкции антитела. Для получения конечного конструкта можно внести любую комбинацию делеций, инсерций и замен при условии, что конечный конструкт обладает желательными характеристиками. Аминокислотные замены могут изменять посттрансляционные процессы конструкции антитела, например, изменять число или положение сайтов гликозилирования.

Например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот могут быть вставлены или удалены в каждом из CDR (конечно, в зависимости от их длины), тогда как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 25 аминокислот могут быть вставлены или удалены в каждом из FR. Предпочтительно вставки в аминокислотную последовательность включают N- и/или C-концевые гибриды длиной от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки одного или множества аминокислотных остатков внутри последовательности. Вставной вариант конструкции антитела по изобретению включает слияние с N-концом или C-концом конструкции антитела фермента или слияние с полипептидом, который увеличивает период полувыведения в сыворотке конструкции антитела.

Сайты, представляющие наибольший интерес для осуществления замещающего мутагенеза, включают CDR тяжелой и/или легкой цепи, в частности гипервариабельные участки, но перестройки FR в легкой и/или тяжелой цепи также рассматриваются. Замены предпочтительно представляют собой консервативные замены, как описано в данном документе. Предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот могут быть замещены в CDR, тогда как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 25 аминокислот могут быть замещены в каркасных участках (FR), в зависимости от длины CDR или FR. Например, если последовательность CDR содержит 6 аминокислот, предполагается, что одна, две или три из этих аминокислот замещены. Аналогично, если последовательность CDR содержит 15 аминокислот, предполагается, что одна, две, три, четыре, пять или шесть из этих аминокислот замещены.

Пригодный способ идентификации определенных остатков или участков конструкций антител, которые являются предпочтительными местами для мутагенеза, называется "аланиновым сканирующим мутагенезом", как описано Cunningham and Wells in Science, 244: 1081-1085 (1989). Согласно данному методу идентифицируют остаток или группу остатков-мишеней в границах конструкции антитела (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и замещают их нейтральными или отрицательно заряженными аминокислотами (наиболее предпочтительно аланином или полиаланином) с достижением взаимодействия аминокислот с эпитопом.

Такие положения аминокислот, обнаруживающие функциональную чувствительность к заменам, далее модифицируют введением дополнительных или других вариантов в сайты замен. Таким образом, в то время как сайт или участок введения вариантов аминокислотной последовательности преддетерминирован, природа мутации *per se* не обязательно может быть преддетерминированной. Например, для анализа или оптимизации осуществления мутации в данном сайте аланин-сканирующий или выборочный мутагенез может быть проведен в кодоне-мишени и области-мишени и экспрессируемые варианты антитела подвергают скринингу на оптимальную комбинацию заданной активности. Методы введения мутаций замещения в предопределенные участки в ДНК, имеющие известную последовательность, хорошо известны, например, это мутагенез с праймером M13 и ПЦР-мутагенез. Скрининг мутантов осуществляется с помощью анализов активности связывания антигенов, таких как анализ на связывание с CDH3 или

CD3.

Как правило, если аминокислоты замещены в одном или более, или всех CDR тяжелой и/или легкой цепи, предпочтительно, чтобы полученная тогда "замещенная" последовательность являлась на по меньшей мере 60%, более предпочтительно 65%, еще больше предпочтительно 70%, особенно предпочтительно 75%, более предпочтительно 80% идентичной "оригинальной" последовательности CDR. Это означает, что это зависит от длины CDR, до какой степени он идентичен "замещенной" последовательности. Например, CDR, содержащий 5 аминокислот, предпочтительно на 80% идентичен его замещенной последовательности, чтобы иметь по меньшей мере одну замещенную аминокислоту. Соответственно, CDR конструкции антитела могут иметь разную степень идентичности с их замещенными последовательностями, например, CDRL1 может иметь 80%, тогда как CDRL3 может иметь 90%.

Предпочтительные замещения (или замены) являются консервативными замещениями. Однако любое замещение (включая неконсервативное замещение или одно или более из "иллюстративных замещений", приведенных в табл. 1 ниже) предусматривается до тех пор, пока конструкция антитела сохраняет свою способность связываться через первый связывающий домен и с CD3 или CD3 эпсилон через второй связывающий домен и/или его CDR имеют идентичность с затем замещенной последовательностью (на по меньшей мере 60%, более предпочтительно 65%, еще более предпочтительно 70%, особенно предпочтительно 75%, наиболее предпочтительно 80% идентичной "оригинальной" последовательности CDR).

Консервативные замещения приведены в табл. 1 под заголовком "предпочтительные замещения". Если такие замещения изменяют биологическую активность, то они являются наиболее существенными изменениями и приведены в табл. 1 под заголовком "типичные замещения", или как дополнительно описано ниже по отношению к классам аминокислот, могут быть введены и продукты подвергнуты скринингу.

Таблица 1. Аминокислотные замещения

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

Существенные модификации биологических свойств конструкций антител по данному изобретению сопровождаются избирательными замещениями, которые значительно различаются по способности поддерживать: (а) структуру полипептидного остова в области замещения, например складчатую или спиральную конформацию, (b) заряд или гидрофобность молекулы в сайте-мишени и (с) размеры боковой цепи. Остатки естественного происхождения подразделяются на группы в зависимости от общих свойств боковых цепей: (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile; (2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr; (3) кислые: asp, glu; (4) основные: asn, gln, his, lys, arg; (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: gly, pro и (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замещения приводят к замене представителя одного из этих классов на предста-

вителя другого класса. Цистеиновые остатки, которые не вовлечены в поддержание должной конформации конструкции антитела, также могут быть замещены в основном серином, для усиления устойчивости молекулы к окислению и предотвращения нежелательного перекрестного сшивания. Напротив, цистеиновые связи могут быть введены в молекулу антитела для улучшения ее стабильности (особенно в тех случаях, когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как фрагмент Fv).

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

Примером используемого алгоритма является PILEUP. PILEUP создает множественное выравнивание последовательностей из группы родственных последовательностей с использованием прогрессивного, попарного выравнивания. Также существует возможность построения дерева, показывающего групповые взаимосвязи, используемые для создания выравнивания. PILEUP использует упрощение прогрессивного метода выравнивания Feng & Doolittle, 1987 год, *J. Mol. Evol.* 35:351-360; метод аналогичен тому, который описан у Higgins и Sharp, 1989 год, *CABIOS* 5:151-153. Применяемые параметры PILEUP включают вес гэпа по умолчанию 300, вес длины гэпа по умолчанию 0,10 и взвешенные концевые гэпы.

Другим примером применяемого алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 и Karin et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787. Особенноподходящей программой BLAST является программа WU-BLAST-2, которая была получена из Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480. WU-BLAST-2 использует несколько параметров поиска, большинство из которых имеют установленные значения по умолчанию. Регулируемые параметры устанавливаются со следующими значениями для белков: длина перекрытия = 1, доля перекрытия = 0,125, пороговая длина сегмента, T = 11. Параметры HSP S и HSP S2 являются динамическими величинами и устанавливаются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, против которой проводится поиск представляющей интерес последовательности; при этом данные величины можно корректировать для повышения чувствительности.

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

В общем случае аминокислотная гомология, сходство или идентичность между отдельными вариантами CDR составляет по меньшей мере 60% по отношению к проиллюстрированным в данном документе последовательностям и, как правило, с предпочтительно возрастающей гомологией или идентичностью, составляющей по меньшей мере 65 или 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75 или 80%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и практически 100%. Аналогично, процент (%) идентичности нуклеотидных последовательностей по отношению к нуклеотидной последовательности связывающий белков, идентифицированных в данном документе представлен как процентная доля нуклеотидных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны нуклеотидным остаткам в кодирующей последовательности антитела. В конкретном способе используют модуль BLASTN WU-BLAST-2 с установленными по умолчанию параметрами, с длиной перекрытия и долей перекрытия, установленными на 1 и 0,125 соответственно.

В общем случае нуклеотидная гомология, сходство или идентичность между нуклеотидными последовательностями, кодирующими отдельные варианты CDR, и нуклеотидными последовательностями, изображенными в данном документе, составляют по меньшей мере 60% и более типично с предпочтительными возрастающими гомологиями или идентичностью, равной по меньшей мере 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 и почти 100%. Таким образом, "вариант CDR" представляет собой вариант с указанной гомологией, сходством или идентичностью с родительским CDR по изобретению и разделяет биологическую функцию, включая, но не ограничиваясь ими, по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% специфичности и/или активности родительского CDR.

В одном варианте реализации изобретения конструкции биспецифического антитела по данному изобретению демонстрируют высокие мономерные выходы в стандартных условиях масштабирования, например, в стандартном двухэтапном процессе очистки. Предпочтительно выход мономера конструкций антител согласно изобретению, составляет  $\geq 0,25$  мг/л супернатанта, более предпочтительно  $\geq 0,5$  мг/л, еще более предпочтительно  $\geq 1$  мг/л и наиболее предпочтительно  $\geq 3$  мг/л супернатанта.

Аналогично выход изомформ димерных конструкций антител и, следовательно, процент мономеров конструкций антитела может быть определен (то есть мономер: (мономер+димер)). Производительность мономерных и димерных конструкций антител и рассчитанный процент мономера могут, например, получать на стадии очистки SEC, полученной из супернатанта культуры, из стандартизированного производственного процесса во вращающихся флаконах. В одном варианте реализации изобретения процент мономеров конструкций антител составляет  $\geq 80\%$ , более предпочтительно  $\geq 85\%$ , еще более предпочтительно  $\geq 90\%$  и наиболее предпочтительно  $\geq 95\%$ .

В еще одном варианте реализации изобретения процент идентичности конструкций антител зародышевой линии человека по изобретению составляет  $\geq 70\%$  или  $\geq 75\%$ , более предпочтительно  $\geq 80\%$  или  $\geq 85\%$ , еще более предпочтительно  $\geq 90\%$  и наиболее предпочтительно  $\geq 95\%$  (См. пример 7). Считается, что идентичность с продуктами генов антител зародышевой линии человека является важной особенностью для снижения риска использования терапевтических белков для индукции иммунного ответа против лекарственного средства у пациента во время лечения. Hwang и Foote ("Immunogenicity of engineered antibodies"; Methods 36 (2005) 3-10) продемонстрировали, что уменьшение количества частей (полученных не от человека) лекарственных конструкций антител приводит к снижению риска индуцирования антител к лекарственным средствам у пациентов во время лечения. Сравнивая исчерпывающее количество клинически оцениваемых антител и соответствующих данных иммуногенности, показано, что гуманизация V-участков антител делает белок менее иммуногенным (в среднем 5,1% пациентов), чем антитела, несущие неизмененные не человеческие V-участки (в среднем 23,59% пациентов). Следовательно, более высокая степень идентичности с последовательностями человека является желательной для белковой терапии на основе V-участка в форме конструкций антител. Для этой цели определения идентичности зародышевой линии, V-участки VL могут быть выровнены с аминокислотными последовательностями сегментов V и сегментов J зародышевой линии человека (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), используя программное обеспечение Vector NTI и аминокислотную последовательность, рассчитанная путем деления идентичных аминокислотных остатков на общее количество аминокислотных остатков VL в процентах. То же самое можно сделать для сегментов VH (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), за исключением того, что VH CDR3 может быть исключен из-за его большого разнообразия и отсутствия существующих паттернов выравнивания VH CDR3 зародышевой линии человека. Затем можно использовать рекомбинантные методы для увеличения идентичности последовательностей генов зародышевой линии человека.

В одном варианте реализации конструкции антитела имеют предпочтительную стабильность в плазме (соотношение  $EC_{50}$  с плазмой к  $EC_{50}$  без плазмы)  $\leq 5$ , более предпочтительно  $\leq 4$  или  $\leq 3,5$ , еще более предпочтительно  $\leq 3$  или  $\leq 2,5$ , и наиболее предпочтительно  $\leq 2$  или  $\leq 1,5$  или  $\leq 1$ . Стабильность в плазме конструкции антитела может быть протестирована путем инкубации конструкции в плазме человека при  $37^{\circ}C$  в течение 24 ч с последующим определением  $EC_{50}$  в анализе цитотоксичности с высвобождением 51-хрома. Эффекторные клетки в анализе цитотоксичности могут стимулировать обогащенные CD8-положительные Т-клетки человека. Клетки-мишени могут, например, представлять собой клетки СНО, трансфицированные CDH3 человека. Коэффициент эффектора для целевой клетки (Е:Т) можно выбрать как 10:1. Пул плазмы человека, используемый для этой цели, получен из крови здоровых доноров, собранных шприцами, покрытыми ЭДТА. Клеточные компоненты удаляют центрифугированием, и верхнюю фазу плазмы собирают и затем объединяют. В качестве контроля конструкции антител разводят непосредственно перед анализом цитотоксичности в среде RPMI-1640. Стабильность в плазме рассчитывают, как отношение  $EC_{50}$  (после инкубации плазмы) к  $EC_{50}$  (контроль) (См. пример 11).

Предпочтительно, чтобы превращение мономер-димер конструкций антител по изобретению было низким. Превращение может быть измерено в разных условиях и проанализировано с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии. Например, инкубация мономерных изоформ конструкций антител может быть проведена в течение 7 дней при  $37^{\circ}C$  и концентрации, например, 100 мкг/мл или 250 мкг/мл в инкубаторе. В этих условиях предпочтительно, чтобы конструкции антител по изобретению демонстрировали процентное содержание димера, составляющее  $\leq 5\%$ , более предпочтительно  $\leq 4\%$ , еще более предпочтительно  $\leq 3\%$ , еще более предпочтительно  $\leq 2,5\%$ , еще более предпочтительно  $\leq 2\%$ , еще более предпочтительно  $\leq 1,5\%$  и наиболее предпочтительно  $\leq 1\%$  (См. пример 9).

Также предпочтительно, чтобы конструкции биспецифического антитела по данному изобретению имели очень низкое димерное превращение после ряда циклов замораживания/оттаивания. Например, мономерный конструкции антитела доводится до концентрации, равной 250 мкг/мл в оригинальном буфере для препарата и подвергается трем циклам замораживания/размораживания (замораживание при  $-80^{\circ}C$  в течение 30 мин с последующим размораживания в течение 30 мин при комнатной температуре), а

затем высокоэффективной SEC для определения процента первоначально мономерной конструкции антитела, которая была преобразована в димерную конструкцию антитела. Предпочтительно димерные проценты конструкций биспецифического антитела составляют  $\leq 5\%$ , более предпочтительно  $\leq 4\%$ , еще более предпочтительно  $\leq 3\%$ , еще более предпочтительно  $\leq 2,5\%$ , еще более предпочтительно  $\leq 2\%$ , еще более предпочтительно  $\leq 1,5\%$ , и наиболее предпочтительно  $\leq 1\%$ , например, после трех циклов замораживания/размораживания.

Биспецифические конструкции антител по данному изобретению предпочтительно демонстрируют благоприятную термостабильность с температурами агрегации выше  $50^\circ\text{C}$  или выше  $52^\circ\text{C}$ , более предпочтительно выше  $54^\circ\text{C}$  или выше  $55^\circ\text{C}$ , еще более предпочтительно выше  $56^\circ\text{C}$  или выше  $57^\circ\text{C}$ , и наиболее предпочтительно выше  $58^\circ\text{C}$  или выше  $59^\circ\text{C}$ . Параметр термостабильности может быть определен в терминах температуры агрегации антител следующим образом: раствор антитела в концентрации  $250\text{ мкг/мл}$  переносят в одноразовую кювету и помещают в устройство динамического рассеяния света. Образец нагревают от  $40$  до  $70^\circ\text{C}$  со скоростью нагрева, равной  $0,5^\circ\text{C/мин}$  с постоянным получением измеренного радиуса. Для расчета температуры агрегации антитела используют увеличение радиуса, указывающего плавление белка и агрегацию (См. пример 10).

Альтернативно, кривые температурного плавления могут быть определены с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) для определения внутренней биофизической устойчивости белков конструкций антител. Эти эксперименты выполняются с использованием устройства VP-DSC MicroCal LLC (Northampton, штат Массачусетс, США). Захват энергии образца, содержащего конструкцию антитела, регистрируют от  $20$  до  $90^\circ\text{C}$  по сравнению с образцом, содержащим только буфер лекарственного средства. Конструкции антител доводят до конечной концентрации, равной  $250\text{ мкг/мл}$ , например, в буфере SEC. Для записи соответствующей кривой плавления общую температуру образца увеличивают ступенчато. При каждой температуре регистрируется поглощение энергии образца и буферного раствора лекарственного средства. Разница в поглощении энергии  $C_p$  (ккал/моль/ $^\circ\text{C}$ ) образца минус эталонная величина нанесена на график относительно соответствующей температуры. Температура плавления определяется как температура при первом максимуме поглощения энергии.

Кроме того, предполагается, что биспецифические антитела CDH3 $\times$ CD3 по изобретению не перекрестно реагируют с (например, не связываются) с паралогами CDH3 человека - CDH1, CDH2, CDH4 и CDH5. Кроме того, предполагается, что биспецифические антитела CDH3 $\times$ CD3 по изобретению не перекрестно реагируют с (например, не связываются) с паралогами CDH3 макака/яванского макака - CDH1, CDH2, CDH4 и CDH5. См. пример 6. Биспецифические антитела CDH3 $\times$ CD3 по изобретению также предусматривают наличие мутности (измеренной OD340 после доведения концентрации очищенного мономерного антитела до  $2,5\text{ мг/мл}$  и ночной инкубации)  $\leq 0,1$ , наиболее предпочтительно  $\leq 0,05$  (См. пример 12).

В еще одном варианте реализации изобретения конструкция антитела по изобретению является стабильной при кислом pH. Чем более толерантно конструкция антитела ведет себя при нефизиологическом pH, таком как pH  $5,5$  (pH, который требуется для запуска, например, катионообменной хроматографии), тем выше восстановление конструкции антитела, элюированной из ионообменной колонки, относительно общего количества загруженного белка. Восстановление конструкции антитела из ионной (например, катионной) обменной колонки при pH  $5,5$  предпочтительно составляет  $\geq 30\%$ , более предпочтительно  $\geq 40\%$ , более предпочтительно  $\geq 50\%$ , еще более предпочтительно  $\geq 60\%$ , еще более предпочтительно  $\geq 70\%$ , еще более предпочтительно  $\geq 80\%$  и наиболее предпочтительно  $\geq 90\%$ .

Кроме того, предполагается, что конструкции биспецифического антитела по данному изобретению проявляют терапевтическую эффективность или противоопухолевую активность. Это может быть, например, оценено в исследовании, как описано в примере 14. Специалист в данной области знает, как модифицировать или адаптировать определенные параметры этого исследования, такие как количество инъецированных опухолевых клеток, сайт инъекции, количество трансплантированных Т-клеток человека, количество биспецифических конструкций антител, подлежащих введению, и сроки, но при этом достигая значимого и воспроизводимого результата. Предпочтительно ингибирование роста опухоли T/C [%] составляет  $\leq 70$  или  $\leq 60$ , более предпочтительно  $\leq 50$  или  $\leq 40$ , еще более предпочтительно  $\leq 30$  или  $\leq 20$  и наиболее предпочтительно  $\leq 10$  или  $\leq 5$  или даже  $\leq 2,5$ .

В данном изобретении также предложена молекула полинуклеотида/нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию антитела по изобретению.

Полинуклеотид представляет собой биополимер, состоящий из 13 или более нуклеотидных мономеров, ковалентно связанных в цепь. ДНК (такая как кДНК) и РНК (такая как мРНК) являются примерами полинуклеотидов с отчетливой биологической функцией. Нуклеотиды являются органическими молекулами, которые служат мономерами или субъединицами молекул нуклеиновых кислот, таких как ДНК или РНК. Молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотид может быть двухцепочечной и одноцепочечной, линейной и циклической. Она предпочтительно содержится в векторе, который предпочтительно содержится в клетке-хозяине. Указанная клетка-хозяин, например, после трансформации или трансфекции с помощью вектора или полинуклеотида по изобретению, способна экспрессировать конст-

рукцию антитела. Для этой цели молекула полинуклеотида или нуклеиновой кислоты функционально связана с контрольными последовательностями.

Генетический код представляет собой набор правил, посредством которых информация, закодированная в генетическом материале (нуклеиновые кислоты), транслируется в белки. Биологическое декодирование в живых клетках осуществляется рибосомой, которая связывает аминокислоты в порядке, определенном мРНК, с использованием молекул тРНК для переноса аминокислот и считывания трех нуклеотидов мРНК за раз. Код определяет, как последовательности этих нуклеотидных триплетов, называемых кодонами, определяют, какая аминокислота будет добавляться следующей во время синтеза белка. За некоторыми исключениями, трехнуклеотидный кодон в последовательности нуклеиновой кислоты определяет одну аминокислоту. Поскольку подавляющее большинство генов кодируется точно таким же кодом, этот конкретный код часто называют каноническим или стандартным генетическим кодом. Хотя генетический код определяет последовательность белка для данного кодирующего участка, другие геномные участки могут влиять на то, когда и где продуцируются эти белки.

Кроме того, в данном изобретении предложен вектор, содержащий молекулу полинуклеотида/нуклеиновой кислоты по изобретению.

Вектор представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, используемую в качестве носителя для переноса (чужеродного) генетического материала в клетку. Термин "вектор" охватывает, но не ограничивается ими - плазмиды, вирусы, космиды и искусственные хромосомы. В общем, сконструированные векторы содержат источник репликации, сайт множественного клонирования и селективируемый маркер. Сам вектор, как правило, представляет собой нуклеотидную последовательность, обычно последовательность ДНК, которая содержит вставку (трансген) и большую последовательность, которая служит в качестве "основной цепи" вектора. Современные векторы могут содержать дополнительные черты, помимо трансгенной вставки и каркаса: промотор, генетический маркер, резистентность к антибиотикам, репортерный ген, последовательность нацеливания, метку очистки белка. Векторы, называемые векторами экспрессии (конструкции экспрессии), специально предназначены для экспрессии трансгена в клетке-мишени и, как правило, имеют контрольные последовательности.

Термин "контрольные последовательности" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Контрольные последовательности, которые подходят для прокариот, например, включают промотор, необязательную операторную последовательность и сайт связывания рибосом. Известно, что в эукариотических клетках используются промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", когда она помещена в функциональную зависимость от другой последовательности нуклеиновой кислоты. Например, ДНК предпоследовательности или секреторного лидера функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется как белок-прекурсор, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы облегчить трансляцию. В целом, "функционально связанный" означает, что последовательности ДНК, будучи связанными, являются непрерывными и, в случае наличия секреторного лидера, непрерывными и в фазе считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть смежными. Образование связи осуществляют путем лигирования на подходящих рестрикционных сайтах. Если такие сайты отсутствуют, применяются синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры, в соответствии с обычной практикой.

"Трансфекция" представляет собой процесс преднамеренного введения молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов (включая векторы) в клетки-мишени. Этот термин в основном используется для невирусных способов в эукариотических клетках. Трансдукция часто используется для описания опосредованной вирусом передачи молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов. Трансфекция клеток животных обычно включает открытие кратковременных пор или "отверстий" в клеточной мембране, чтобы обеспечить поглощение материала. Трансфекцию можно проводить с использованием фосфата кальция, путем электропорации, путем сжатия клеток или путем смешивания катионного липида с материалом для получения липосом, которые сливаются с клеточной мембраной и вносят свое содержимое внутрь.

Термин "трансформация" используется для описания невирусного переноса молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов (включая векторы) в бактерии, а также в эукариотические клетки, не являющиеся животными, включая растительные клетки. Таким образом, трансформация является генетическим изменением бактериальной или неживотной эукариотической клетки, являющаяся результатом прямого поглощения через клеточную мембрану(ы) из ее окружения и последующего включения экзогенного генетического материала (молекул нуклеиновой кислоты). Трансформация может быть осуществлена с помощью искусственных средств. Для трансформации клетки или бактерии должны находиться в состоянии компетентности, что может проявляться как ограниченный по времени ответ на условия окружающей среды, такие как истощение и плотность клеток.

Кроме того, в данном изобретении предложена клетка-хозяин, трансформированная или трансфи-

цированная молекулой полинуклеотида/нуклеиновой кислоты или вектором по изобретению.

Используемые в данном документе термины "клетка-хозяин" или "клетка-реципиент" предназначены для включения любой отдельной клетки или клеточной культуры, которая может быть или является реципиентом векторов, молекул экзогенной нуклеиновой кислоты и полинуклеотидов, кодирующих конструкцию антитела по данному изобретению; и/или реципиентов самой конструкции антитела. Введение соответствующего материала в клетку осуществляют посредством трансформации, трансфекции и тому подобного. Термин "клетка-хозяин" также предназначен для включения потомства или потенциального потомства одной клетки. Поскольку определенные изменения могут произойти в последующих поколениях из-за естественной, случайной или преднамеренной мутации, или из-за воздействий окружающей среды, такое потомство не может фактически быть полностью идентичным (в морфологии или геноме, или полном комплементе ДНК) родительской клетке, но все еще включено в сферу действия термина, используемого в данном документе. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические или эукариотические клетки, а также включают, но не ограничиваются ими, бактерии, клетки дрожжей, клетки грибов, клетки растений и клетки животных, такие как клетки насекомых и клетки млекопитающих, например, мыши, крысы, макака или человека.

Конструкция антитела по изобретению может быть получена в бактериях. После экспрессии конструкция антитела по изобретению выделяют из клеточной пасты *E. coli* в растворимой фракции и могут быть очищены с помощью, например, аффинной хроматографии и/или исключения по размеру. Конечную очистку можно выполнить аналогично способу очистки антитела, экспрессируемого, например, в клетках СНО.

Кроме прокариот подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии конструкций антитела по изобретению являются эукариотические микроорганизмы, например, мицелиальные грибы или дрожжи. *Saccharomyces cerevisiae*, или пекарские дрожжи, является наиболее широко используемым микроорганизмом-хозяином среди низших эукариот. Однако ряд других родов, видов и штаммов являются общедоступными и пригодными в данном документе, такие как *Schizosaccharomyces pombe*, хозяева из рода *Kluveromyces*, такие как *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans*, и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244 234); *Neurospora crassa*; виды рода *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis* и нитевидные грибы, такие как *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyocladium*, и хозяева из рода *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии конструкции гликозилированного антитела по изобретению получают из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Выявлены многочисленные штаммы и варианты бакуловирусов и соответствующие клетки-хозяева восприимчивых к ним таких насекомых, как *Spodoptera frugiperda* (Кукурузная листовая совка), *Aedes aegypti* (Комар жёлтолихорадочный), *Aedes albopictus* (Азиатский тигровый комар), *Drosophila melanogaster* (Дрозфила фруктовая) и *Bombyx mori* (Тутовый шелкопряд). Общедоступен ряд вирусных штаммов для трансфекции, например, варианта L-1 *Autographa californica* NPV и штамма Vm-5 *Bombyx mori* NPV; такие вирусы можно использовать в качестве вируса согласно данному изобретению, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

В качестве хозяев могут также использоваться культуры клеток растений хлопка, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата, *Arabidopsis* и табака. Специалистам в данной области техники известны векторы клонирования и экспрессии, полезные при производстве белков в культуре клеток растений. См., например, Hiatt et al., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsaenko et al. (1995) *The Plant J* 8: 745-750, и Fecker et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986.

Однако наибольший интерес проявляется в отношении клеток позвоночных, а размножение клеток позвоночных в культуре (тканевой культуре) стало повседневной процедурой. Примерами подходящих линий клеток млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); эмбриональная линия почки человека (293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, которые описаны в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36: 59 (1977)); клетки почек новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомяка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); клетки Сертоли мышей (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы буффало (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, 1413 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 60562, ATCC CCL5 1); клетки TRI (Mather et al., *Annals N. Y Acad. Sci.* (1982) 383: 44-68); клетки MRC 5; клетки FS4 и линию гепатомы человека (Hep G2).

В еще одном варианте реализации изобретение относится к способу получения конструкции антитела по изобретению, причем указанный способ включает культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях, позволяющих экспрессировать конструкции антитела по изобретению, и восстановление продуцированной конструкции антитела из культуры.

Используемый в данном документе термин "культивирование" относится к поддержанию, диффе-

ренцировке, росту, пролиферации и/или размножению клеток *in vitro* в подходящих условиях на среде. Термин "экспрессия" включает любой этап, участвующий в продуцировании конструкции антитела по изобретению, включая, но не ограничиваясь этим, транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционную модификацию и секрецию.

При использовании рекомбинантных методик конструкцию антитела можно продуцировать внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или напрямую секретировать в среду. При использовании рекомбинантных методик конструкцию антитела можно продуцировать внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или напрямую секретировать в среду. В Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) описана процедура выделения антител, секретируемых в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, массу клеток размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3.5), ЭДТА и фенолметилсульфонилхлорида (PMSF) в течение приблизительно 30 мин. Остатки клеток можно удалить центрифугированием. Если антитело секретируется в среду, надосадочную жидкость из таких систем экспрессии обычно сначала концентрируют с помощью доступных для приобретения фильтров для концентрирования белка, например, установок ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Для ингибирования протеолиза на любом из предыдущих этапов можно включать ингибитор протеаз, например PMSF, а для предотвращения роста случайных контаминантов можно добавлять антибиотики.

Конструкция антитела по изобретению, полученная из клеток-хозяев, может быть выделена или очищена с использованием, например, гидроксилпатитовой хроматографии, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии. Кроме того, в зависимости от антитела, подлежащего очистке, доступны другие методики очистки белка, например, фракционирование на ионообменной колонке, преципитация с этанолом, обращенно-фазная ВЭЖХ, хроматография на гепарин-SEPHAROSE™, хроматография на анионно- или катионообменной смоле (например, на колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, электрофорез в ДСН-ПААГ и преципитация с сульфатом аммония. Когда конструкция антитела по изобретению содержит домен СН3, смола Bakerbond ABX (J.T. Baker, Филипсбург, штат Нью-Джерси) полезна для очистки.

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

Кроме того, в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию антитела по изобретению или конструкцию антитела, полученную в соответствии со способом по изобретению.

Используемый в данном документе термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, которая подходит для введения пациенту, предпочтительно человеку. Особенно предпочтительная фармацевтическая композиция по данному изобретению содержит одну или более конструкцию(й) антитела по изобретению, предпочтительно в терапевтически эффективном количестве. Предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит подходящие композиции одного или более (фармацевтически эффективных) носителей, стабилизаторов, эксципиентов, разбавителей, солюбилизаторов, поверхностно-активных веществ, эмульгаторов, консервантов и/или адьювантов. Приемлемые составляющие композиции предпочтительно являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях. Фармацевтические композиции по изобретению включают, но не ограничиваются ими, жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции.

Композиции по изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый носитель. В общем, используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает любой и все водные и неводные растворы, стерильные растворы, растворители, буферы, например, фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), воду, суспензии, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих агентов, липосомы, дисперсионные среды и покрытия, которые совместимы с фармацевтическим введением, в частности, с парентеральным введением. Использование таких сред и агентов в фармацевтических композициях хорошо известно в данной области техники, и композиции, содержащие такие носители, могут быть составлены с помощью известных общепринятых способов.

В некоторых вариантах реализации изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие конструкцию антитела по изобретению, и дополнительно один или более эксципиентов, таких как те, которые описаны в данном разделе и в другом месте в данном документе. Эксципиенты могут быть использованы в данном изобретении в этом отношении для самых разных целей, таких как регулирование физических, химических или биологических свойств композиций, таких как регулирование вязкости и/или способов по изобретению для повышения эффективности и/или стабилизации таких составов и процессов против деградации и порчи, связанные, например, с напряжениями, возникающими при изготовлении, транспортировке, хранении, предварительном приготовлении, введении и после этого.

В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция может содержать материалы для препаратов для модификации, поддержания или сохранения, например pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости рас-

творения или высвобождения, всасывания или проникновения композиции (см. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18<sup>th</sup> Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company). В таких вариантах реализации изобретения подходящие материалы состава могут включать, но не ограничиваются ими:

аминокислоты, такие как глицин, аланин, глутамин, аспарагин, треонин, пролин, 2-фенилаланин, включая заряженные аминокислоты, предпочтительно лизин, ацетат лизина, аргинин, глутамат и/или гистидин

противомикробные средства, такие как антибактериальные и противогрибковые средства

антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, метионин, сульфит натрия или гидросульфит натрия;

буферы, буферные системы и буферные агенты, которые используются для поддержания композиции при физиологическом pH или при несколько более низком pH, обычно в диапазоне pH от около 5 до около 8 или 9; примерами буферов являются борат, бикарбонат, трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты, сукцинат, фосфат, гистидин и ацетат; например, трис-буфер, с pH около 7,0-8,5, или ацетатного буфера, с pH около 4,0-5,5;

неводные растворители, такие как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат;

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

биоразлагаемые полимеры, такие как сложные полиэфиры;

объемобразующие агенты, такие как маннит или глицин;

хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК);

изотонические и абсорбирующие задерживающие агенты;

комплексообразующие агенты, такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин)

филлеры;

моносахариды; дисахариды; и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); углеводы могут быть невозстанавливаемыми сахарами, предпочтительно трегалозой, сахарозой, октасульфатом, сорбитом или ксилитом;

(низкомолекулярные) белки, полипептиды или белковые носители, такие как человеческий или бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, предпочтительно человеческого происхождения;

красители и ароматизаторы;

серосодержащие восстановители, такие как глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, [альфа]-монотиоглицерин и тиосульфат натрия;

разбавители;

эмульгаторы;

гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон;

солеобразующие противоионы, такие как натрий;

консерванты, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты, инертные газы и тому подобное; примерами являются: бензалконийхлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенэтиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода);

комплексы металлов, такие как Zn-белковые комплексы;

растворители и соразтворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль);

сахара и спирты сахаров, такие как трегалоза, сахароза, октасульфат, маннит, сорбит или ксилит, станиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, миониситоза, галактоза, лактит, рибитол, мионизитол, галактит, глицерин, циклитолы (например, инозит) гликоль; и многоатомные спирты сахаров;

суспендирующие агенты;

поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты, такие как плуроники, ПЭГ, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал; поверхностно-активные вещества могут представлять собой детергенты, предпочтительно с молекулярной массой > 1,2 кДа и/или полиэфир, предпочтительно с молекулярной массой > 3 кДа; неограничивающие примеры предпочтительных детергентов - Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 и Tween 85; неограничивающие примеры для предпочтительных полиэфиров представляют собой ПЭГ 3000, ПЭГ 3350, ПЭГ 4000 и ПЭГ 5000;

агенты, улучшающие стабильность, такие как сахароза или сорбит;

усиливающие тоничность агенты, такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит;

парентеральные средства доставки, включая раствор хлорида натрия, декстозу Рингера, декстозу и хлорид натрия, лактированные растворы Рингера или фиксированные масла;

наполнители для внутривенного введения включая растворы для восполнения дефицита жидкости

или питательных веществ, электролитные растворы (например, растворы на основе декстрозы Рингера).

Специалистам в данной области техники очевидно, что различные составляющие фармацевтической композиции (например, перечисленные выше) могут иметь различные эффекты, например, аминокислота может действовать как буфер, стабилизатор и/или антиоксидант; маннит может действовать как наполнитель и/или агент, повышающий тоничность; хлорид натрия может действовать как средство доставки и/или агент, повышающий тоничность; и т.п.

Предполагается, что композиция по изобретению может содержать в дополнение к полипептиду по изобретению, определенному в данном документе, дополнительные биологически активные агенты в зависимости от предполагаемого применения композиции. Такими агентами могут быть лекарственные средства, действующие на желудочно-кишечную систему, лекарственные средства, действующие как цитостатические средства, лекарственные средства, предотвращающие гиперурикемию, лекарственные средства, ингибирующие иммунореактивные реакции (например, кортикостероиды), лекарственные средства, модулирующие воспалительный ответ, лекарственные средства, действующие на систему кровообращения и/или агенты, такие как цитокины, известные из уровня техники. Также предполагается, что конструкция антителя по данному изобретению применяется в совместной терапии, то есть в сочетании с другим противораковым лекарственным средством.

В определенных вариантах реализации изобретения оптимальную фармацевтическую композицию определяет специалист в данной области техники в зависимости, например, от способа введения, формата доставки и необходимой дозировки. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше. В определенных вариантах реализации изобретения такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость *in vivo* высвобождения и скорость *in vivo* выведения конструкций антител согласно изобретению. В определенных вариантах реализации изобретения основная среда или носитель в фармацевтической композиции может по природе быть водной или неводной. Например, подходящим базовым раствором или носителем может быть вода для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственная цереброспинальная жидкость, возможно, дополненные другими материалами, обычными в композициях для парентерального введения. Нейтральный забуференный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином, представляют собой дополнительные типичные среды-носители. В определенных вариантах реализации изобретения композиции, содержащие конструкции антитела по изобретению, можно подготовить к хранению путем смешивания выбранной композиции, имеющей необходимую степень очистки, с необязательными агентами (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, см. выше) в форме лиофилизированной таблетки или водного раствора. Дополнительно в определенных вариантах реализации изобретения конструкцию антитела по изобретению можно получать в виде лиофилизата, используя соответствующие вспомогательные вещества, такие как сахароза.

Если предусмотрено парентеральное введение, терапевтические композиции для применения в данном изобретении могут находиться в форме апиrogenного, парентерально приемлемого водного раствора, содержащего необходимую конструкцию антитела по изобретению в фармацевтически приемлемой несущей среде. В особенности подходящим базовым раствором для парентеральной инъекции является стерильная дистиллированная вода, в которую добавлена конструкция антитела по изобретению, в виде стерильного, изотонического раствора с надлежащим консервантом. В определенных вариантах реализации изобретения приготовление может включать смешивание необходимой молекулы с агентом, таким как инъекционные микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолиевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или пролонгированное высвобождение продукта, который может быть доставлен посредством депо-инъекции. В определенных вариантах реализации изобретения также можно использовать гиалуроновую кислоту, которая способствует продлению периода циркуляции. В определенных вариантах реализации изобретения можно использовать имплантируемые устройства для доставки лекарственных препаратов для внесения необходимой конструкции антитела.

Существование дополнительных фармацевтических композиций очевидно для специалистов в данной области техники, включая лекарственные формы конструкции антитела по изобретению с пролонгированной или контролируемой доставкой/высвобождением. Способы приготовления различных других средств с пролонгированной или контролируемой доставкой, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы и депо-инъекции, также известны специалистам в данной области техники. См., например, Международную патентную заявку № PCT/US 93/00829, которая описывает контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матрицы для пролонгированного высвобождения могут включать полиэферы, гидрогели, полилактиды (как описано в патенте США № 3773919 и публикация Европейской патентной заявки № EP 058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 и Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную ки-

слоту (опубликованная заявка на Европейский патент № EP 133988). Композиции с пролонгированным высвобождением также могут включать липосомы, которые можно изготовить любым из нескольких известных в данной области техники способов. См., например, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:3688-3692; опубликованная заявка на Европейский патент № EP 036676; EP 088046 и EP 143949.

Конструкции антитела можно включить в микрокапсулы, полученные, например, с помощью метода коацервации или межфазной полимеризации (например, микрокапсулы гидроксиметилцеллюлозы или желатина и поли(метилметакрилата), соответственно), в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

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

Другой аспект изобретения включает самозабуференную конструкцию антител по изобретению, которая может быть применена в качестве фармацевтических композиций, как описано в международной патентной заявке WO 06138181A2 (PCT/US 2006/022599). Разнообразные экспозиции доступны по стабилизации белка и материалов, и способов приготовления, полезных в этом отношении, таких как Akakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" в: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), и Randolph et al., "Surfactant-protein interactions", Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), см. особенно в отношении компонентов и способов их получения для самозабуференных белковых композиций в соответствии с настоящим изобретением, особенно в отношении белковых фармацевтических продуктов и процессов для ветеринарных и/или медицинских целей.

Соли могут использоваться в соответствии с некоторыми вариантами реализации изобретения, например, для регулирования ионной силы и/или изотоничности состава и/или для улучшения растворимости и/или физической стабильности белка или другого ингредиента композиции в соответствии с изобретением. Как известно, ионы могут стабилизировать природное состояние белков путем связывания с заряженными остатками на поверхности белка и путем экранирования заряженных и полярных групп в белке и снижения силы их электростатических взаимодействий, притягивающих и отталкивающих взаимодействий. Ионы также могут стабилизировать денатурированное состояние белка путем связывания, в частности, с денатурированными пептидными связями (-CONH) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке также может уменьшать межмолекулярные электростатические взаимодействия и тем самым предотвращать или уменьшать агрегацию белка и нерастворимость.

Ионные виды значительно различаются по их воздействию на белки. Был разработан ряд категорических ранжировок ионов и их влияние на белки, которые могут быть использованы при разработке фармацевтических композиций в соответствии с изобретением. Одним из примеров является серия Хофмейстера, в которой ранжируются ионные и полярные неионные растворы, влияя на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космотропными". Дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропными". Космотропы обычно используют в высоких концентрациях (например, > 1 моль сульфата аммония) для осаждения белков из раствора ("высаливание"). Хаотропы обычно используются для восстановления и/или для сольюбилизации белков ("засоление"). Относительная эффективность ионов к "высаливанию" и "засоления" определяет их положение в серии Хофмейстера.

Свободные аминокислоты могут быть использованы в конструкции антител по изобретению в соответствии с различными вариантами реализации изобретения в качестве наполнителей, стабилизаторов и антиоксидантов, а также других стандартных применений. Для стабилизации белков в препарате можно применять лизин, пролин, серин и аланин. Глицин применяют при лиофилизации, чтобы гарантировать правильную структуру и свойства таблетки. Аргинин можно применять для подавления агрегации белка как в жидких, так и в лиофилизированных препаратах. Метионин применяют в качестве антиоксиданта. Полиолы включают сахара, например, маннитол, сахарозу и сорбитол, многоатомные спирты, такие как, например, глицерол и пропиленгликоль, а также, в целях данного изобретения, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и родственные ему вещества.

Полиолы являются космотропными. Их применяют в качестве стабилизирующих агентов как в жидких, так и в лиофилизированных препаратах, чтобы защитить белки от физических и химических процессов деградации. Также полиолы применяют для корректировки тоничности препаратов. Среди полиолов, пригодных в отдельных вариантах реализации изобретения, существует маннит, обычно ис-

пользуемый для обеспечения структурной стабильности осадка в лиофилизированных составах. Он обеспечивает стабильность конструкции к осаждению. В общем случае его применяют вместе с лиопротектором, например сахарозой. Сорбитол и сахарозу применяют среди предпочтительных агентов для корректировки тоничности и в качестве стабилизаторов для защиты от нагрузок при замораживании-размораживании во время транспортировки или приготовления нерасфасованного продукта во время процесса производства. Восстанавливающие сахара (содержащие свободные альдегидные или кетонные группы), такие как глюкоза и лактоза, могут гликировать поверхностные лизины и остатки аргинина. Поэтому они обычно не относятся к предпочтительным полиолам для применения в соответствии с изобретением. Кроме того, сахара, которые образуют такие реакционноспособные вещества, такие как сахароза, которые гидролизуются до фруктозы и глюкозы в кислых условиях и, следовательно, вызывают гликирование, также не относятся к предпочтительным полиолам изобретения в этом отношении. ПЭГ применяют для стабилизации белков и в качестве криопротектора и в этом отношении его можно использовать в данном изобретении.

Варианты реализации конструкции антитела по изобретению включают еще поверхностно-активные вещества. Молекулы белков могут быть подвержены адсорбции на поверхностях и денатурации и последующей агрегации на границах раздела воздух-жидкость, твердое тело-жидкость и жидкость-жидкость. Эти эффекты в общем случае обратно пропорциональны концентрации белка. Эти вредные взаимодействия в общем случае обратно пропорциональны концентрации белка и, как правило, усугубляются при физической тряске, такой, которая возникает во время транспортировки и отгрузки продукта. Поверхностно активные вещества обычно используют для предотвращения, минимизации или снижения такой поверхностной адсорбции. Подходящие сурфактанты в изобретении в этом отношении включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие эфиры жирных кислот сорбитан полиэтоксилатов и полоксамер 188. Также поверхностно активные вещества традиционно используют для регуляции конформационной стабильности белков. Использование поверхностно-активных веществ в этом отношении специфично для белка, поскольку любое данное поверхностно-активное вещество обычно стабилизирует некоторые белки и дестабилизирует другие.

Полисорбаты восприимчивы к окислительной деградации и часто, как указано, содержат достаточное количество пероксидов, чтобы вызвать окисление боковых цепей белка, особенно метионина. Следовательно, полисорбаты следует использовать осторожно, а при их использовании следует применять при их наименьшей эффективной концентрации. В этом отношении полисорбаты представляют собой общее правило, согласно которому эксципиенты следует использовать в их наименьших эффективных концентрациях.

Варианты реализации конструкции антитела по изобретению дополнительно включают один или более антиоксидантов. В какой-то степени вредное окисление белков можно предотвратить в фармацевтических композициях, поддерживая надлежащие уровни окружающего кислорода и температуры и избегая воздействия света. Антиоксиданты можно применять также для предотвращения окислительной деградации белков. Среди пригодных антиоксидантов в этом отношении являются восстановители, поглощатели кислорода/свободных радикалов и хелатирующие агенты. Антиоксиданты для применения в терапевтических белковых композициях в соответствии с изобретением предпочтительно являются водорастворимыми и сохраняют свою активность на протяжении всего срока годности продукта. ЭДТК является предпочтительным антиоксидантом в соответствии с изобретением в этом отношении. Антиоксиданты могут повредить белки. Например, восстанавливающие агенты, такие как глутатион, в частности, могут нарушать внутримолекулярные дисульфидные связи. Таким образом, антиоксиданты для использования в изобретении отбираются, среди прочего, для устранения или в достаточной степени уменьшения вероятности того, что они сами повредят белки в составе.

Препараты в соответствии с изобретением могут содержать ионы металлов, которые являются кофакторами белка и которые необходимы для образования координационных комплексов белка, таких как цинк, необходимый для образования определенных суспензий инсулина. Ионы металлов также могут подавлять некоторые процессы, в ходе которых происходит деградация белка. Однако ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, которые деградируют белки. Ионы магния (10-120 мМ) можно применять для подавления изомеризации аспарагиновой кислоты до изоаспарагиновой кислоты. Ионы  $\text{Ca}^+$  (до 100 мМ) могут повысить стабильность дезоксирибонуклеазы человека.  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{Mn}^+$  и  $\text{Zn}^+$ , однако, может дестабилизировать дезоксирибонуклеазу человека (rhDNase). По аналогии,  $\text{Ca}^{+2}$  и  $\text{Sr}^{+2}$  могут стабилизировать фактор VIII, его можно дестабилизировать при помощи ионов  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  и  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  и  $\text{Fe}^{+2}$ , и его агрегация может быть увеличена при помощи  $\text{Al}^{+3}$ .

Варианты реализации конструкции антитела по изобретению дополнительно включают один или более консервантов. Консерванты необходимы при разработке многодозовых парентеральных препаратов, для которых предусмотрено более одного набора из одного и того же контейнера. Их основной функцией является подавление роста микроорганизмов и гарантии стерильности продукта на протяжении срока годности или термина применения лекарственного продукта. Традиционно применяемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты имеют долгую историю использования с низкомолекулярными парентеральными препаратами, разработка белковых составов, со-

держащих консерванты, может быть сложной задачей. Консерванты почти всегда оказывают дестабилизирующее действие (агрегацию) на белки, и это стало основным фактором ограничения их использования в многодозовых белковых составах. На сегодняшний день большинство белковых составов были разработаны только для одноразового применения. Однако, когда возможны многодозовые составы, у них есть дополнительное преимущество, обеспечивающее удобство для пациента и повышенную конкурентоспособность. Хорошим примером является гормон роста человека (hGH), в котором развитие сохранных композиций привело к коммерциализации более удобных, многодозовых устройств для инъекции в формате ручки. В данное время на рынке доступно по меньшей мере четыре таких устройства в формате ручки, содержащие сохранные композиции hGH. Norditropin (жидкость, Novo Nordisk), Nutropin AQ (жидкость, Genentech) & Genotropin (лиофилизированный - двухкамерный картридж, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как Somatropе (Eli Lilly) создан с применением с м-крезолом. При разработке и создании консервированных лекарственных форм необходимо учитывать несколько аспектов. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном продукте должна быть оптимизирована. Это требует тестирования данного консерванта в дозированной форме с диапазонами концентраций, которые придают антимикробную эффективность без ущерба для стабильности белка.

Как и следовало ожидать, разработка жидких композиций, содержащих консерванты, более сложна, чем лиофилизированных составов. Лиофилизированные продукты могут лиофилизироваться без консерванта и восстанавливаться консервантом, содержащим разбавитель во время применения. Это сокращает время, в течение которого консервант контактирует с белком, что значительно минимизирует связанные с этим риски стабильности. При использовании жидких композиций эффективность консерванта и стабильность должны сохраняться в течение всего срока хранения продукта (от 18 до 24 месяцев). Важно отметить, что эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в конечном составе, содержащем активное лекарственное средство и все компоненты наполнителя.

Конструкции антител, описанные в данном документе, могут также быть составлены в виде иммунолипосом. Липосома представляет собой небольшую везикулу, состоящую из различных типов липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активных веществ, которые подходят для доставки лекарственного средства млекопитающему. Компоненты липосомы, как правило, организованы в виде двухслойного состава, схожего с распределением липидов в биологических мембранах. Липосомы, содержащие конструкции антител, получают при помощи способов, известных в данной области техники, такие как те, что описаны в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); патент США № 4485045 и 4544545 и WO 97/38731. Липосомы с увеличенным временем циркуляции описаны в патенте США № 5013556. Особенно подходящие липосомы можно получать при помощи способа обращенно-фазового выпаривания с применением композиции липидов, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и производные фосфатидилэтаноламина с ПЭГ (ПЭГ-PE). Липосомы экструдированы через фильтры с определенным размером пор с получением липосом, имеющих целевой диаметр. Фрагменты Fab' конструкции антитела по данному изобретению могут быть конъюгированы с липосомами, как описано в Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) через реакцию дисульфидного обмена. Химиотерапевтическое средство необязательно содержится в липосоме. См. Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

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

Биологическая активность фармацевтической композиции, определенной в данном документе, может быть определена, например, анализом цитотоксичности, как описано в следующих примерах, в WO 99/54440 или в Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). "Эффективность" или "эффективность in vivo", используемые в данном документе, относятся к реакции на терапию фармацевтической композицией по изобретению, с использованием, например, стандартизованных критериев ответа NCI. Эффективность или эффективность in vivo терапии с применением фармацевтической композиции по изобретению относится к эффективности композиции по прямому назначению, то есть способность композиции вызвать ее желаемый эффект, то есть истощение патологических клеток, например, опухолевых клеток. Эффективность in vivo может контролироваться установленными стандартными методами для соответствующих субъектов болезни, включая, но не ограничиваясь этим, количество лейкоцитов, дифференциалы, сортировку флуоресцентных активированных клеток, аспирацию костного мозга. Кроме того, могут быть использованы различные клинические химические параметры заболевания и другие установленные стандартные методы. Кроме того, компьютерная томография, рентгеновская, ядерно-магнитно-резонансная томография (например, для оценки результатов на основе Национального института рака [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. 1999 Apr; 17(4):1244]), позитронно-эмиссионное томографическое сканирование, количество лейкоцитов, дифференциалы, флу-

оресцентно активированная сортировка клеток, аспирация костного мозга, биопсия/гистология лимфатических узлов и различные клинические химические параметры лимфомы (например, лактатдегидрогеназа) и другие установленные стандартные методы.

Другой важной задачей в разработке лекарственных средств, таких как фармацевтическая композиция по изобретению, является предсказуемая модуляция фармакокинетических свойств. С этой целью можно установить фармакокинетический профиль кандидата лекарственного средства, то есть профиль фармакокинетических параметров, которые влияют на способность конкретного лекарственного средства лечить данное состояние. Фармакокинетические параметры лекарственного средства, влияющие на способность лекарственного средства для лечения определенного заболевания, включают, но не ограничиваются: период полувыведения, объем распределения, метаболизм первого прохода печени и степень связывания сыворотки крови. На эффективность данного лекарственного средства может влиять каждый из указанных выше параметров.

"Период полувыведения" означает время, при котором 50% вводимого лекарственного средства удаляются с помощью биологических процессов, например, метаболизма, выделения и т.д. Под "печеночным метаболизмом первого прохода" подразумевается склонность лекарственного средства к метаболизму при первом контакте с печенью, то есть во время его первого прохождения через печень. "Объем распределения" означает степень удержания лекарственного средства во всех компартментах тела, например, внутриклеточных и внеклеточных пространствах, тканях и органах и т.д., а также распределение лекарственного средства в этих отделениях. "Степень связывания в сыворотке крови" означает склонность лекарственного средства к взаимодействию с белками сыворотки крови и их связывание с белками сыворотки крови, такими как альбумин, что приводит к уменьшению или потере биологической активности лекарственного средства.

Фармакокинетические параметры также включают биодоступность, время задержки (Tlag), Tmax, скорость абсорбции, большее появление и/или Cmax для данного количества вводимого лекарственного средства. "Биодоступность" означает количество лекарственного средства в компартменте крови. "Время задержки" означает задержку времени между введением лекарственного средства и его обнаружением, и измеримостью в крови или плазме. "Tmax" представляет собой время, после которого достигается максимальная концентрация в крови лекарственного средства, а "Cmax" представляет собой концентрацию в крови, максимально полученную с данным лекарственным средством. Время достижения концентрации препарата в крови или ткани, которое требуется для его биологического эффекта, зависит от всех параметров. Фармакокинетические параметры конструкций биспецифических антител, проявляющих кросс-видовую специфичность, которые могут быть определены при доклиническом исследовании на животных у приматов, отличных от шимпанзе, как описано выше, также изложены, например, в публикации Schlereth et al. (*Cancer Immunol. Immunother.* 20 (2005), 1-12).

В одном варианте реализации в данном изобретении предложена конструкция антитела по изобретению или конструкцию антитела, полученная в соответствии со способом по изобретению, для применения в профилактике, лечении или улучшении состояния рака.

Препараты, описанные в данном документе, пригодны в качестве фармацевтических композиций для лечения, уменьшения интенсивности и/или профилактики патологического состояния здоровья, как описано в данном документе у пациента, нуждающегося в этом. Термин "лечение" относится как к терапевтическому воздействию, так и к профилактическим или превентивным мерам. Лечение включает применение или введение препарата в организм, изолированную ткань или клетку у пациента, у которого есть заболевание/расстройство, симптом заболевания/расстройства или предрасположенность к заболеванию/расстройству с целью вылечить, лечить, частично снять симптомы, смягчить, изменить, устранить, улучшить состояние, облегчить или влиять на заболевание, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию.

Используемый в данном документе термин "улучшение состояния" относится к любому улучшению состояния заболевания пациента, имеющего один из типов (метастатических) опухолей или рака, как указано в данном документе, путем введения конструкции антитела в соответствии с изобретением, субъекту, нуждающемуся в этом. Такое улучшение также можно рассматривать как замедление или остановку прогрессирования (метастатической) опухоли или рака у пациента. Используемый в данном документе термин "профилактика" означает предотвращение возникновения или повторного появления пациента, имеющего один из типов (метастатических) опухолей или рака, как указано в данном документе, путем введения конструкции антитела в соответствии с изобретением, субъекту, нуждающемуся в этом.

Термин "заболевание" относится к любому условию, которое могло бы быть устранено при лечении конструкцией антитела или описанной в данном документе фармацевтической композицией. Этот термин охватывает хронические и острые расстройства или заболевания, включая те патологические состояния, которые увеличивают предрасположенность млекопитающего к рассматриваемому заболеванию.

"Новообразование" представляет собой аномальный рост ткани, обычно, но не всегда образующий массу. Когда также образуется масса, ее обычно называют "опухолью". Новообразования или опухоли

могут быть доброкачественными, потенциально злокачественными (предраковыми) или злокачественными. Злокачественные новообразования обычно называют раком. Они обычно вторгаются и разрушают окружающую ткань и могут образовывать метастазы, т.е. они распространяются на другие части, ткани или органы тела. Следовательно, термин "метастатический рак" охватывает метастазы в другие ткани или органы, в отличие от исходной опухоли. Лимфомами и лейкозами являются лимфоидные новообразования. Для целей данного изобретения они также охватываются терминами "опухоль" или "рак".

В предпочтительном варианте реализации в данном изобретении предложена конструкция антитела по изобретению или конструкция антитела, полученная в соответствии со способом по изобретению, для применения в профилактике, лечении или улучшении состояния рака, причем рак выбран из группы, состоящей из карциномы легкого, карциномы головы и шеи, первичной или вторичной опухоли ЦНС, первичной или вторичной опухоли головного мозга, первичной лимфомы ЦНС, опухолей оси позвоночника, глиомы ствола мозга, глиобластомы, аденомы гипофиза, аденокарциномы рака, карциномы пищевода, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичника, НМРЛ (немелкоклеточного рака легкого), МРЛ (мелкоклеточного рака легкого), рака эндометрия, рака шейки матки, рака матки, переходноклеточной карциномы, рака кости, рака поджелудочной железы, рака кожи, кожной или внутриглазной меланомы, рака печени, рака желчного протока, рака желчного пузыря, рака почки, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, желудочно-кишечный (желудочный, колоректальный и дуоденальный) рака, рака тонкого кишечника, рака желчных протоков, рака уретры, почечно-клеточной карциномы, карциномы эндометрия, рака щитовидной железы, рака яичек, плоскоклеточного рака кожи, меланомы, рака желудка, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, остеосаркомы, мезотелиомы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, хронического или острого лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, лимфоцитарных лимфом, множественной миеломы, фибросаркомы, нейробластомы, ретинобластомы и саркомы мягких тканей, и метастатического онкологического заболевания, происходящего из любого из вышеперечисленного. Рак (метастатический) предпочтительно представляет собой Р-кадгерин позитивный или Р-кадгерин экспрессирующий рак.

В другом предпочтительном варианте реализации в данном изобретении предложена конструкция антитела по изобретению или конструкцию антитела, полученная в соответствии со способом по изобретению, для применения в профилактике, лечении или уменьшении интенсивности рака, причем рак представляет собой (метастатическую) плоскоклеточную карциному.

В данном изобретении также предложен способ лечения или улучшения состояния (метастатической) опухоли или рака, включающий стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, конструкции антитела по изобретению или конструкции антитела, полученной в соответствии со способом по изобретению.

В предпочтительном варианте реализации в данном изобретении предложен способ лечения или улучшения состояния рака, причем рак выбран из группы, состоящей из карциномы легкого, карциномы головы и шеи, первичной или вторичной опухоли ЦНС, первичной или вторичной опухоли головного мозга, первичной лимфомы ЦНС, опухолей оси позвоночника, глиомы ствола мозга, глиобластомы, аденомы гипофиза, аденокарциномы рака, карциномы пищевода, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичника, НМРЛ (немелкоклеточного рака легкого), МРЛ (мелкоклеточного рака легкого), рака эндометрия, рака шейки матки, рака матки, переходноклеточной карциномы, рака кости, рака поджелудочной железы, рака кожи, кожной или внутриглазной меланомы, рака печени, рака желчного протока, рака желчного пузыря, рака почки, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, желудочно-кишечный (желудочный, колоректальный и дуоденальный) рака, рака тонкого кишечника, рака желчных протоков, рака уретры, почечно-клеточной карциномы, карциномы эндометрия, рака щитовидной железы, рака яичек, плоскоклеточного рака кожи, меланомы, рака желудка, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, остеосаркомы, мезотелиомы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, хронического или острого лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, лимфоцитарных лимфом, множественной миеломы, фибросаркомы, нейробластомы, ретинобластомы и саркомы мягких тканей и метастатического онкологического заболевания, происходящего из любого из вышеперечисленного, включающий стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, конструкции антитела по изобретению или конструкции антитела, полученной в соответствии со способом по изобретению.

В еще одном предпочтительном варианте реализации в данном изобретении предложен способу лечения или улучшения состояния опухоли или рака, или метастатической опухоли или рака, причем рак представляет собой (метастатическую) плоскоклеточную карциному. Термины "субъект, нуждающийся" или те, кто "нуждается в лечении" включают тех, кто уже имеет нарушение, а также тех, у кого нарушение необходимо предотвратить. Субъект, нуждающийся или "больной", включает людей и других субъектов млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

Конструкция антитела в соответствии с настоящим изобретением, как правило, предназначена для конкретных путей и способов введения, для конкретных дозировок и частот введения, для конкретного лечения конкретных заболеваний, с диапазонами биологической доступности и стойкости, среди прочего. Материалы композиции предпочтительно составлены в концентрациях, приемлемых для места введения.

Таким образом, препараты и композиции могут быть сконструированы в соответствии с изобретением для доставки любым подходящим способом введения. В контексте данного изобретения пути введения включают, но не ограничиваются ими

местное применение (такое как кожное, ингаляционное, назальное, офтальмологическое, аурикулярное/слуховое, вагинальное, мукозальное);

энтеральные пути (такие как пероральный, желудочно-кишечный, подъязычный, сублабиальный, буккальный, ректальный) и

парентеральные пути (такие как внутривенный, внутриартериальный, внутрикостный, внутримышечный, внутримозговой, внутричерепной, эпидуральный, спинальный, подкожный, внутрибрюшинный, экстраамниотический, внутрисуставной, внутрисердечный, внутрикожный, внутриочаговый, внутриматочный, внутривульварный, интравитреальный, трансдермальный, интраназальный, трансмукозальный, интрасиновеальный, внутривитреальный).

Фармацевтические композиции и конструкция антитела по данному изобретению особенно полезны для парентерального введения, например, подкожной или внутривенной доставки, например, путем инъекции, такой как болюсная инъекция, или путем инфузии, такой как непрерывная инфузия. Фармацевтические композиции можно вводить с использованием медицинского устройства. Примеры медицинских устройств для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США №№ 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163.

В частности, в данном изобретении предложено непрерывное введение пригодной композиции. В качестве неограничивающего примера непрерывное или практически непрерывное, то есть продолжительное введение, может быть реализовано с помощью небольшой насосной системы, которую несет пациент для измерения притока терапевтического агента в тело пациента. Фармацевтическую композицию, содержащую конструкцию антитела по изобретению, можно вводить с применением указанных насосных систем. Такие насосные системы обычно известны в данной области и обычно полагаются на периодическую замену картриджей, содержащих терапевтический агент, который нужно вводить. При замене картриджа в такой насосной системе может произойти временное прерывание в противном случае непрерывного потока терапевтического агента в организм пациента. В таком случае фаза введения перед заменой картриджа и фаза введения после замены картриджа все еще будут рассматриваться в значении фармацевтических средств и способов согласно изобретению вместе составляют одно "непрерывное введение" такого терапевтического агента.

Продолжительное или непрерывное введение конструкций антител по изобретению может быть внутривенным или подкожным посредством устройства для доставки жидкости или небольшой насосной системы, содержащей механизм подачи жидкости для выведения жидкости из резервуара и приводной механизм для приведения в действие механизма подачи. Системы насосов для подкожного введения могут содержать иглу или канюлю для проникновения под кожу пациента и доставки пригодной композиции в тело пациента.

Указанные насосные системы могут быть непосредственно закреплены или прикреплены к коже пациента независимо от вены, артерии или кровеносного сосуда, тем самым обеспечивая прямой контакт между насосной системой и кожей пациента. Насосная система может быть прикреплена к коже пациента от 24 ч до нескольких дней. Насосная система может быть небольшого размера с резервуаром для небольших объемов. В качестве неограничивающего примера объем резервуара для пригодной фармацевтической композиции, подлежащей введению, может составлять от 0,1 до 50 мл.

Продолжительное введение также может быть чрескожным путем пластыря, наклеенного на кожу и заменяемого с интервалами. Специалист в данной области техники знает системы пластырей для доставки лекарственных препаратов, пригодных для этой цели. Следует отметить, что трансдермальное введение особенно подходит для непрерывного введения, так как обмен первого израсходованного пластыря может быть успешно осуществлен одновременно с размещением нового второго пластыря, например, на поверхности кожи, непосредственно примыкающей к первому израсходованному пластырю и, непосредственно перед удалением первого израсходованного пластыря. Проблемы с прерыванием потока или сбоем в элементе питания не возникают.

Если фармацевтическая композиция является лиофилизированной, лиофилизированный материал сначала восстанавливают в соответствующей жидкости перед введением. Лيوфилизированный материал может быть восстановлен в, например, бактериостатической воде для инъекций (BWFI), физиологическом солевом растворе, фосфатном буферном растворе (PBS) или в той же композиции, в которой находился белок перед лиофилизацией.

Композиции по данному изобретению могут вводиться субъекту при подходящей дозе, которая может быть определена, например, путем исследований увеличения дозы при введении увеличенных доз конструкции антитела по изобретению, проявляющей кросс-видовую специфичность, описанную в данном документе, приматам, отличным от шимпанзе, например, макакам. Как указано выше, конструкция антитела по изобретению, проявляющая кросс-видовую специфичность, описанную в данном документе, может быть преимущественно применена в идентичной форме при доклиническом исследовании у при-

матов, отличных от шимпанзе, и в качестве лекарственного средства у людей. Режим дозировки будет определяться лечащим врачом и клиническими факторами. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая антропометрические данные пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение для введения, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья, а также другие препараты, которые вводятся одновременно.

Термин "эффективная доза" или "эффективное дозирование" определяется как количество, достаточное для достижения или, по меньшей мере, частичного достижения желаемого эффекта. Термин "терапевтически эффективная доза" определяется как количество, достаточное для лечения или, по меньшей мере, частичной остановки заболевания и его осложнений у пациента, уже страдающего от этого заболевания. Количества или дозы, эффективные для этого применения, будут зависеть от состояния, подлежащего лечению (указание), поставленной конструкции антитела, терапевтического контекста и целей, тяжести заболевания, предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на терапевтический агент, способа введения, размера (массы тела, площади тела или размера органа) и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента, а также общего состояния собственной иммунной системы пациента. Правильная доза может быть скорректирована в соответствии с суждением лечащего врача, так что ее можно вводить пациенту один или более раз в несколько введений и для достижения оптимального терапевтического эффекта.

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

Терапевтическое эффективное количество конструкции антитела по изобретению предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты или продолжительности периодов без симптомов заболевания, или предотвращению ухудшения или инвалидности из-за болезни. Для лечения CDH3-экспрессирующих опухолей терапевтически эффективное количество конструкции антитела по изобретению, например, анти-CDH3/анти-CD3-антитела, предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли на по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80% или по меньшей мере около 90% по сравнению с нелечеными пациентами. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценить в модели животных, прогнозирующей эффективность в опухолях человека.

Фармацевтическую композицию можно вводить в виде единственного терапевтического средства или в сочетании с дополнительными терапиями, такими как противораковые терапии по мере необходимости, например, других белковых и небелковых препаратов. Эти лекарственные средства можно вводить одновременно с композицией, содержащей конструкцию антитела по изобретению, как определено в данном документе, или отдельно до или после введения указанной конструкции антитела во временные определенные интервалы и дозы.

Используемый в данном документе термин "эффективная и нетоксичная доза" относится к допустимой дозе конструкции антитела по изобретению, которая достаточно высока, чтобы вызвать истощение патологических клеток, устранение опухоли, сокращение опухоли или стабилизацию заболевания без или по существу без значительных токсических эффектов. Такие эффективные и нетоксичные дозы могут быть определены, например, при помощи исследований увеличения дозы, описанных в данной области техники, и должны быть ниже дозы, вызывающей серьезные неблагоприятные побочные явления (токсичность, ограничивающая дозу - DLT).

Используемый в данном документе термин "токсичность" относится к токсическому воздействию лекарственного препарата, проявляющегося в неблагоприятных явлениях или тяжелых неблагоприятных явлениях. Эти побочные явления могут относиться к отсутствию переносимости препарата в целом и/или к отсутствию местной толерантности после введения. Токсичность также может включать тератогенные или канцерогенные эффекты, вызванные препаратом.

Термин "безопасность", "безопасность *in vivo*" или "переносимость", используемые в данном документе, определяют введение лекарственного средства, не вызывая серьезных побочных эффектов непосредственно после введения (локальная толерантность) и в течение более длительного периода применения препарата. "Безопасность", "безопасность *in vivo*" или "переносимость" могут быть оценены, например, через регулярные промежутки времени в течение периода лечения и наблюдения. Измерения включают клиническую оценку, например, органые проявления и скрининг лабораторных аномалий. Клиническая оценка может быть проведена, а отклонения от нормальных результатов, записаны/закодированы в соответствии со стандартами NCI-CTC и/или MedDRA. Органые проявления могут включать такие критерии, как аллергия/иммунология, кровь/костный мозг, сердечная аритмия, коагуляция и тому подобное, как указано, например, в общих терминологических критериях неблагоприятных событий v3.0 (CTCAE). Лабораторные параметры, которые могут быть протестированы, включают, например, гематологию, клиническую химию, профиль коагуляции и анализ мочи и исследование других жидкостей организма, таких как сыворотка, плазма, лимфоидная или спинная жидкость, ликвор и тому подобное. Таким

образом, безопасность может быть оценена, например, физическим осмотром, методами визуализации (т.е. ультразвуком, рентгеновским снимком, компьютерной томографией, магнитно-резонансной томографией (МРТ), другими измерениями с помощью технических устройств (например, электрокардиограммой), жизненно важными признаками, путем измерения лабораторных параметров и регистрации неблагоприятных событий. Например, неблагоприятные события приматов, отличных от шимпанзе, в применениях и способах по изобретению могут быть исследованы гистопатологическими и/или гистохимическими методами.

Вышеупомянутые термины также упоминаются, например, в Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; ICH Steering Committee meeting on July 16, 1997.

В еще одном варианте реализации в данном изобретении предложен набор, содержащий конструкцию антитела по изобретению, конструкцию антитела, полученную в соответствии со способом по изобретению, вектор по изобретению и/или клетку-хозяина по изобретению. В контексте данного изобретения термин "комплект" означает два или более компонентов, один из которых соответствует конструкции антитела, фармацевтической композиции, вектору или клетке-хозяину по изобретению, упакованным вместе в контейнер, резервуар или т.п. Таким образом, комплект может быть описан как набор продуктов и/или инструментов, которые достаточны для достижения определенной цели, которая может быть продана как единое целое.

Набор может содержать один или более резервуаров (таких как флаконы, ампулы, контейнеры, шприцы, бутылки, мешки) любой подходящей формы, размера и материала (предпочтительно водонепроницаемые, например, пластик или стекло), содержащие конструкцию антитела или фармацевтическую композицию по данному изобретению в соответствующей дозировке для введения (см. выше). Набор может дополнительно содержать указания для использования (например, в виде брошюры или руководства по применению), средства для введения конструкции антитела по данному изобретению, такие как шприц, насос, инфузор или тому подобное, средство для восстановления конструкции антитела по изобретению и/или средство для разбавления конструкции антитела по изобретению. Также в изобретении предложены наборы с единичной дозой для введения. Набор по изобретению может также содержать первый резервуар, содержащий сухую/лиофилизированную конструкцию антитела и второй резервуар, содержащий водную композицию. В некоторых вариантах реализации данного изобретения предложены комплекты, содержащие однокамерные и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью и шприцы с лиофилизатом).

#### Описание графических материалов

Фиг. 1: Схематическое представление пяти внеклеточных доменов D1-D5 CDH3 человека, CDH3 мыши и одного типичного химерного CDH3 (в данном документе: "D1B мыши"). Ниже снова показаны пять доменов и далее их деление на три субдомена каждый. Интерпретация типичного сигнала FACS (см. "кластеризация эпитопов" в примере 2) показана внизу справа.

Фиг. 2: Последовательность выравнивания CDH3 человека и CDH3 мыши и типичное отображение различных доменов: сигнальный пептид, пропептид, внеклеточные домены D1-D5, трансмембранный домен и цитоплазматический домен. Замены на основе последовательностей мыши пяти внеклеточных доменов вводили в каркас CDH3 человека, см. пример 1, а затем химерные конструкции применяли для кластеризации эпитопов (картирование эпитопов), см. пример 2.

Фиг. 3: CDH3 человека и мыши, а также 20 химерных конструкций CDH3 человека/мыши (пять внеклеточных доменов (ECD) и три субдомена для каждого ECD), экспрессируемые на поверхности клеток CHO, как показано при помощи проточной цитометрии. Экспрессия CDH3 дикого типа человека, CDH3 дикого типа мыши и химерных конструкций CDH3 на клетках CHO была проверена с помощью моноклонального антитела IgG1 против CDH3 человека, который является кросс-реактивным. Связанное моноклональное антитело обнаруживали с помощью Fc-PE против IgG мыши (1:100, 50 мкл; Jackson Immunoresearch № 115-116-071). D1\*): Hu CDH3 D1 mu-CHO.

Фиг. 4: Картирование эпитопов конструкций CDH3. Примеры связывающих молекул, специфичных для разных эпитопных кластеров/неклеточных субдоменов, обнаруженные при помощи картирования эпитопов, химерных конструкций CDH3, см. пример 2.

Фиг. 4A: Связывающие домены D1B.

Фиг. 4B: Связывающие домены D2C.

Фиг. 4C: Связывающие домены D3A.

Фиг. 5:

FACS-связывающий анализ 5 мкг/мл очищенного мономера биспецифического антитела на указанных клеточных линиях. См. также пример 5. Обнаружение связывания биспецифического антитела CDH3xCD3 проводили с помощью собственного антитела мыши, специфичного для CD3-связывающей части биспецифического антитела, с последующим козьим антимышиным Fc-PE. Отрицательный контроль осуществляли только с буфером, с последующим обнаружением антител.

Фиг. 5A и 5B: Биспецифические связывающие домены CDH3xCD3 (фиг. 5A: эпитопный кластер/неклеточный субдомен D2C; фиг. 5B: эпитопный кластер/неклеточный субдомен D3A) были про-

анализированы на их связывание с клетками СНО, трансфицированными CDH3 человека, CD3 человека на Т-клеточной линии HPB-all, клетками СНО, трансфицированными CDH3 макака, CD3 макака на Т-клеточной линии HSC-F, экспрессирующей CD3 макака, CDH3-позитивной линией клеток карциномы человека A431 и клетками СНО, трансфицированными CDH3 мыши (негативный контроль). Связывание обнаруживали во всех случаях, за исключением негативного контроля.

Фиг. 5C и 5D: Биспецифические связывающие домены CDH3xCD3 (фиг. 5C: эпитопный кластер/внеклеточный субдомен D2C; фиг. 5D: эпитопный кластер/внеклеточный субдомен D3A) были проанализированы на их связывание с паралогами CDH3 человека - CDH1, CDH2, CDH4 и CDH5. Связывание с паралогами не обнаруживали. Не обнаруживали связывания dhfr<sup>-/-</sup>/клетками СНО (негативный контроль).

Фиг. 6: Цитотоксическая активность стимулированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток человека против клеток СНО, трансфицированных CDH3 человека в присутствии биспецифических антител CDH3xCD3, измеренных в 18-часовом анализе высвобождения хрома. Эффекторная клетка: стимулированные обогащенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки человека. Клетки-мишени: Клетки СНО, трансфицированные CDH3 человека. Соотношение эффекторная клетка:клетка-мишень (Е:Т): 10:1. Антитела, специфичные для эпитопного кластера/внеклеточного субдомена D2C (фиг. 6A) и D3A(фиг. 6B)

Фиг. 7: Цитотоксическая активность стимулированных CD8 + Т-клеток человека против CDH3-позитивной клеточной линии эпидермоидной карциномы человека A431 в присутствии CDH3xCD3-биспецифических антител, измеренная в 18-часовом анализе высвобождения хрома. Эффекторные клетки: стимулированные обогащенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки человека. Клетки-мишени: клетки A431 человека. Соотношение эффекторная клетка:клетка-мишень (Е:Т): 10:1. Антитела, специфичные для эпитопного кластера/внеклеточного субдомена D2C (фиг. 7A) и D3A (фиг. 7B).

Фиг. 8: Цитотоксическая активность нестимулированных РВМС человека против клеток СНО, трансфицированных CDH3 человека в присутствии биспецифических антител CDH3xCD3, измеренных в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS. Эффекторные клетки: нестимулированные РВМС человека (CD14-/CD56-). Клетки-мишени: клетки СНО, трансфицированные CDH3 человека. Соотношение эффекторная клетка:клетка-мишень (Е:Т): 10:1. Антитела, специфичные для эпитопного кластера/внеклеточного субдомена D2C (фиг. 8A) и D3A (фиг. 8B).

Фиг. 9: Цитотоксическая активность нестимулированного РВМС человека против CDH3-позитивной клеточной линии эпидермоидной карциномы человека A431 в присутствии CDH3xCD3-биспецифических антител, измеренная в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS. Эффекторные клетки: нестимулированные РВМС человека (CD14-/CD56-). Клетки-мишени: клетки A431 человека. Соотношение эффекторная клетка:клетка-мишень (Е:Т): 10:1. Антитела, специфичные для эпитопного кластера/внеклеточного субдомена D2C (фиг. 9A) и D3A (фиг. 9B)

Фиг. 10: Цитотоксическая активность линии Т-клеток макака против клеток СНО, трансфицированных CDH3 макака в присутствии биспецифических антител CDH3xCD3, измеренных в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS. Эффекторные клетки: CD3-позитивная линия Т-клеток LnPx4119 макака. Клетки-мишени: клетки СНО, трансфицированные CDH3 макака. Соотношение эффекторная клетка:клетка-мишень (Е:Т): 10:1. Антитела, специфичные для эпитопного кластера/внеклеточного субдомена D2C (фиг. 10A), D3A (фиг. 10B) и D1B (фиг. 10C)

Фиг. 11: Противоопухолевая активность биспецифического антитела CDH3xCD3 эпитопного кластера/внеклеточного субдомена D2C (CDH3-13) в модели ксенотрансплантата опухоли человека (см. пример 14). Антитело доза-зависимо предотвращает образование опухолей А-431 в присутствии РВМС человека. Высокий объем опухоли вначале измерения (5-е сутки) из-за большого объема клеточной смеси, введенной 1 сутки. \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,0001.

Фиг. 12: Противоопухолевая активность биспецифического антитела и антитела с повышенным периодом полувыведения (HLE) CDH3xCD3 эпитопного кластера/ внеклеточного субдомена D2C (CDH3-13) в модели ксенотрансплантата опухоли человека (см. пример 15). Антитело HLE доза-зависимо предотвращает образование опухолей НСТ-116 человека в присутствии РВМС человека. Хотя на фиг. 12A представлен общий результат, на фиг. 12B выделен результат, полученный для более высокой концентрации антител (группа 2), у реагирующих животных (7/10) и нереагирующим животным (3/10).

Фиг. 13: Активация Т-клеток в отсутствие клеток-мишеней с биспецифическими конструкциями антител в отсутствие (верхняя панель) и при наличии (нижняя панель) слития альбумина на С-конце конструкции.

### Примеры

Следующие далее примеры иллюстрируют данное изобретение. Эти примеры не должны толковаться как ограничивающие объем данного изобретения. Данное изобретение ограничено только формулой изобретения.

Пример 1. Создание клеток СНО, экспрессирующих CDH3 дикого типа и химерные

Для конструирования химерных молекул, используемых для картирования эпитопов, последовательность соответствующих пяти внеклеточных доменов Dom1-Dom5 (или D1-D5) и их субдоменов (A,

В и С) CDH3 человека была заменена соответствующей последовательностью мыши. Были получены следующие 20 молекул; см. также фиг. 1 и 2:

|                                |               |
|--------------------------------|---------------|
| Hu CDH3/Dom1 mu (ак 108-215)   | SEQ ID NO: 13 |
| Hu CDH3/Dom1A mu (ак 108-143)  | SEQ ID NO: 14 |
| Hu CDH3/Dom1B mu (ак 144-179)  | SEQ ID NO: 15 |
| Hu CDH3/Dom1C mu (ак 180-215)  | SEQ ID NO: 16 |
| Hu CDH3/Dom2 mu (ак 216-327)   | SEQ ID NO: 17 |
| Hu CDH3/Dom2A mu (ак 216-252)  | SEQ ID NO: 18 |
| Hu CDH3/Dom2B mu (ак 253-290)  | SEQ ID NO: 19 |
| Hu CDH3/Dom2C mu (ак 291-327)  | SEQ ID NO: 20 |
| Hu CDH3/Dom3 mu (ак 328-440)   | SEQ ID NO: 21 |
| Hu CDH3/Dom3A mu (ак 328-363)  | SEQ ID NO: 22 |
| Hu CDH3/Dom3B mu (ак 364-403)  | SEQ ID NO: 23 |
| Hu CDH3/Dom3C mu (ак 404-440)  | SEQ ID NO: 24 |
| Hu CDH3 / Dom4 mu (ак 441-546) | SEQ ID NO: 25 |
| Hu CDH3/Dom4A mu (ак 441-474)  | SEQ ID NO: 26 |
| Hu CDH3/Dom4B mu (ак 475-511)  | SEQ ID NO: 27 |
| Hu CDH3/Dom4C mu (ак 512-546)  | SEQ ID NO: 28 |
| Hu CDH3/Dom5 mu (ак 547-650)   | SEQ ID NO: 29 |
| Hu CDH3/Dom5A mu (ак 547-581)  | SEQ ID NO: 30 |
| Hu CDH3/Dom5B mu (ак 582-616)  | SEQ ID NO: 31 |
| Hu CDH3/Dom5C mu (ак 617-650)  | SEQ ID NO: 32 |

В приведенном выше списке показаны положения различных доменов (Dom1-Dom5), а также соответствующих субдоменов А-С в аминокислотной последовательности CDH3 человека, как показано в SEQ ID NO: 1. Например, субдомен D1A расположен в аминокислотных положениях 108-143 SEQ ID NO: 1. То же самое относится ко всем другим доменам, перечисленным выше.

Для экспрессии в клетках CHO за кодирующей последовательностью описанных выше химерных внеклеточных доменов следовала в рамке кодирующая последовательность искусственного Ser/Gly-линкера, за которой следовал домен, полученный из трансмембранного/внутриклеточного домена ErCAM человека (аминокислоты 266-314 последовательности, опубликованной с номером регистрации GenBank NM\_002354). Все химерные конструкции состояли из N-концевой сигнальной последовательности (сигнального пептида) и пропептида.

Для создания клеток CHO, экспрессирующих CDH3 человека, яванского макака ("суно") мыши и химерный CDH3 человека/мыши, соответствующие кодирующие последовательности CDH3 человека (SEQ ID NO: 2, см. также номер доступа GeneBank NM\_001793), CDH3 макака (SEQ ID NO: 6), CDH3 мыши (SEQ ID NO: 10, см. также номер доступа GeneBank NM\_001037809) и 20 химер CDH3 человека/мыши (см. выше) клонировали в плазмиду, обозначенную pEF-DHFR (pEF-DHFR описанный в Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). Кодирующую последовательность CDH3 макака получали стандартным клонированием с использованием библиотеки кДНК селезенки макака (BioChain) и олигонуклеотидов, специфичных для последовательности человека

(5' GGCCCGCCGTCGCGGCAGC 3'; 5' STCCTTCTCCAGGTTTGCTGGC 3'; 5' AACTGAGA  
CCCCTTGAGATGC 3'; 5' TAGTCGTCTCCCGCCACC 3'; 5' GGAGGGTGGGACAAACA  
CAGG 3'; 5' ACGTTGAAGTGACCAACGAGGC 3')

гибридизированных в нетранслируемой области или области консервативной последовательности транскрипта мРНК CDH3 человека (NM\_001793). Анализ последовательности показал сходство аминокислотной последовательности основного внеклеточного домена с последовательностями GenBank CDH3 (JU473826, JU473827). Все процедуры клонирования выполнялись в соответствии со стандартными протоколами (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Для каждой конструкции соответствующую плазмиду трансфицировали в клетки с дефицитом DHFR CHO для эукариотической экспрессии, как описано в Kaufman R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566.

Экспрессия CDH3 (человека, мыши и химерных конструкций) на клетках CHO была проверена в анализе FACS с использованием моноклонального антитела IgG1 мыши против CDH3 человека, который является кросс-реактивным. Связанное моноклональное антитело обнаруживали с помощью Fcγ-PE про-

тив IgG мыши. В качестве негативного контроля клетки инкубировали с PBS/2% FCS (фетальная сыворотка теленка) вместо первого антитела. Образцы были проанализированы при помощи проточной цитометрии. Результаты представлены на фиг. 3. Экспрессию CDH3 человека и макака на клетках CHO (см. пример 5) обнаруживали с помощью PE-конъюгированных R&D 861-P.

#### Пример 2. Кластеризация эпитопов scFv-фрагментов мыши

Клетки, трансфицированные CDH3 человека или мыши, или химерными молекулами CDH3 человека/мыши (см. пример 1), окрашивали неочищенным, неразбавленным периплазматическим экстрактом, содержащим scFv, связывающийся с CDH3 человека/макака.

Связанные молекулы scFv были обнаружены с помощью моноклонального антитела мыши против FLAG-M2 (1 мкг/мл; 50 мкл в PBS/2%FCS; Sigma F1804), а затем Fcγ-PE против IgG мыши (1:100, 50 мкл; Jackson Immunoresearch № 115-116-071). Все антитела разводили в PBS с 2% FCS. В качестве негативного контроля клетки инкубировали с PBS/2% FCS (фетальная сыворотка теленка) вместо периплазматического экстракта. Образцы были проанализированы при помощи проточной цитометрии. Результаты представлены на фиг. 4.

В частности, на фиг. 4A показаны связывающие домены, которые распознают внеклеточный домен D1 CDH3 человека, а более точно - субдомен DB (потеря сигнала FACS в соответствующих химерных конструкциях CDH3). Следует отметить, что связывающий домен, обозначенный CDH3-6, представляет собой родительский связывающий домен для CDH3-4. Связывающий домен, обозначенный CDH3-10, представляет собой родительский связывающий домен для CDH3-1, CDH3-2 и CDH3-3. На фиг. 4B показаны связывающие домены, которые распознают внеклеточный домен D2 CDH3 человека, а более точно субдомен D2C. Следует отметить, что связывающий домен, обозначенный CDH3-21, представляет собой родительский связывающий домен для CDH3-11, CDH3-12 и CDH3-14. Связывающий домен, обозначенный CDH3-23, представляет собой родительский связывающий домен для CDH3-13. Наконец, на фиг. 4C показаны связывающие домены, которые распознают внеклеточный домен D3 CDH3 человека, а более точно - субдомен D3A. Следует отметить, что связывающий домен CDH3-32, кроме того, связывается с субдоменом D3C. Связывающий домен, обозначенный CDH3-32, представляет собой родительский связывающий домен для CDH3-25, CDH3-26 и CDH3-27. Связывающий домен, обозначенный CDH3-33, представляет собой родительский связывающий домен для CDH3-24. Термин "родительский связывающий домен" означает в этом контексте, что эти связывающие домены были разработаны далее для того, чтобы создавать или получать оптимизированные связывающие домены.

Связывающие домены CDH3-11, CDH3-12, CDH3-13 и CDH3-14 также подвергались анализу кластеризации эпитопов, и было показано, что они распознают внеклеточный домен D2 CDH3 человека, а более точно - субдомен D2C (данные не представлены). Такой же анализ был также проведен с помощью связывающих доменов CDH3-24, CDH3-25, CDH3-26 и CDH3-27. Эти связывающие домены распознавали внеклеточный домен D3 CDH3 человека, а более точно - субдомен D3A (данные не представлены).

#### Пример 3. Определение на основе Вiasoge аффинности антитела к CDH3 человека и макака

Эксперименты по анализу Вiasoge проводили с применением рекомбинантных слитых белков CDH3 (CDH3 человека и макака, соответственно) с альбумином человека (HALB) для определения связывания мишеней CDH3 с антителами по изобретению.

Подробно CM5 Sensor Chips (GE Healthcare) иммобилизовали с приблизительно 600-800 RU соответствующего рекомбинантного антигена, используя ацетатный буфер pH 4,5 в соответствии с руководством производителя. Образцы биспецифических антител CDH3xCD3 загружали в пяти концентрациях: 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,13 нМ разбавленный в буфере HBS-EP (GE Healthcare). Скорость потока составляла 30 мкл/мин в течение 3 мин, затем подвижный буфер HBS-EP снова наносили в течение 8-20 мин при скорости потока 30 мкл/мл. Регенерацию чипа проводили с применением 10 мМ раствора глицина 10 мМ NaCl pH 1,5. Наборы данных были проанализированы с использованием программного обеспечения ViaEval. В целом были проведены два независимых эксперимента. Биспецифические антитела CDH3xCD3 в соответствии с изобретением показали высокую аффинность к человеческому CDH3 в 1-значном наномолярном диапазоне. Связывание с CDH3 макака было сбалансированным, также демонстрируя аффинности в аналогичных диапазонах. Значения аффинности, а также рассчитанный зазор аффинности показаны в табл. 2. CDH3-25 x F12q-HALB и CDH3-13- xI2C-HLE (Fc) были измерены в отдельном анализе и, как было показано, имели

KD (hu), равный  $31,8 \pm 1,9$  нМ, KD (cyno), равный  $40,9 \pm 3,89$  нМ и разрыв аффинности, равный 1,29, и

KD (hu), равный  $12,95 \pm 0,5$  нМ, KD (cyno), равный  $12,35 \pm 0,35$  нМ и разрыв аффинности, равный 0,95 соответственно.

Таблица 2. Аффинности биспецифических антител CDH3×CD3 к CDH3 человека и макака, определенные анализом *Viacore*, а также рассчитанные межвидовые разрывы аффинности

| Биспецифическое антитело CDH3×CD3 | KD hu CDH3 [нМ] | KD суно CDH3 [нМ] | Разрыв аффинности и суно/hu |
|-----------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------------------|
| CDH3-11                           | 7,5             | 6,2               | 0,83                        |
| CDH3-12                           | 8,8             | 7,5               | 0,85                        |
| CDH3-13                           | 7,4             | 6,0               | 0,81                        |
| CDH3-14                           | 9,5             | 8,1               | 0,85                        |
| CDH3-24                           | 6,1             | 5,2               | 0,85                        |
| CDH3-25                           | 7,9             | 6,7               | 0,85                        |
| CDH3-26                           | 8,8             | 7,5               | 0,85                        |
| CDH3-27                           | 8,7             | 7,6               | 0,87                        |

Пример 4. Скатчард-основанный анализ специфичности биспецифического антитела CDH3×CD3 к CDH3 человека и макака на целевых антиген-положительных клетках и определение межвидового разрыва аффинности

Аффинности биспецифических антител CDH3×CD3 к клеткам CHO, трансфицированным CDH3 человека или макака, также были определены с помощью анализа Скатчарда как наиболее надежного метода для измерения потенциального разрыва аффинности между CDH3 человека и макака. Для анализа Скатчарда эксперименты насыщения связывания выполняли с использованием системы моновалентного детектирования для точного определения моновалентного связывания биспецифических антител CDH3×CD3 с соответствующей линией клеток.

2 × 10<sup>4</sup> клеток соответствующей линии клеток (линия клеток CHO, экспрессирующая рекомбинантный CDH3 человека, линия клеток CHO, экспрессирующая рекомбинантный CDH3 макака) инкубировали каждый с 50 мкл серии триплетного разведения (двенадцать разведений при 1:2) соответствующего CDH3×CD3 (до достижения насыщения), начиная с 10-20 нМ, с последующей инкубацией 16 ч при 4°C при перемешивании и одной стадией промывки остатка. Затем клетки инкубировали в течение еще одного часа с 30 мкл раствора-конъюгата CD3×ALEXA488. После одной стадии промывания клетки ресуспендировали в 150 мкл буфера FACS, содержащего 3,5% формальдегида, инкубировали еще 15 мин, центрифугировали, ресуспендировали в буфере FACS и анализировали с использованием FACS CantoII machine и программного обеспечения FACS Diva. Данные были получены из двух независимых наборов экспериментов, в каждом из которых использовали три повторности. Был рассчитан соответствующий анализ Скатчарда для экстраполяции максимального связывания (V<sub>max</sub>). Были определены концентрации биспецифических антител CDH3×CD3 при полумаксимальном связывании, отражающие соответствующие KD. Значения трехкратных измерений были представлены как гиперболические кривые и как S-образные кривые, чтобы продемонстрировать правильную концентрацию от минимального до оптимального связывания.

Значения, приведенные в табл. 3, были получены из двух независимых экспериментов на биспецифическое антитело CDH3×CD3. Анализ Скатчарда на основе клеток подтвердил, что биспецифические антитела CDH3×CD3 по изобретению наномолярны-субнаномолярны по аффинности к CDH3 человека и представлены небольшим разрывом аффинности, около 1, у межвидового CDH3 макака/человека. CDH3-25 × F12q-HALB и CDH3-13- xI2C-HLE (Fc) были измерены в отдельном анализе и, как было показано, имели

аффинность на основе клеток (hu), равную 0,37 ± 0,11 нМ, аффинность на основе клеток (суно), равную 0,35 ± 0,08 нМ и разрыв аффинности, равный 0,95, и

аффинность на основе клеток (hu), равную 0,32 ± 0,003 нМ, аффинность на основе клеток (суно), равную 0,5 ± 0,09 нМ и разрыв аффинности, равный 1,56, соответственно

Таблица 3. Аффинности (KD) биспецифических антител CDH3×CD3, определенные клеточным анализом Скатчарда, с рассчитанным разрывом аффинности KD CDH3 макака/KD CDH3 человека.

Антитела измеряли в двух независимых экспериментах, каждый из которых применяли три раза.

| Биспецифическое антитело CDH3×CD3 | Аффинность на основе клеток hu CDH-3 [нМ] | Аффинность на основе клеток mac CDH-3 [нМ] | Разрыв аффинности KDmac/KDhu CDH-3 |
|-----------------------------------|---|--|------------------------------------|
| CDH3-11                           | 1,74 ± 0,37                               | 1,98 ± 0,67                                | 1,14                               |
| CDH3-12                           | 0,40 ± 0,27                               | 0,52 ± 0,21                                | 1,30                               |
| CDH3-13                           | 0,42 ± 0,35                               | 0,41 ± 0,28                                | 0,98                               |
| CDH3-14                           | 0,49 ± 0,14                               | 0,41 ± 0,03                                | 0,84                               |
| CDH3-24                           | 0,09 ± 0,03                               | 0,15 ± 0,07                                | 1,67                               |
| CDH3-25                           | 0,12 ± 0,01                               | 0,11 ± 0,03                                | 0,96                               |
| CDH3-26                           | 0,17 ± 0,01                               | 0,16 ± 0,04                                | 0,94                               |
| CDH3-27                           | 0,20 ± 0,10                               | 0,23 ± 0,03                                | 1,15                               |

Пример 5. Биспецифическое связывание и межвидовая кросс-реактивность

Для подтверждения связывания с CDH3 и CD3 человека и CDH3, и CD3 макака, биспецифические антитела тестировали с помощью проточной цитометрии с использованием клеток CHO, трансфицированных CDH3 человека и макака соответственно,

линии клеток эпидермоидной карциномы A431, позитивной на CDH3 человека,

линии клеток Т-клеток лейкемии человека HPB-all, экспрессирующей CD3 (DSMZ, Braunschweig, ACC483), и

линии Т-клеток HSC-F, экспрессирующей CD3 макака.

Кроме того, клетки CHO, трансфицированные CDH3 мыши использовали в качестве негативного контроля.

Для проточной цитометрии 200 000 клеток соответствующих клеточных линий инкубировали в течение 30 мин на льду с 50 мкл очищенного биспецифического антитела в концентрации 5 мкг/мл. Клетки дважды промывали в PBS/2% FCS, а связывание конструкций выявляли с помощью антитела мыши (собственного производства), специфичного для CD3-связывающей части. После промывания связанные антитела мыши были обнаружены с помощью антимишиных Fcy-PE козла. Образцы были проанализированы при помощи проточной цитометрии.

Результаты представлены на фиг. 5А и 5В. Биспецифические антитела CDH3×CD3 по изобретению окрашивали клетки CHO, трансфицированные CDH3 человека и CDH3 макака, а также окрашивали линию клеток A431 эпидермоидной карциномы, позитивную на CDH3 человека (естественно экспрессирующая), а также Т-клетки человека и макака, экспрессирующие CD3. Кроме того, не было окрашивания негативных контрольных клеток (CHO, трансфицированные CDH3 мыши).

Пример 6. Подтверждение отсутствия связывания с паралогами человека и макака

Паралоги CDH3 человека и макака (CDH1 = E-кадгерин, CDH2 = N-кадгерин, CDH4 = R-кадгерин и CDH5 = VE-кадгерин) были стабильно трансфицированы в клетки dhfr<sup>-/-</sup> CHO. Экспрессию белка подтверждали в анализах FACS с антителами, специфичными для соответствующих паралогов. Антитела представляли собой R&D MAB18381 (для CDH1), eBioscience 12-3259-41 (для CDH2), R&D Systems polyclonal AF2217 (для CDH4) и BD Bioscience № 555661 (для CDH5).

Последовательности паралогов, используемые в данном примере, указаны в перечне последовательности (SEQ ID NO: 41-44). Их также можно найти в следующем номерах присоединений GenBank:

NM\_004360 [CDH1 человека]

NM\_001792 [CDH2 человека]

NM\_001794 [CDH4 человека]

NM\_001795 [CDH5 человека]

Анализ проточной цитометрии проводили, как описано в примере 5. Результаты представлены на фиг. 5С и 5D. Анализ подтвердил, что ни одно из биспецифических антител CDH3×CD3 по данному изобретению не реагирует перекрестно с любым из испытываемых паралогов CDH3 человека.

Антитела по изобретению также были проверены на перекрестное реагирование с паралогами CDH3 макака - CDH1, CDH2, CDH4 и CDH5 (данные не приведены). Экспрессию паралога макака на клетках CHO проверяли теми же антителами, которые описаны выше для паралогов человека. Последовательности паралогов макака, используемые в данном примере, указаны в перечне последовательностей (SEQ ID NO: 45-48). Их также можно найти в следующем номерах присоединений GenBank:

XM\_002802516 [CDH1 макака]

JU321883 [CDH2 макака]

XM\_002802511 [CDH5 макака]

Кроме того, последовательность CDH4 макака была получена из Ensembl Genome Browser (ENSM-

MUT00000017252) и слита с N-конца в рамке с сигнальным пептидом человека CDH4 (аминокислоты 1-19).

Пример 7. Идентичность зародышевой линии человека

Чтобы проанализировать идентичность/подобие последовательности антител к генам зародышевой линии человека, связывающие домены CDH3 по изобретению были выровнены следующим образом: Полный VL, включая все CDR, был выровнен; полный VH, включая CDR 1 и 2, но кроме CDR3 был выровнен по отношению к генам зародышевой линии антитела человека (Vbase). Более подробную информацию можно найти в описании данной заявки. Результаты представлены ниже в табл. 4.

Таблица 4. Идентичность VH и VL к зародышевой линии человека

| Биспецифическое антитело | Идентичность VH и VL к зародышевой линии человека [ % ] |
|--------------------------|---|
| CDH3xCD3                 |   |
| CDH3-11                  | 92,7  |
| CDH3-12                  | 93,6  |
| CDH3-13                  | 87,8  |
| CDH3-14                  | 94,1  |
| CDH3-24                  | 89,4  |
| CDH3-25                  | 89,8  |
| CDH3-26                  | 89,8  |
| CDH3-27                  | 90,7  |

Пример 8. Цитотоксическая активность

Активность биспецифических антител CDH3xCD3 по изобретению при перенаправлении эффекторных Т-клеток против CDH3-экспрессирующих клеток-мишеней анализировали в пяти анализах цитотоксичности *in vitro*.

Активность биспецифических антител CDH3xCD3 при перенаправлении стимулированных CD8+ эффекторных Т-клеток человека против клеток CHO, трансфицированных CDH3 человека измеряли в 18-часовом анализе высвобождения <sup>51</sup>Сг-хрома. Результаты представлены на фиг. 6.

Активность биспецифических антител CDH3xCD3 при перенаправлении стимулированных CD8+ эффекторных Т-клеток человека против CDH3-позитивной линии клеток карциномы человека A431 измеряли в 18-часовом анализе высвобождения <sup>51</sup>Сг-хрома. Результаты представлены на фиг. 7.

Активность биспецифических антител CDH3xCD3 при перенаправлении Т-клеток в нестимулированных PBMC человека против клеток CHO, трансфицированных CDH3 человека измеряли в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS. Результаты представлены на фиг. 8.

Активность биспецифических антител CDH3xCD3 при перенаправлении Т-клеток в нестимулированных PBMC человека против CDH3-позитивной линии клеток карциномы человека A431 измеряли в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS. Результаты представлены на фиг. 9.

Для подтверждения того, что кросс-реактивные CDH3xCD3 биспецифические антитела способны перенаправлять Т-клетки макака против клеток CHO, трансфицированных CDH3 макака, 48-часовой анализ на цитотоксичность на основе FACS проводили с использованием линии Т-клеток макака в качестве эффекторных Т-клеток. Результаты представлены на фиг. 10.

Пример 8.1. Анализ высвобождения хрома со стимулированными Т-клетками человека

Стимулированные Т-клетки, обогащенные для CD8 Т-клеток, получали, как описано ниже. Чашку Петри (диаметр 145 мм, Greiner bio-one GmbH, Кремсшунстер) покрывали коммерчески доступным специфическим антителом против CD3 (ОКТ3, Orthoclone) в конечной концентрации 1 мкг/мл в течение 1 ч при 37°C. Несвязанный белок удаляли одной стадией промывки PBS. 3-5 × 10<sup>7</sup> PBMC человека добавляли к предварительно покрытой чашке Петри в 120 мл RPMI 1640 со стабилизированным глутамином/10% FCS/ИЛ-2 20 ед/мл (Proleukin®, Chiron) и стимулировали в течение 2 суток. На третьи сутки клетки собирали и промывали один раз RPMI 1640. ИЛ-2 добавляли до конечной концентрации 20 ед/мл и клетки снова культивировали в течение одних суток в той же самой среде для культивирования клеток, что и выше. CD8 цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) были обогащены истощением CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD56<sup>+</sup> NK-клеток с использованием Dynal-Beads в соответствии с протоколом производителя.

Клетки-мишени CHO, трансфицированные CDH3 макака или CDH3 человека дважды промывали PBS и меченым 11,1 МБк <sup>51</sup>Сг в конечном объеме 100 мкл RPMI с 50% FCS в течение 60 мин при 37°C. Затем меченые клетки-мишени промывали 3 раза 5 мл RPMI и затем использовали в анализе цитотоксичности. Анализ проводили на 96-луночном планшете в общем объеме 200 мкл, дополненном RPMI, с отношением Е:Т, равным 10:1. Использовали начальную концентрацию 0,01-1 мкг/мл очищенного биспецифического антитела и трехкратные разведения. Время инкубации для анализа составляло 18 ч. Цитотоксичность определяли, как относительные значения высвобожденного хрома в супернатанте относительно разности максимального лизиса (добавление тритона-X) и спонтанного лизиса (без эффекторных

клеток). Все измерения проводились в четырех повторностях. Измерение активности хрома в супернатантах проводили на гамма-счетчике Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Кёльн, Германия). Анализ результатов был выполнен с помощью Prism 5 для Windows (версия 5.0, GraphPad Software Inc., Сан-Диего, штат Калифорния, США). Значения  $EC_{50}$ , рассчитанные программой анализа из кривых сигмоидальной дозовой реакции, использовались для сравнения цитотоксической активности.

Пример 8.2. Активность перенаправления стимулированных эффекторных Т-клеток человека против клеток CHO трансфицированных CDH3 человека

Цитотоксическую активность биспецифических антител CDH3×CD3 по изобретению анализировали в анализе цитотоксичности с высвобождением 51-хрома ( $^{51}Cr$ ) с использованием клеток CHO, трансфицированных CDH3 человека в качестве клеток-мишеней, и стимулированных CD8+ Т-клеток человека в качестве эффекторных клеток.

Эксперимент проводили, как описано в примере 8.1.

Результаты представлены на фиг. 6 и в табл. 5. Биспецифические антитела CDH3×CD3 проявляли сильную цитотоксическую активность против клеток CHO, трансфицированных CDH3 человека, вплоть до 1-значного пиколярного диапазона. Заявленные антитела, которые являются специфическими для эпитопного кластера, соответствующего положению 291-363 CDH3 человека, присутствуют с благоприятным соотношением эпитоп-активности, поддерживающим сильную цитотоксическую активность, опосредованную биспецифическим антителом. CDH3-25 x F12q-HALB и CDH3-13- xI2C-HLE (Fc) были измерены в отдельном анализе и, как было показано, имели  $EC_{50}$ , равный 3,6 пМ и 8,9 пМ соответственно.

Таблица 5. Значения  $EC_{50}$  [пг/мл] биспецифических антител CDH3×CD3 проанализированные в анализе цитотоксичности с высвобождением 51-хрома ( $^{51}Cr$ ) с использованием клеток CHO, трансфицированных CDH3 человека в качестве клеток-мишеней, и стимулированных CD8 Т-клеток человека

| Биспецифическое антитело | $EC_{50}$ [пг/мл] |
|--------------------------|-------------------|
| CDH3-11                  | 76                |
| CDH3-12                  | 370               |
| CDH3-13                  | 7,2               |
| CDH3-14                  | 138               |
| CDH3-24                  | 14                |
| CDH3-25                  | 4,9               |
| CDH3-26                  | 21                |
| CDH3-27                  | 61                |

Пример 8.3. Активность перенаправления стимулированных эффекторных Т-клеток человека против CDH3-позитивной линии клеток карциномы человека A431

Цитотоксическую активность биспецифических антител CDH3×CD3 анализировали в анализе цитотоксичности с высвобождением 51-хрома ( $^{51}Cr$ ) с использованием CDH3-позитивной линии клеток карциномы человека A431 в качестве источника клеток-мишеней, и стимулированных CD8+ Т-клеток человека в качестве эффекторных клеток. Анализ проводили, как описано в примере 8.1.

В соответствии с результатами исследований высвобождения 51-хрома со стимулированными обогащенными CD8+ Т-лимфоцитами человека в качестве эффекторных клеток и клеток CHO, трансфицированных CDH3 человека в качестве клеток-мишеней, биспецифические антитела CDH3×CD3 по данному изобретению также сильно влияют на цитотоксическую активность против естественно экспрессирующих клеток-мишеней (фиг. 7 и табл. 6). CDH3-25 x F12q-HALB и CDH3-13- xI2C-HLE (Fc) были измерены в отдельном анализе и, как было показано, имели  $EC_{50}$ , равный 1,2 пМ и 16 пМ, соответственно.

Таблица 6. Значения  $EC_{50}$  [пг/мл] биспецифических антител CDH3×CD3 проанализированная в 18-часовом анализе цитотоксичности с высвобождением 51-хрома ( $^{51}Cr$ ) с использованием CDH3-позитивной линии клеток карциномы человека A431 в качестве источника клеток-мишеней, и стимулированных обогащенных CD8 Т-клеток человека в качестве эффекторных клеток

| Биспецифическое антитело | $EC_{50}$ [пг/мл] |
|--------------------------|-------------------|
| CDH3-11                  | 47                |
| CDH3-12                  | 362               |

|         |     |
|---------|-----|
| CDH3-13 | 62  |
| CDH3-14 | 385 |
| CDH3-24 | 5,8 |
| CDH3-25 | 4,6 |
| CDH3-26 | 19  |
| CDH3-27 | 31  |

Пример 8.4. Анализ цитотоксичности на основе FACS с нестимулированным PBMC человека

#### Выделение эффекторных клеток

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) получали путем центрифугирования с градиентом плотности фиколла из обогащенных препаратов лимфоцитов (буферизированных оболочек), побочного продукта банков крови, собирающих кровь для переливания. Лейкоцитарные пленки были поставлены местным банком крови, а PBMC были подготовлены в тот же день сбора крови. После центрифугирования в градиенте фиколла и обширных промываний с PBS Dulbecco (Gibco) оставшиеся эритроциты удаляли из PBMC путем инкубации с буфером для лизиса эритроцитов (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 100 мкМ ЭДТА). Тромбоциты удаляли через супернатант при центрифугировании PBMC при 100 × g. Оставшиеся лимфоциты в основном охватывают В и Т лимфоциты, NK-клетки и моноциты. PBMC были сохранены в культуре при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в среде RPMI (Gibco) с 10% FCS (Gibco).

#### Истощение клеток CD14<sup>+</sup> и CD56<sup>+</sup>

Для истощения клеток CD14<sup>+</sup> использовали микрогранулы CD14 (Miltenyi Biotec, MACS, № 130-050-201) для истощения NK-клеток - микрогранулы CD56 человека (MACS, № 130-050-401). PBMC подсчитывали и центрифугировали в течение 10 мин при комнатной температуре с 300 × g. Супернатант сливали, а осадок клеток повторно суспендировали в изолирующем буфере MACS [80 мкл/10<sup>7</sup> клеток; PBS (Invitrogen, № 20012-043), 0,5% (об/об) FBS (Gibco, № 10270-106), 2 mM ЭДТА (Sigma-Aldrich, № E-6511)]. Микрогранулы CD14 и микрогранулы CD56 (20 мкл/10<sup>7</sup> клеток) добавляли и инкубировали в течение 15 мин при 4-8°C. Клетки промывали изолирующим буфером MACS (1-2 мл/10 клеток). После центрифугирования (см. выше) супернатант сливали, а клетки ресуспендировали в изолирующем буфере MACS (500 мкл/10<sup>8</sup> клеток). CD14/CD56-негативные клетки затем изолировали, используя LS Columns (колонки для жидкостной хроматографии) (Miltenyi Biotec, № 130-042-401). Клетки PBMC мас./об. CD14<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> культивировали в полной среде RPMI, т.е. RPMI1640 (Biochrom AG, № FG1215) дополненной 10% ФБС (Biochrom AG, № S0115), 1x незаменимых аминокислот (Biochrom AG, № K0293), 10 mM буфера Hepes (Biochrom AG, № L1613), 1 mM пирувата натрия (Biochrom AG, № L0473) и 100 ед/мл пенициллин/стрептомицин (Biochrom AG, № A2213) при 37°C в инкубаторе, до необходимости.

#### Мечение клеток-мишеней

Для анализа лизиса клеток в анализах проточной цитометрии использовали флуоресцентный мембранный краситель DiOC<sub>18</sub> (DiO) (Molecular Probes, № V22886) для мечения клеток CHO, трансфицированных CDH3 человека или CDH3 макака в качестве клеток-мишеней и отличали их от эффекторных клеток. Вкратце, клетки собирали, один раз промывали PBS и доводили до 10 клеток/мл в PBS содержащем 2% (об/об.) FBS и the мембранный краситель DiO (5 мкл/10<sup>6</sup> клеток). После инкубации в течение 3 мин при 37°C клетки дважды промывали в полной среде RPMI, а число клеток доводили до 1,25 × 10<sup>5</sup> клеток/мл. Жизнеспособность клеток определяли с использованием 0,5% (об/об.) изотонического раствора EosinG (Roth, № 45380).

#### Анализ на основе проточной цитометрии

Данный анализ был разработан для количественной оценки лизиса клеток CHO, трансфицированных CDH3 человека и CDH3 макака в присутствии серийных разведений биспецифических антител CDH3. Равные объемы меченых DiO клеток-мишеней и эффекторных клеток (т.е., PBMC мас./об. клетки CD14<sup>+</sup>) смешивали, получали соотношение клеток Е:Т, равное 10:1. 160 мкл этой суспензии переносили в каждую лунку 96-луночного планшета. Добавляли 40 мкл серийных разведений биспецифических антител CDH3×CD3 и негативного контрольного биспецифического (биспецифического антитела на основе CD3, распознающего неактуальный целевой антиген) или полной среды RPMI в качестве дополнительного негативного контроля. Цитотоксическая реакция, опосредованная биспецифическим антителом, протекала в течение 48 ч в увлажненном инкубаторе с 7% CO<sub>2</sub>. Затем клетки переносили на новый 96-луночный планшет, а контроль целостности клеточной мембраны мишени осуществляли путем добавления йодида пропидия (PI) с конечной концентрацией 1 мкг/мл. PI представляет собой непроницаемый для мембраны краситель, который обычно исключается из жизнеспособных клеток, тогда как мертвые клетки принимают его и становятся идентифицируемыми при флуоресцентной эмиссии.

Образцы измеряли при помощи проточной цитометрии на приборе FACSCanto II и анализировали с помощью программного обеспечения FACSDiva (оба от Becton Dickinson). Клетки-мишени идентифицировали как DiO-позитивные клетки. PI-отрицательные клетки-мишени были классифицированы как живые клетки-мишени. Процент цитотоксичности рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Цитотоксичность [\%]} = \frac{n_{\text{погибших целевых клеток}}}{n_{\text{целевых клеток}}} \times 100$$

n = число событий

Используя программное обеспечение GraphPad Prism 5 (программное обеспечение Graph Pad, Сан-Диего), процент цитотоксичности был нанесен на график относительно соответствующих концентраций биспецифических антител. Кривые дозозависимости были проанализированы с помощью четырех параметрических моделей логистической регрессии для оценки сигмовидных кривых дозозависимости с фиксированным наклоном холма и расчета значения  $EC_{50}$ .

Пример 8.5. Активность перенаправления нестимулированных РВМС человека против клеток СНО трансфицированных CDH3 человека

Цитотоксическую активность биспецифических антител CDH3×CD3 анализировали в анализе цитотоксичности на основе FACS с использованием клеток СНО, трансфицированных CDH3 человека в качестве клеток-мишеней, и нестимулированных РВМС человека в качестве эффекторных клеток. Анализ проводили, как описано в примере 8.4 выше.

Результаты анализов цитотоксичности на основе FACS с нестимулированными РВМС человека в качестве эффекторных клеток и клеток СНО, трансфицированных CDH3 человека в качестве мишеней представлены на фиг. 8 и в табл. 7. CDH3-25 x F12q-HALB и CDH3-13- xI2C-HLE (Fc) были измерены в отдельном анализе и, как было показано, имели  $EC_{50}$ , равный 4,6 и 5.6 пМ соответственно.

Таблица 7. Значения  $EC_{50}$  [пг/мл] биспецифических антител CDH3×CD3, проанализированные в 48- часовом анализе на основе FACS с использованием нестимулированных клеток РВМС в качестве эффекторных клеток и клеток СНО, трансфицированных CDH3 человека в качестве клеток-мишеней

| Биспецифическое антитело | $EC_{50}$ [пг/мл] |
|--------------------------|-------------------|
| <b>CDH3×CD3</b>          |                   |
| CDH3-11                  | 462               |
| CDH3-12                  | 1021              |
| CDH3-13                  | 129               |
| CDH3-14                  | 1885              |
| CDH3-24                  | 19                |
| CDH3-25                  | 10                |
| CDH3-26                  | 47                |
| CDH3-27                  | 61                |

Пример 8.6. Активность перенаправления нестимулированных клеток РВМС против CDH3-позитивной линии клеток карциномы человека A431

Цитотоксическую активность биспецифических антител CDH3×CD3 дополнительно анализировали в анализе цитотоксичности на основе FACS с использованием CDH3-позитивной линии клеток карциномы человека A431 в качестве источника клеток-мишеней, и нестимулированных клеток РВМС человека в качестве эффекторных клеток. Анализ проводили, как описано в примере 8.4 выше. Результаты представлены на фиг. 9 и в табл. 8. CDH3-25 x F12q-HALB и CDH3-13- xI2C-HLE (Fc) были измерены в отдельном анализе и, как было показано, имели  $EC_{50}$ , равный 2,3 и 32 пМ соответственно.

Таблица 8. Значения  $EC_{50}$  [пг/мл] биспецифических антител CDH3×CD3, проанализированные в 48- часовом анализе на основе FACS с использованием нестимулированных клеток РВМС в качестве эффекторных клеток и линии клеток A431 человека в качестве клеток-мишеней

| Биспецифическое антитело | $EC_{50}$ [пг/мл] |
|--------------------------|-------------------|
| <b>CDH3×CD3</b>          |                   |
| CDH3-11                  | 389               |
| CDH3-12                  | 3141              |
| CDH3-13                  | 83                |
| CDH3-14                  | 4842              |
| CDH3-24                  | 15                |
| CDH3-25                  | 9,2               |
| CDH3-26                  | 35                |
| CDH3-27                  | 41                |

Ожидалось, что значения  $EC_{50}$  обычно были выше при анализе цитотоксичности с нестимулированными РВМС в качестве эффекторных клеток по сравнению с анализом цитотоксичности с использованием стимулированных CD8+ Т-клеток человека.

Пример 8.7. Активность перенаправления Т-клеток макака против клеток СНО трансфицированных CDH3 макака

Наконец, цитотоксическую активность биспецифических антител CDH3×CD3 анализировали в анализе цитотоксичности на основе FACS с использованием клеток СНО, трансфицированных CDH3 макака (суно) в качестве клеток-мишеней, и линию Т-клеток макака в качестве эффекторных клеток. Линию Т-клеток макака 4119LnPx (Кнарре et al. Blood 95:3256-61 (2000)) использовали в качестве источника эффекторных клеток. Мечение клеток-мишеней клеток СНО, трансфицированных CDH3 макака и анализ цитотоксической активности на основе проточной цитометрии проводили, как описано выше.

Результаты представлены на фиг. 10 и в табл. 9. Т-клетки макака из линии клеток 4119LnPx были индуцированы для эффективного уничтожения клеток СНО, трансфицированных CDH3 макака с помощью CDH3×CD3 биспецифических антител по изобретению, то есть антител, которые связываются с эпитопным кластером CDH3 человека, соответствующим положениям 291-363 CDH3 человека, и охватывают соседние субдомены D2C (позиции 291-327) и D3A (позиции 328-363). Антитела, представленные в этом анализе со значениями EC<sub>50</sub> от 2-значных до очень низких 4-значных пг/мл, подтверждая, что эти антитела очень активны в системе макака.

Другая группа антител против CDH3 была идентифицирована во время кластеризации эпитопов (см. пример 2), которые связываются с внеклеточным доменом D1 и, более конкретно, с субдоменом D1B CDH3 человека. Неожиданно биспецифические антитела CDH3×CD3 этой группы, хотя и сильно влияющие на цитотоксическую активность против клеток СНО, трансфицированных CDH3 человека, продемонстрировали очень слабую цитотоксическую активность против клеток СНО, трансфицированных CDH3 макака (см. фиг. 10C и табл. 9). Антитела этой группы продемонстрировали значительно более слабую активность со значениями EC<sub>50</sub> в очень высоком 4-значном и даже в 5-значном диапазоне пг/мл. CDH3-25 x F12q-HALB и CDH3-13-xI2C-HLE (Fc) были измерены в отдельном анализе и, как было показано, имели EC<sub>50</sub>, равный 1,4 пМ и 4.0 пМ, соответственно. Таким образом, антитела CDH3×CD3 по изобретению, которые связываются с эпитопным кластером CDH3, соответствующим положениям 291-363, являлись от около 5 до около 1000 раз более эффективны в системе макака, чем антитела, которые связываются с внеклеточным доменом D1, а более конкретно, с субдомен D1B CDH3.

Таблица 9. Значения EC<sub>50</sub> [пг/мл] биспецифических антител CDH3xCD3, которые связываются с эпитопным кластером CDH3, соответствующим положениям 291-363 (строки 1-8) и биспецифических антител CDH3xCD3, которые связываются с эпитопным кластером CDH3/субдоменом D1B (строки 9-12), измеренные в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS с линией клеток 4119LnPx макака в качестве эффекторных клеток и клеток СНО, трансфицированных CDH3 макака в качестве клеток-мишеней.

|    | Биспецифическое антитело CDH3xCD3 | EC50 [пг/мл] |
|----|-----------------------------------|--------------|
| 1  | CDH3-11                           | 1183         |
| 2  | CDH3-12                           | 1325         |
| 3  | CDH3-13                           | 257          |
| 4  | CDH3-14                           | 1015         |
| 5  | CDH3-24                           | 32           |
| 6  | CDH3-25                           | 14           |
| 7  | CDH3-26                           | 37           |
| 8  | CDH3-27                           | 98           |
| 9  | CDH3-1                            | 13055        |
| 10 | CDH3-2                            | 12862        |
| 11 | CDH3-3                            | 8390         |
| 12 | CDH3-4                            | 8795         |

Пример 9. Конверсия мономер-димер после (i) трех циклов замораживания/размораживания и (ii) 7 суток инкубации при 250 мкг/мл

Мономер биспецифического антитела CDH3xCD3 подвергали различным стрессовым условиям, за которыми следовала высокоэффективная SEC, чтобы определить процент первоначально мономерного антитела, которое было превращено в димерное антитело,

(i) 15 мкг мономерного антитела доводили до концентрации 250 мкг/мл с общим буфером для составов и затем замораживали при -80°C в течение 30 мин с последующим размораживанием в течение 30 мин при комнатной температуре. После трех циклов замораживания/размораживания содержание димера определялось при помощи HP-SEC;

(ii) 15 мкг мономерного антитела доводили до концентрации 250 мкг/мл с общим буфером для составов с последующей инкубацией при 37°C в течение 7 суток. Содержание димера определяли при по-

мощи HP-SEC.

Колонка высокого разрешения SEC TSK Gel G3000 SWXL (Tosoh, Токио, Япония) была подключена к Akta Purifier 10 FPLC (GE Lifesciences) оснащенному A905 Autosampler. Уравновешивающий буфер и подвижный буфер состояли из 100 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 200 мМ  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , доведенные до pH 6,6. Раствор антитела (15 мкг белка) наносят на уравновешенную колонку, а элюирование проводят при скорости потока 0,75 мл/мин при максимальном давлении 7 МПа. Весь прогон контролировали при оптической абсорбции 280, 254 и 210 нм. Анализ проводили путем пиковой интеграции 210 нм сигнала, записанного в оценочном листе программного обеспечения Akta Unicorn. Содержание димера рассчитывали путем деления площади пика димера на общую площадь мономера плюс пик димера.

Результаты представлены ниже в табл. 10. Биспецифические антитела CDH3×CD3, связывающиеся с эпитопным кластером/внеклеточным субдоменом D2C, представлены с содержанием димера ≤1%, а точнее, с долями димера 0,0% после трех циклов замораживания/размораживания, а также после 7 суток инкубации при 37°C, что считается очень хорошим. Коэффициенты конверсии димера CDH3×CD3 биспецифических антител эпитопного кластера/внеклеточного субдомена D3 A достигали значений ≤2%, а точнее от 0,2 до 1,8, что считается хорошим. CDH3-25 × F12q-HALB и CDH3-13 × I2C-HLE (Fc) измеряли в отдельном анализе и, как было показано, имели процент димера после трех циклов замораживания/размораживания, составляющих соответственно 1,1 и 0,84, и процент димера после 7 суток инкубации 0,0 (обе конструкции HLE).

Таблица 10. Процент мономерных и димерных биспецифических антител CDH3×CD3, определяемых методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (HP-SEC)

| CDH3×CD3 антитело | Процент димера после трех циклов замораживания/размораживания | Процент димера после 7 суток инкубации |
|-------------------|---|--|
| CDH3-11           | 0,00  | 0,00                                   |
| CDH3-12           | 0,00  | 0,00                                   |
| CDH3-13           | 0,00  | 0,00                                   |
| CDH3-14           | 0,00  | 0,00                                   |
| CDH3-24           | 1,01  | 0,20                                   |
| CDH3-25           | 1,31  | 0,60                                   |
| CDH3-26           | 0,82  | 1,80                                   |
| CDH3-27           | 1,69  | 1,50                                   |

#### Пример 10. Термостабильность

Температуру агрегации антитела определяли следующим образом: 40 мкл раствора антитела при 250 мкг/мл переносили в одноразовую кювету и помещали в устройство динамического рассеяния света Wyatt DynaPro Nanostar (Wyatt). Образец нагревали от 40 до 70°C со скоростью нагрева, равной 0,5°C/мин с постоянным получением измеренного радиуса. Увеличение радиуса, указывающее на плавление белка и агрегацию, использовалось программным пакетом, поставляемым с устройством DLS для расчета температуры агрегации антитела.

Все испытываемые биспецифические антитела CDH3×CD3 по изобретению продемонстрировали очень благоприятную термическую стабильность при температурах агрегации выше 54°C, как показано в табл. 11 ниже. CDH3-25 × F12q-HALB измеряли в отдельном анализе и, как было показано, имели термостабильность 56,3°C.

Таблица 11. Термостабильность биспецифических антител, определяемая DLS (динамическое рассеяние света)

| Биспецифическое антитело CDH3×CD3 | Термостабильность (агрегирование) DLS °C) |
|-----------------------------------|---|
| CDH3-11                           | 59,8                                      |
| CDH3-12                           | 55,9                                      |
| CDH3-13                           | 59,6                                      |
| CDH3-14                           | 59,6                                      |
| CDH3-24                           | 55,1                                      |
| CDH3-25                           | 55,4                                      |
| CDH3-26                           | 54,9                                      |
| CDH3-27                           | 54,1                                      |

#### Пример 11. Стабильность после инкубации в течение 24 ч в плазме человека

Очищенные биспецифические антитела инкубировали в соотношении 1:5 в пуле плазмы человека при 37°C в течение 24 ч-96 ч при конечной концентрации 2-20 мкг/мл. После инкубации в плазме анти-

тела сравнивали в анализе высвобождения 51-хрома со стимулированными Т-клетками человека и клетками СНО, трансфицированными CDH3 при начальной концентрации 0,01-0,1 мкг/мл и с соотношением эффекторная клетка:клетка-мишень(Е:Т) 10:1 (анализ, как описано в примере 8.1, анализ высвобождения хрома со стимулированными Т-клетками человека). Неинкубированные, свежеразмороженные биспецифические антитела были включены в качестве контролей. Результаты представлены в табл. 12. Все тестируемые антитела имели благоприятную стабильность в плазме ( $EC_{50}$  плазма/ $EC_{50}$  контроль)  $\leq 4$ , группа антител, связывающихся с D3A, даже имела стабильность в плазме  $\leq 3$ . CDH3-25  $\times$  F12q-HALB и CDH3-13-xI2C-HLE (Fc) были измерены в отдельном анализе и, как было показано, имели  $EC_{50}$  с плазмой, равную 4,4 пМ,  $EC_{50}$  без плазмы, равную 3,6 пМ, а соотношение плазмы к контролю, равное 1,2, и  $EC_{50}$  с плазмой, равную 3,4 пМ,  $EC_{50}$  без плазмы, равную 8,9 пМ, а соотношение плазмы к контролю, равное 0,4 соответственно.

Таблица 12. Значения  $EC_{50}$  антител с инкубацией в плазме и без нее и рассчитанные значения плазма/контроль

| Биспецифическое антитело CDH3xCD3 | $EC_{50}$ [пг/мл] |            | Отношение плазма к контролю ( $EC_{50}$ плазма/ $EC_{50}$ контроль) |
|-----------------------------------|-------------------|------------|---|
|                                   | с плазмой         | без плазмы |   |
| CDH3-11                           | 47                | 76         | 0,6   |
| CDH3-12                           | 296               | 370        | 0,8   |
| CDH3-13                           | 25                | 7,2        | 3,5   |
| CDH3-14                           | 291               | 138        | 2,1   |
| CDH3-24                           | 19                | 14         | 1,4   |
| CDH3-25                           | 9,9               | 4,9        | 2,0   |
| CDH3-26                           | 24                | 21         | 1,1   |
| CDH3-27                           | 129               | 61         | 2,1   |

Пример 12. Мутность при концентрации антитела 2500 мкг/мл

1 мл раствора, очищенного мономерного антитела 250 мкг/мл концентрировали с помощью роторных концентраторов до 2500 мкг/мл. После 16-часового хранения при 5°C мутность раствора антитела определяли при помощи оптического поглощения OD340 нм против буфера для составов. Результаты представлены ниже в табл. 13. Все тестируемые антитела имеют очень подходящую мутность  $\leq 0,05$ . CDH3-25  $\times$  F12q-HALB и CDH3-13-xI2C-HLE (Fc) были измерены в отдельном анализе и, как было показано, имели мутность при  $\leq 2500$  мкг/мл, равную 0,066 и 0,026 соответственно.

Таблица 13. Мутность антитела после концентрирования до 2,5 мг/мл в течение ночи

| Биспецифическое антитело CDH3xCD3 | Мутность при 2500 мкг/мл |
|-----------------------------------|--------------------------|
| CDH3-11                           | 0,035                    |
| CDH3-12                           | 0,025                    |
| CDH3-13                           | 0,030                    |
| CDH3-14                           | 0,025                    |
| CDH3-24                           | 0,019                    |
| CDH3-25                           | 0,026                    |
| CDH3-26                           | 0,028                    |
| CDH3-27                           | 0,022                    |

Пример 14. Терапевтическая эффективность биспецифического антитела CDH3xCD3 в модели ксенотрансплантата опухоли человека

На 1-е сутки исследования клетки линии клеток A-431 эпидермоидной карциномы человека и свежвыделенные РВМС человека подкожно вводили в правый бок самок мышей NOD/SCID (соотношение Е:Т-клеток 1:2). Мыши контрольной группы 1 плацебо (n = 5) не получали эффекторных клеток и использовали в качестве нетрансплантированного контроля для сравнения с контрольной группой 2 плацебо (n = 10, получая эффекторные клетки) для мониторинга воздействия РВМС на рост опухоли в отсутствие антител.

Мышей обрабатывали 0,5 мг/кг/сутки (группа 3, n = 10), 0,05 мг/кг/сутки (группа 4, n = 10) или 0,005 мг/кг/сутки (группа 5, n = 10) биспецифического антитела CDH3xCD3, специфически связывающегося с внеклеточным субдоменом D2C CDH3 с помощью ежедневной внутривенной болюсной инъекции в течение 10 последовательных суток, начиная примерно через 2 ч после инъекции опухолевых клеток на 1-е сутки.

Опухоли измерялись с помощью штангенциркуля во время исследования, а результаты оценивались

путем межгруппового сравнения объемов опухолей (TV). Ингибирование роста опухоли T/C [%] определяли путем вычисления TV как  $T/C\% = 100 \times (\text{медианное TV анализируемой группы}) / (\text{медианное TV контрольной группы})$ .

Результаты представлены на фиг. 11. Обработка мышей биспецифическим антителом CDH3xCD3 при дозе 0,5 мг/кг/сутки приводила к полному ингибированию образования опухолей, и ни у одного из животных не развивалась опухоль до конца исследования (40-е сутки).

Пример 15. Противоопухолевая активность биспецифического антитела HLE CDH3xCD3 в опухолевой модели НСТ-116

Анализ проводили у самцов мышей NOD/SCID, которым подкожно вводили клетки карциномы толстой кишки человека НСТ-116. Эффекторные клетки были *in vitro* размноженными и активированными CD3 Т клетками человека (12-е сутки). Лечение начинали, когда опухоли достигли объема ~ 200 мм (17-е сутки). Контрольная группа представляла собой группу q5d с Т-клетками, обработанную плацебо. Антитело, имеющее SEQ ID NO: 425 вводили в концентрации 5 мг/кг/введение (группа 2) и 0,5 мг/кг/введение (группа 3) каждые пять суток (q5d) с помощью внутривенных болюсных инъекций. Результаты представлены на фиг. 12А и 12В. В частности, на фиг. 12В выделен результат, в виде реагирующих животных (7/10) и нереагирующих животных (3/10). Хотя причина отсутствия ответа у 30% животных неясна, на фиг. 12В показано, что введение биспецифической конструкции с увеличенным периодом полувыведения в концентрации 5 мг/кг для реагирующих животных приводит к прекращению роста опухоли, начиная с момента введения антитела.

Пример 16. Анализ активации активации Т-клеток

Изолированный РВМС от здоровых доноров человека культивировали с увеличением концентрации CDH3-13~I2C или CDH3-13xI2C-HALB биспецифических антител в течение 48 ч (серийные разведения 0,001 пМ-20 мкМ). Экспрессию активационного маркера CD69 на CD4+ и CD8+ Т-клетках определяли путем иммуноокрашивания и проточной цитометрии и специфических к антигену конъюгатов mAb. Результаты представлены на фиг. 13 и обсуждены выше.

Пример 17. Фармакокинетическое исследование у макака конструкций с увеличенным периодом полувыведения

Самки яванского макака получили в/в (внутривенно) инфузию в течение 60 мин с 0,015 мг/кг конструкции антитела CDH3xCD3 с увеличенным периодом полувыведения (объем 1 мл/кг) в буфере. Три тестируемых формата HLE представляли собой P156, HALB и HALB вариант 1 (см. SEQ ID NO: 437, 443 и 444), каждый из которых сливали с С-концом конструкции. Период полувыведения этих HLE-конструкций рассчитывали на основании и концентрации в плазме крови, определявшейся в четырех (P156) и шести (HALB, вариант 1 HALB) временных точках между 96 ч последующего назначения и окончанием исследования. Расчетный период полувыведения этих конструкций HLE в модели макака составлял 57 ч, 63-85 ч и 68 ч соответственно. Эти свойства РК подтверждают в/в дозировку у людей раз в неделю.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция биспецифического одноцепочечного антитела, содержащая первый связывающий домен человека, который связывается с кластером эпитопа CDH3 человека на поверхности клетки-мишени, где первый связывающий домен также связывается с CDH3 макака, и содержащая второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, причем кластер эпитопа CDH3 человека находится в аминокислотных положениях 291-363 (SEQ ID NO: 36) CDH3 человека, как показано в SEQ ID NO: 1, где указанные связывающие домены имеют следующий формат: пары участков VH и участков VL находятся в формате одноцепочечного антитела (scFv).

2. Конструкция антитела по п.1, отличающаяся тем, что первый связывающий домен связывается с эпитопом, который находится в аминокислотных положениях 291-327 (SEQ ID NO: 34) CDH3 человека.

3. Конструкция антитела по п.1, отличающаяся тем, что первый связывающий домен связывается с эпитопом, который находится в аминокислотных положениях 328-363 (SEQ ID NO: 35) CDH3 человека.

4. Конструкция антитела по п.1, отличающаяся тем, что первый связывающий домен также связывается с эпитопом, который находится в аминокислотных положениях 404-440 (SEQ ID NO: 390) CDH3 человека.

5. Конструкция антитела по любому из пп.1 и 2, отличающаяся тем, что первый связывающий домен содержит участок VH, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и участок VL, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из:

а) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 149, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 150, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 151, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 152, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 153, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 154;

б) CDR-H1, как показано в SEQ ID NO: 159, CDR-H2, как показано в SEQ ID NO: 160, CDR-H3, как показано в SEQ ID NO: 161, CDR-L1, как показано в SEQ ID NO: 162, CDR-L2, как показано в SEQ ID NO: 163, и CDR-L3, как показано в SEQ ID NO: 164;



355.

10. Конструкция антитела по п.6, отличающаяся тем, что первый связывающий домен содержит участок VL, выбранный из группы, состоящей из участков VL, как показано в SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 306, SEQ ID NO: 316, SEQ ID NO: 326, SEQ ID NO: 336, SEQ ID NO: 346 и SEQ ID NO: 356.

11. Конструкция антитела по пп.5, 7 или 8, отличающаяся тем, что первый связывающий домен содержит участок VH и участок VL, выбранные из группы, состоящей из пар участка VH и участка VL, как показано в SEQ ID NO: 155+156, SEQ ID NO: 165+166, SEQ ID NO: 175+176, SEQ ID NO: 185+186, SEQ ID NO: 195+196, SEQ ID NO: 205+206, SEQ ID NO: 215+216, SEQ ID NO: 225+226, SEQ ID NO: 235+236 и SEQ ID NO: 245+246.

12. Конструкция антитела по п.6 или 9, отличающаяся тем, что первый связывающий домен содержит участок VH и участок VL, выбранные из группы, состоящей из пар участка VH и участка VL, как показано в SEQ ID NO: 285+286, SEQ ID NO: 295+296, SEQ ID NO: 305+306, SEQ ID NO: 315+316, SEQ ID NO: 325+326, SEQ ID NO: 335+336, SEQ ID NO: 345+346 и SEQ ID NO: 355+356.

13. Конструкция антитела по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что находится в формате, выбранном из группы, состоящей из (scFv)<sub>2</sub>-, однодоменного scFv-mAb (моноклонального антитела), диатела и олигомеров вышеуказанных форматов.

14. Конструкция антитела по любому из пп.5, 7, 8, 11 или 13, отличающаяся тем, что первый связывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из тех, которые показаны в SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 237 и SEQ ID NO: 247

15. Конструкция антитела по любому из пп.6, 9, 10, 12 или 13, отличающаяся тем, что первый связывающий домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из тех, которые показаны в SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 327, SEQ ID NO: 337, SEQ ID NO: 347 и SEQ ID NO: 357.

16. Конструкция антитела по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что второй связывающий домен связывается с CD3 эpsilon человека и Callithrix jacchus, Saguinus Oedipus или Saimiri sciureus.

17. Конструкция антитела по любому из пп.5, 7, 9, 11, 12 или 13, имеющая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из тех, которые показаны в SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 238 и SEQ ID NO: 248, или имеющая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из тех, которые показаны в SEQ ID NO: 379, SEQ ID NO: 380, SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 382, SEQ ID NO: 383, SEQ ID NO: 384, SEQ ID NO: 385, SEQ ID NO: 386, SEQ ID NO: 387, SEQ ID NO: 388, SEQ ID NO: 389, SEQ ID NO: 422, SEQ ID NO: 423, SEQ ID NO: 424, SEQ ID NO: 425, SEQ ID NO: 426 и SEQ ID NO: 427.

18. Конструкция антитела по любому из пп.6, 8, 10, 11, 12 или 14, имеющая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из тех, которые показаны в SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 308, SEQ ID NO: 318, SEQ ID NO: 328, SEQ ID NO: 338, SEQ ID NO: 348 и SEQ ID NO: 358.

19. Полинуклеотид, кодирующий конструкцию антитела по любому из предшествующих пунктов.

20. Вектор для трансформации или трансфекции клетки-хозяина, содержащий полинуклеотид по п.19.

21. Клетка-хозяин для экспрессии конструкции антитела, трансформированная или трансфицированная полинуклеотидом по п.19 или вектором по п.20.

22. Способ получения конструкции антитела по любому из пп.1-18, включающий культивирование клетки-хозяина по п.21 в условиях, позволяющих экспрессировать конструкцию антитела по любому из пп.1-18, и выделение продуцированной конструкции антитела из культуры.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию антитела по любому из пп.1-18 или полученную способом по п.22, и дополнительно содержащая один или более носителей, стабилизаторов, эксципиентов, разбавителей, солюбилизаторов, поверхностно-активных веществ, эмульгаторов, консервантов и/или адьювантов.

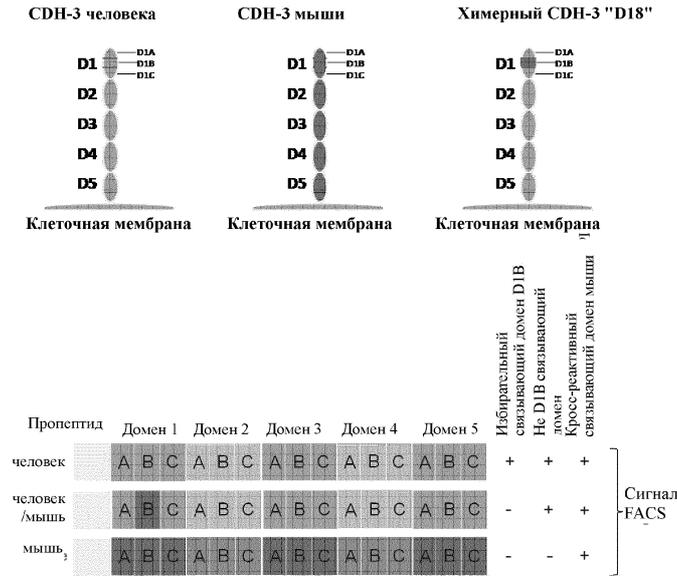
24. Применение конструкции антитела по любому из пп.1-18, или полученной способом по п.22, в профилактике или лечении рака.

25. Применение конструкции антитела по п.24, где рак выбирают из группы, состоящей из карциномы легкого, карциномы головы и шеи, первичной или вторичной опухоли ЦНС, первичной или вторичной опухоли головного мозга, первичной лимфомы ЦНС, опухолей оси позвоночника, глиомы ствола мозга, аденомы гипофиза, аденокарцинома рака, карциномы пищевода, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичника, НМРЛ (немелкоклеточного рака легкого), МРЛ (мелкоклеточного рака легкого), рака эндометрия, рака шейки матки, рака матки, переходной-клеточной карциномы, рака кости, рака поджелудочной железы, рака кожи, кожной или внутриглазной меланомы, рака печени, рака желчного протока, рака желчного пузыря, рака почки, рака прямой кишки, рака анальной области, рака же-

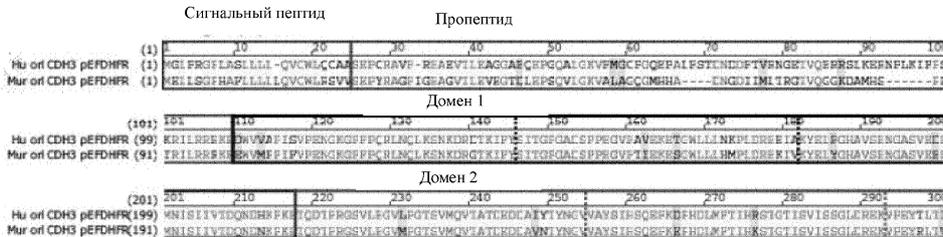
лудка, желудочно-кишечного (желудочный, колоректальный и дуоденальный) рака, рака тонкого кишечника, рака желчных протоков, рака уретры, почечно-клеточной карциномы, карциномы эндометрия, рака щитовидной железы, рака яичек, плоскоклеточного рака кожи, меланомы, рака желудка, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, остеосаркомы, мезотелиомы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, хронического или острого лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, лимфоцитарных лимфом, множественной миеломы, фибросаркомы, нейробластомы, ретинобластомы и саркомы мягких тканей.

26. Применение конструкции антитела по п.24, где рак представляет собой плоскоклеточную карциному.

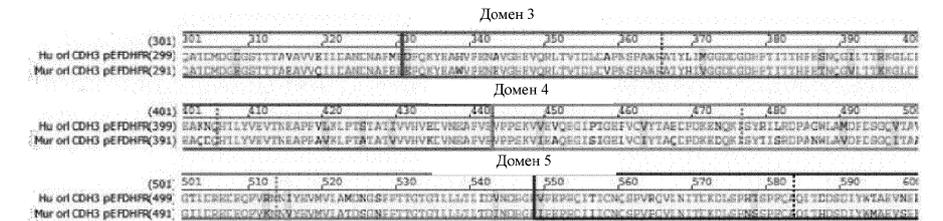
27. Конструкция биспецифического однопечочного антитела по п.1, где первый связывающий домен также связывается с CDH3 *Musca fascicularis*.



Фиг. 1

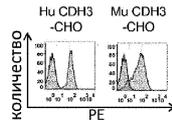


Фиг. 2(1)

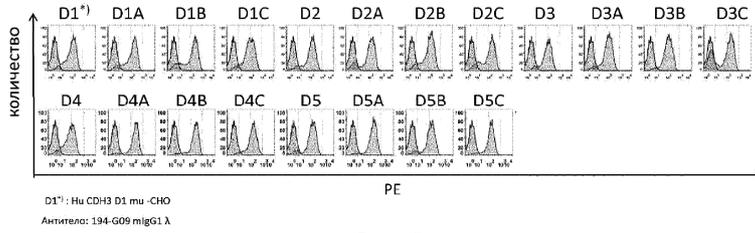


Картирование эпитопов конструкции CDH3

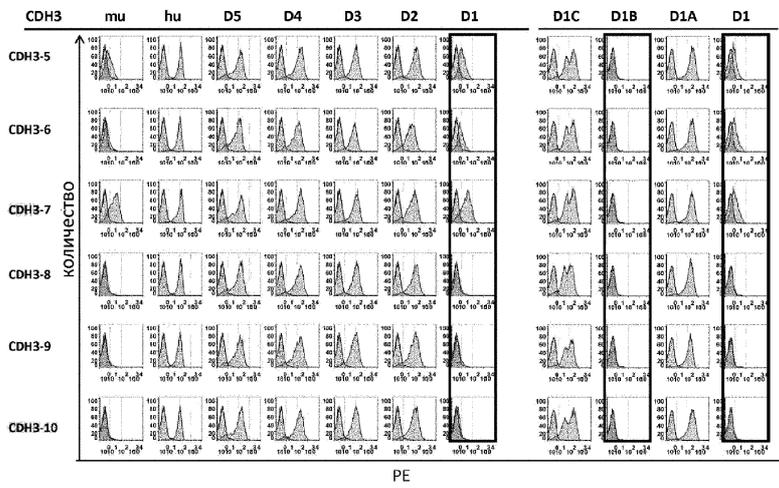
Экспрессия CDH3 человека и мыши на клетках CHO (контроли)



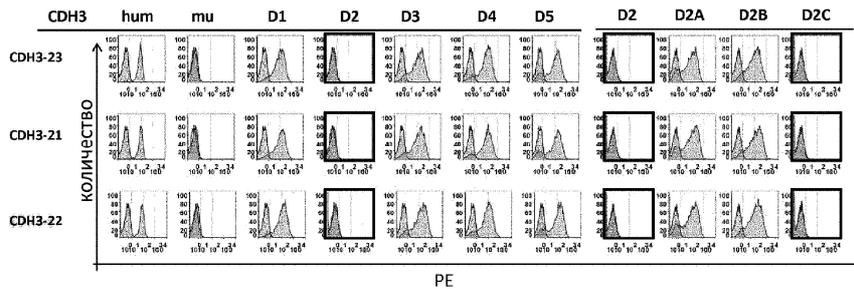
Экспрессия молекул химерных CDH3 на клетках CHO (контроли)



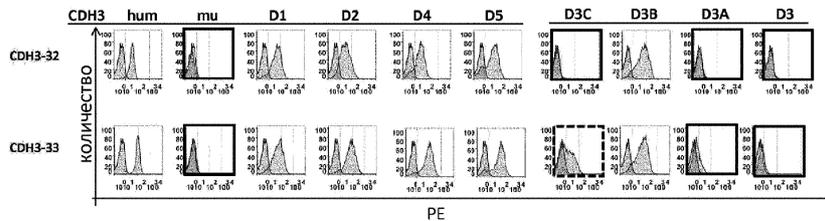
Фиг. 3



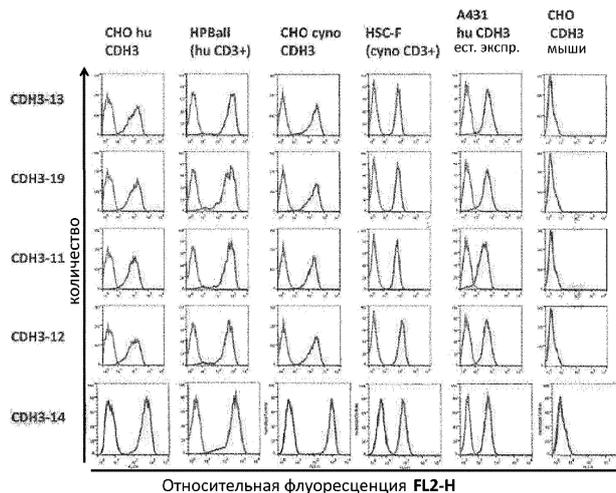
Фиг. 4A



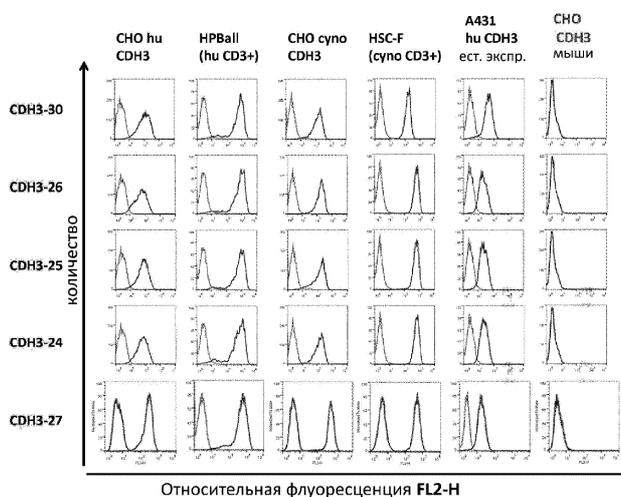
Фиг. 4B



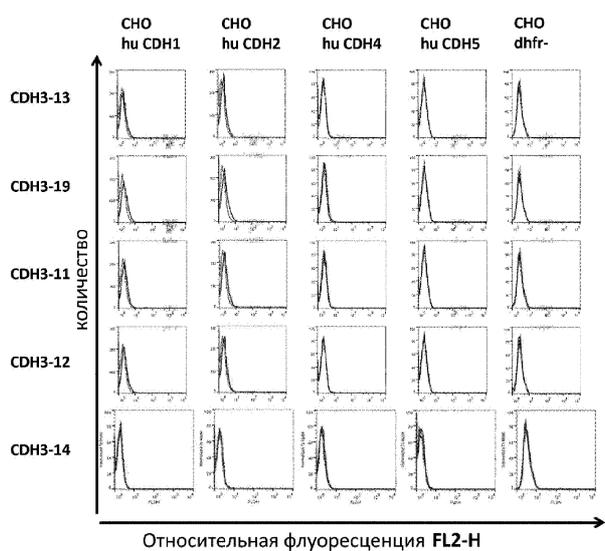
Фиг. 4C



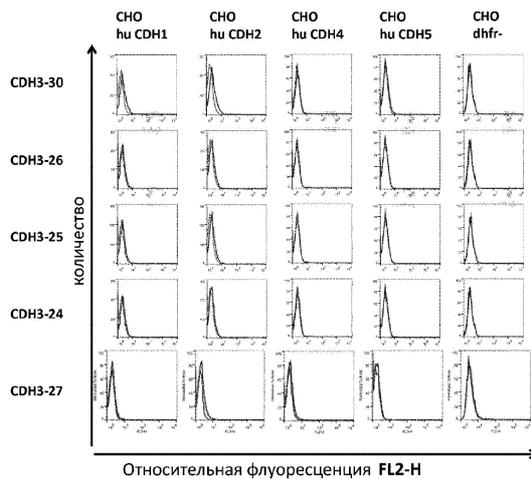
Фиг. 5А



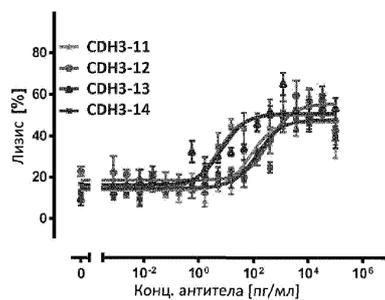
Фиг. 5В



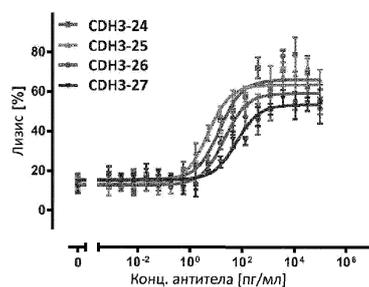
Фиг. 5С



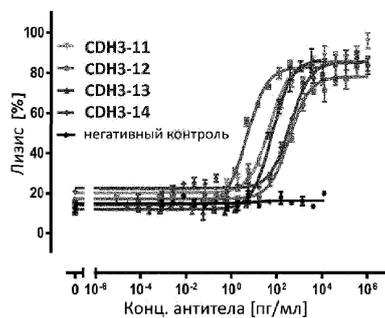
Фиг. 5D



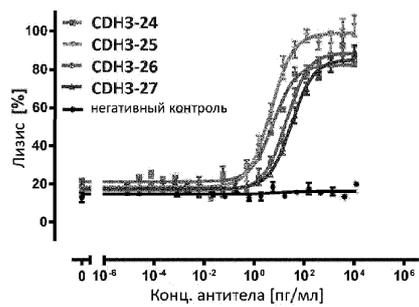
Фиг. 6А



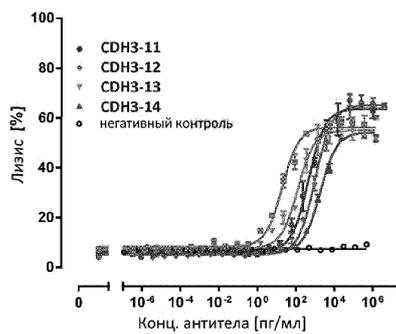
Фиг. 6В



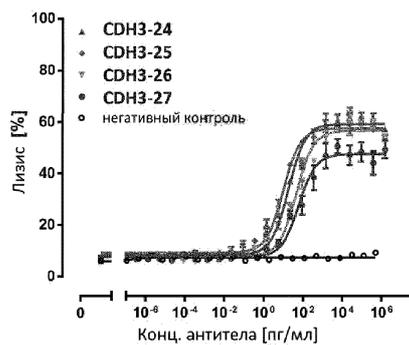
Фиг. 7А



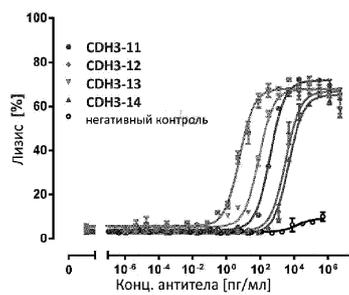
Фиг. 7В



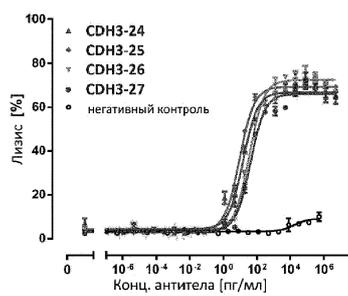
Фиг. 8А



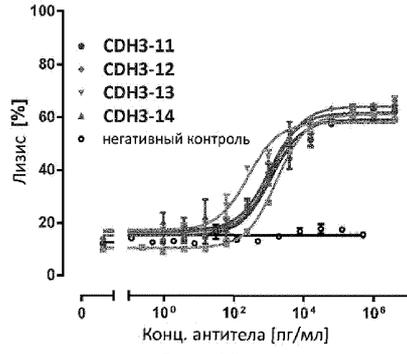
Фиг. 8В



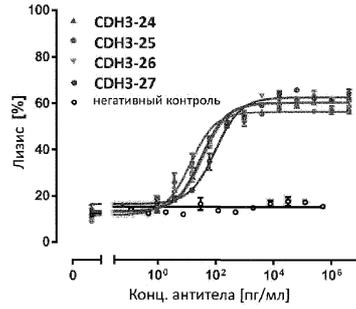
Фиг. 9А



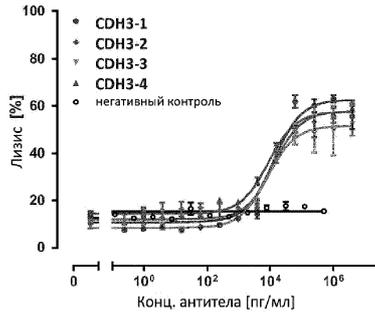
Фиг. 9В



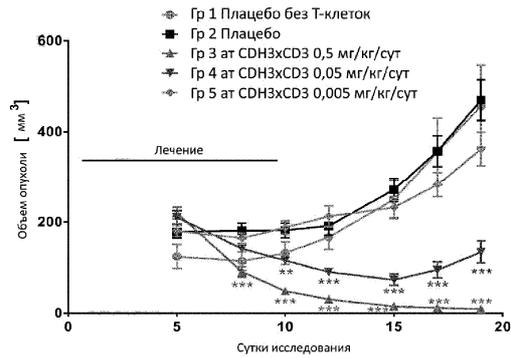
Фиг. 10А



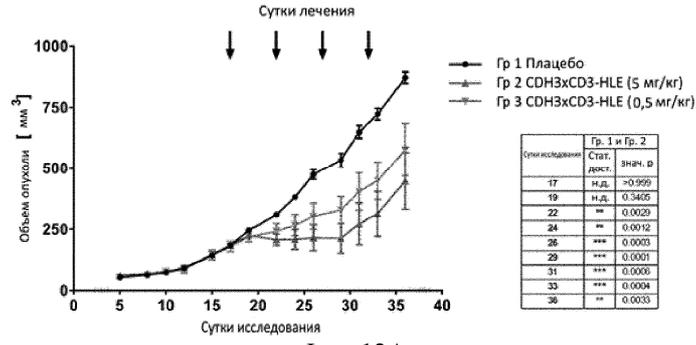
Фиг. 10В



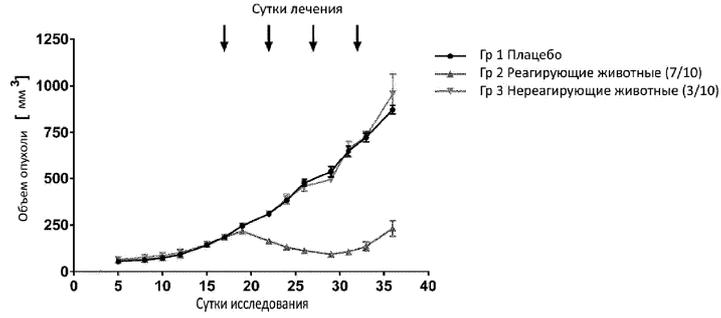
Фиг. 10С



Фиг. 11

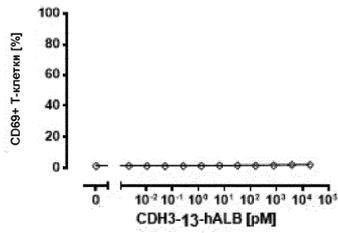
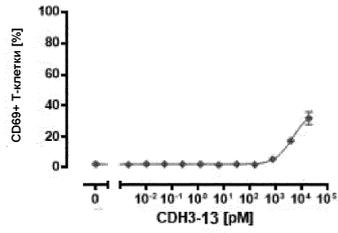


Фиг. 12А



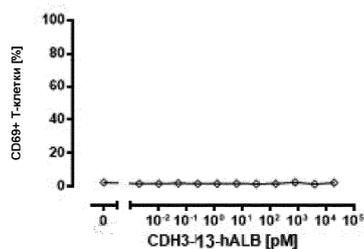
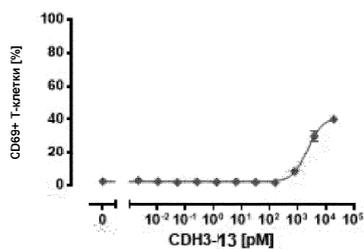
Фиг. 12В

Донор № 1



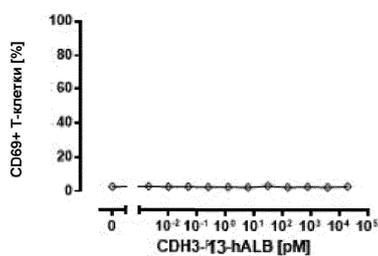
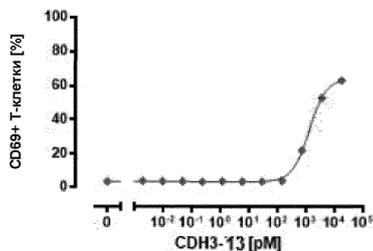
Фиг. 13(1)

Донор № 2



Фиг. 13(2)

Донор № 3



Фиг. 13(3)

