

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293265** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.28

(22) Дата подачи заявки
2016.05.20

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

(54) ТРИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗАННЫЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

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

(32) 2015.05.21; 2015.05.22; 2016.03.08

(33) US

(62) 201792573; 2016.05.20

(71) Заявитель:
ХАРПУН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

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

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

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

A1

202293265

202293265

A1

ТРИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗАННЫЕ БЕЛКИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Описание

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/305 088, поданной 8 марта 2016 года; предварительной заявки США № 62/165 833, поданной 22 мая 2015 года; и предварительной заявки США № 62/165, 153, поданной 21 мая 2015 года, причем все заявки включены в настоящее описание посредством отсылки во всей их полноте.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001.1] В настоящей заявке содержится список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Упомянутая копия ASCII, созданная 17 мая 2016 года, называется 47517_701_601_SL.txt и имеет размер 128512 байтов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Селективное разрушение отдельной клетки или клеток определенного типа часто желательно в различных клинических ситуациях. Например, основной целью терапии рака является специфическое уничтожение опухолевых клеток с оставлением здоровых клеток и тканей нетронутыми и неповрежденными. Один из таких способов терапии заключается в индуцировании иммунного ответа против опухоли с тем, чтобы заставить иммунные эффекторные клетки, такие как естественные клетки-киллеры (natural killer (NK) cells) или цитотоксические Т-лимфоциты (cytotoxic T lymphocytes (CTL)), атаковать и разрушать опухолевые клетки.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Настоящее изобретение относится к триспецифическому антигенсвязывающему белку, его фармацевтическим композициям, а также нуклеиновым кислотам, рекомбинантным экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения таких триспецифических антигенсвязывающих белков и способам применения для лечения заболеваний, расстройств или состояний. В одном аспекте настоящее изобретение относится к триспецифическим антигенсвязывающим белкам, причем упомянутые белки включают (a) первый домен (A), который специфически связывается с CD3 человека; (b) второй домен (B), который

представляет собой домен, служащий для удлинения периода полувыведения; и (с) третий домен (C), который специфически связывается с антигеном-мишенью, причем данные домены связаны в порядке $H_2N-(A)-(B)-(C)-COOH$, $H_2N-(A)-(C)-(B)-COOH$, $H_2N-(B)-(A)-(C)-COOH$, $H_2N-(B)-(C)-(A)-COOH$, $H_2N-(C)-(B)-(A)-COOH$ или $H_2N-(C)-(A)-(B)-COOH$ с помощью линкеров L1 и L2.

[0004] В определенных аспектах настоящее изобретение также относится к триспецифическим антигенсвязывающим белкам, причем упомянутые белки включают (а) первый домен (A), который специфически связывается с CD3 человека; (b) второй домен (B), который представляет собой домен, служащий для удлинения периода полувыведения; и (с) третий домен (C), который специфически связывается с антигеном-мишенью, причем данные домены связаны в порядке $H_2N-(A)-(C)-(B)-COOH$, $H_2N-(B)-(A)-(C)-COOH$ или $H_2N-(C)-(B)-(A)-COOH$ с помощью линкеров L1 и L2.

[0005] В определенных аспектах настоящее изобретение также относится к триспецифическим антигенсвязывающим белкам, причем упомянутые белки включают (а) первый домен (A), который специфически связывается с CD3 человека; (b) второй домен (B), который представляет собой домен, служащий для удлинения периода полувыведения; и (с) третий домен (C), который специфически связывается с антигеном-мишенью, причем данные домены связаны в порядке $H_2N-(A)-(B)-(C)-COOH$, $H_2N-(A)-(C)-(B)-COOH$, $H_2N-(B)-(A)-(C)-COOH$, $H_2N-(B)-(C)-(A)-COOH$, $H_2N-(C)-(B)-(A)-COOH$ или $H_2N-(C)-(A)-(B)-COOH$ с помощью линкеров L1 и L2, и где первый домен связывается с CD3 человека с KD , превышающей 100 нМ.

[0006] В определенных аспектах настоящее изобретение также относится к триспецифическим антигенсвязывающим белкам, причем упомянутые белки включают (а) первый домен (A), который специфически связывается с CD3 человека; (b) второй домен (B), который представляет собой домен, служащий для удлинения периода полувыведения; и (с) третий домен (C), который специфически связывается с антигеном-мишенью, причем данные домены связаны в порядке $H_2N-(A)-(B)-(C)-COOH$, $H_2N-(A)-(C)-(B)-COOH$, $H_2N-(B)-(A)-(C)-COOH$, $H_2N-(B)-(C)-(A)-COOH$, $H_2N-(C)-(B)-(A)-COOH$ или $H_2N-(C)-(A)-(B)-COOH$ с помощью линкеров L1 и L2, и где белок имеет молекулярную массу менее 55 кДа.

[0007] В определенных аспектах настоящее изобретение также относится к триспецифическим антигенсвязывающим белкам, причем упомянутые белки включают (а) первый домен (A), который специфически связывается с CD3 человека; (b) второй домен (B), который представляет собой домен, служащий для удлинения периода полувыведения; и (с)

третий домен (C), который специфически связывается с антигеном-мишенью, причем данные домены связаны в порядке $H_2N-(A)-(B)-(C)-COOH$, $H_2N-(A)-(C)-(B)-COOH$, $H_2N-(B)-(A)-(C)-COOH$, $H_2N-(B)-(C)-(A)-COOH$, $H_2N-(C)-(B)-(A)-COOH$ или $H_2N-(C)-(A)-(B)-COOH$ с помощью линкеров L1 и L2, и где В включает однодоменное антитело, которое связывается с сывороточным альбумином.

[0008] Различные варианты осуществления триспецифических антигенсвязывающих белков также обеспечены в настоящем изобретении, рассматриваемые для любого аспекта в настоящем изобретении, отдельно или в комбинации. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь, каждая из которых способна специфически связываться с человеческим CD3. В некоторых вариантах осуществления переменная легкая цепь представляет собой λ (лямбда) легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления переменная легкая цепь представляет собой κ (каппа) легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит одноцепочечный переменный фрагмент (single-chain variable fragment (scFv)), специфичный для CD3 человека. В некоторых вариантах осуществления первый домен специфичен для CD3 ϵ (эпсилон). В некоторых вариантах осуществления первый домен специфичен для CD3 δ (дельта). В некоторых вариантах осуществления первый домен специфичен для CD3 γ (гамма). В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит определяющие комплементарность области (complementary determining regions (CDR)), выбранные из группы, состоящей из муромонаба-CD3 (ОКТ3), отеликсизумаба (TRX4), теплизумаба (MGA031), визилизумаба (Nuvion), SP34, X35, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, ОКТ3D, M-T301, SMC2, F101.01, UCNT-1 и WT-31. В некоторых вариантах осуществления первый домен является гуманизированным или человеческим. В некоторых вариантах осуществления первый домен имеет KD связывания с CD3 на CD3-экспрессирующих клетках, равную 1000 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления первый домен имеет KD связывания с CD3 на CD3-экспрессирующих клетках, равную 100 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления первый домен имеет KD связывания с CD3 на CD3-экспрессирующих клетках равную 10 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления первый домен имеет перекрестную реактивность с CD3 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит аминокислотную последовательность, обеспеченную в настоящем изобретении.

[0009] В некоторых вариантах осуществления второй домен связывает человеческий сывороточный альбумин. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит scFv, переменный тяжелый домен (VH), переменный легкий домен (VL), однодоменное антитело, пептид, лиганд или низкомолекулярную группу. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит домен VH. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит домен VL. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит однодоменное антитело. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит пептид. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит лиганд. В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит низкомолекулярную группу.

[0010] В некоторых вариантах осуществления третий домен содержит scFv, домен VH, домен VL, не являющийся частью Ig домен, лиганд, нуклеин или низкомолекулярную группу, которые специфически связываются с антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления третий домен характеризуется специфичностью по отношению к молекуле клеточной поверхности. В некоторых вариантах третий домен характеризуется специфичностью по отношению к опухолевому антигену.

[0011] В некоторых вариантах осуществления линкеры L1 и L2 представляют собой пептидные линкеры. В некоторых вариантах осуществления линкеры L1 и L2 независимо состоят из около 20 или менее аминокислотных остатков. В некоторых вариантах линкеры L1 и L2, каждый независимо, выбраны из (GS)_n (SEQ ID NO: 49), (GGS)_n (SEQ ID NO: 50), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 51), (GGSG)_n (SEQ ID NO: 52), (GGSGG)_n (SEQ ID NO: 53) или (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 54), где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах линкеры L1 и L2, каждый независимо, представляют собой (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 55) или (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 56). В некоторых вариантах осуществления линкеры L1 и L2 представляют собой химические линкеры.

[0012] В некоторых вариантах осуществления первый домен находится на N-конце белка. В некоторых вариантах осуществления второй домен находится на N-конце белка. В некоторых вариантах осуществления третий домен находится на N-конце белка. В некоторых вариантах осуществления первый домен находится на C-конце белка. В некоторых вариантах осуществления второй домен находится на C-конце белка. В некоторых вариантах осуществления третий домен находится на C-конце белка.

[0013] В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса белка меньше, чем около 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса белка составляет от

около 50 до около 75 кДа. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса белка меньше, чем около 50 кДа. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса белка меньше, чем около 40 кДа. В некоторых вариантах осуществления молекулярная масса белка составляет от около 20 до около 40 кДа. В некоторых вариантах осуществления белок имеет период полувыведения, составляющий по меньшей мере около 50 часов. В некоторых вариантах осуществления белок имеет период полувыведения, составляющий по меньшей мере около 100 часов. В некоторых вариантах осуществления белок характеризуется повышенным проникновением в ткани по сравнению с IgG против того же антигена-мишени.

[0014] Настоящее изобретение также относится, в другом аспекте, к полинуклеотидам, кодирующим триспецифические антигенсвязывающие белки по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления. В другом аспекте, представленном в настоящем изобретении, обеспечены векторы, содержащие описанные полинуклеотиды. В другом аспекте, представленном в настоящем изобретении, обеспечены клетки-хозяева, трансформированные описанными векторами.

[0015] В еще одном аспекте, представленном в настоящем изобретении, обеспечены фармацевтические композиции, содержащие триспецифический антигенсвязывающий белок по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления, полинуклеотид, кодирующий триспецифический антигенсвязывающий белок по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления, вектор, содержащий описанные полинуклеотиды, или клетка-хозяин, трансформированная вектором по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0016] Настоящее изобретение также относится к способам получения триспецифического антигенсвязывающего белка по любому из аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения, причем упомянутый способ включает культивирование хозяина, трансформированного или трансфицированного вектором, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любой триспецифический антигенсвязывающий белок в настоящем изобретении, в условиях, позволяющих проводить экспрессию белка и выделение и очистку полученного белка из культуры.

[0017] Настоящее изобретение также относится к способам для лечения или улучшения пролиферативного заболевания, опухолевого заболевания, воспалительного заболевания, иммунологического расстройства, аутоиммунного заболевания, инфекционного заболевания, вирусного заболевания, аллергических реакций, паразитных реакций, заболеваний «трансплантат-против-хозяина» или заболеваний «хозяин-против-трансплантата»,

включающим введение триспецифического антигенсвязывающего белка по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления субъекту, нуждающемуся в таком лечении или улучшении. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение средства в сочетании с описанным в настоящем изобретении триспецифическим антигенсвязывающим белком.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0018] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0019] Новые признаки изобретения изложены со всеми особенностями в прилагаемой формуле изобретения. Более полное понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет получено со ссылкой на следующее подробное описание, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы настоящего изобретения, и сопровождающие их чертежи:

[0020] Фигура 1 является схематическим представлением иллюстративного триспецифического антигенсвязывающего белка, где данный белок имеет константный основной элемент, содержащий анти-CD3ε одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) и анти-HSA вариабельную область тяжелой цепи; и связывающий мишень вариабельный домен, который может представлять собой VH, scFv, не являющийся частью Ig связывающий элемент или лиганд.

[0021] Фигура 2 является схематическим представлением дополнительных иллюстративных триспецифических антигенсвязывающих белков, созданных для оптимального проникновения в ткани. На фигуре 2, *слева*, показан в качестве иллюстрации триспецифический антигенсвязывающий белок, содержащий фрагменты однодоменного антитела во всех доменах. На фигуре 2, в *середине*, показан в качестве иллюстрации триспецифический антигенсвязывающий белок, включающий ноттин, который связывается с антигеном-мишенью. На фигуре 2, *справа*, показан в качестве иллюстрации триспецифический антигенсвязывающий белок, содержащий природный лиганд, который связывается с антигеном-мишенью.

[0022] Фигура 3 представляет собой схематическое изображение присоединения низкомолекулярного связывающего элемента к триспецифическому антигенсвязывающему белку. Триспецифический антигенсвязывающий белок содержит последовательность распознавания сортазы в качестве домена, связывающего антиген-мишень. После инкубации белка с сортазой и присоединенным к остатку глицина низкомолекулярным связывающим элементом, сортаза лигирует или конъюгирует низкомолекулярный связывающий элемент с сайтом распознавания. На фигуре показана последовательность «LPETGG» как SEQ ID NO: 60 и последовательность «LPETG» как SEQ ID NO: 57.

[0023] На фигуре 4 показано схематическое представление шести различных способов, с помощью которых могут быть расположены три домена данных триспецифических антигенсвязывающих молекул.

[0024] На фигуре 5 сравнивается способность молекул BiTE (EGFR-направленный BiTE от Lutterbuese et al., 2007. PNAS 107: 12605-12610 и PSMA-направленный BiTE pasotuxizumab) со способностью направленных против EGFR и PSMA и содержащих VH-домен триспецифических молекул индуцировать первичные человеческие Т-клетки для уничтожения опухолевых клеток.

[0025] На фигуре 6 показано, что все шесть возможных конфигураций триспецифической молекулы, содержащей EGFR-направленный VH-домен, могут индуцировать Т-клетки для уничтожения линии NCI-1563 опухолевых клеток человека. Эксперимент проводили в отсутствие (слева на фигуре) и присутствии (справа на фигуре) человеческого сывороточного альбумина с EGFR-направленным BiTE в качестве положительного контроля.

[0026] На фигуре 7 оценивается способность пяти возможных конфигураций триспецифической молекулы, содержащей PSMA-направленный домен VH, индуцировать Т-клетки для уничтожения линии 22Rv1 опухолевых клеток человека. Эксперимент проводили в отсутствие (слева на фигуре) и присутствии (справа на фигуре) человеческого сывороточного альбумина с PSMA-направленным BiTE в качестве положительного контроля. Показана также активность PSA-направленной триспецифической молекулы с PSMA-направленным scFv.

[0027] На фигуре 8 показано, что триспецифические молекулы могут состоять из константного основного элемента, содержащего одноцепочечный вариабельный фрагмент анти-CD3ε (scFv) и анти-HSA вариабельную область тяжелой цепи; и связывающего мишень вариабельного домена, который может представлять собой scFv.

[0028] На фигуре 9 показано, что триспецифические молекулы, которые используют финомер, в отличие от полученного из антитела домена для направленной доставки в опухоль, могут индуцировать Т-клетки для уничтожения опухолевых клеток.

[0029] Фигура 10 показывает, что, когда направленные против EGFR триспецифические молекулы перенаправляют Т-клетки для уничтожения опухолевых клеток CaPan2 человека (панель А), Т-клетки активируются и продуцируют цитокины TNF- α (панель В) и IFN γ (панель С), в зависимости от дозы триспецифической молекулы.

[0030] На фигуре 11 показано, что, когда направленные против PSMA триспецифические молекулы перенаправляют Т-клетки для уничтожения опухолевых клеток 22Rv1 человека (панель А), Т-клетки активируются и продуцируют цитокины TNF- α (панель В) и IFN γ (панель С), в зависимости от дозы триспецифической молекулы.

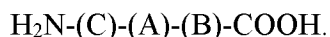
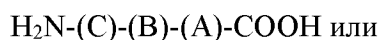
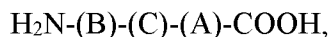
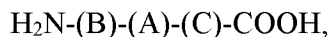
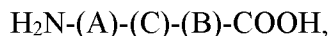
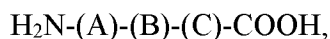
[0031] На фигуре 12 показано, что направленные против MSLN триспецифические молекулы могут мигрировать через матриксель быстрее, чем обычные антитела.

[0032] На фигуре 13 показано фаговое титрование на биотин-CD3 ϵ и биотин-HSA.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0033] Настоящее изобретение относится к триспецифическим антигенсвязывающим белкам, их фармацевтическим композициям, а также нуклеиновым кислотам, рекомбинантным экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения таких триспецифических антигенсвязывающих белков. Настоящее изобретение также относится к способам применения раскрытых триспецифических антигенсвязывающих белков в профилактике и/или лечении заболеваний, состояний и расстройств. Триспецифические антигенсвязывающие белки способны специфически связываться с антигеном-мишенью, а также с CD3 и доменом удлинения периода полувыведения, таким как домен связывания сывороточного альбумина человека (human serum альбумин (HSA)). **На фигуре 1** представлен один неограничивающий пример триспецифического антигенсвязывающего белка.

[0034] В одном аспекте настоящего изобретения триспецифические антигенсвязывающие белки содержат домен (А), который специфически связывается с CD3, домен (В), который специфически связывается с человеческим сывороточным альбумином (HSA), и домен (С), который специфически связывается с антигеном-мишенью. Три домена в триспецифических антигенсвязывающих белках расположены в любом порядке. Таким образом, предполагается, что порядок доменов триспецифических антигенсвязывающих белков представляют собой:



[0035] В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки имеют порядок доменов $\text{H}_2\text{N}-(\text{A})-(\text{B})-(\text{C})-\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки имеют порядок доменов $\text{H}_2\text{N}-(\text{A})-(\text{C})-(\text{B})-\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки имеют порядок доменов $\text{H}_2\text{N}-(\text{B})-(\text{A})-(\text{C})-\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки имеют порядок доменов $\text{H}_2\text{N}-(\text{B})-(\text{C})-(\text{A})-\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки имеют порядок доменов $\text{H}_2\text{N}-(\text{C})-(\text{B})-(\text{A})-\text{COOH}$. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки имеют порядок доменов $\text{H}_2\text{N}-(\text{C})-(\text{A})-(\text{B})-\text{COOH}$.

[0036] Триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, необязательно содержат полипептид, имеющий последовательность, описанную в таблице 6 или таблице 7 (SEQ ID NO: 1-48), и ее подпоследовательности. В некоторых вариантах осуществления триспецифический антигенсвязывающий белок содержит полипептид, имеющий по меньшей мере от 70% до 95% или более гомологии с последовательностью, описанной в таблице 6 или таблице 7 (SEQ ID NO: 1-48). В некоторых вариантах осуществления триспецифический антигенсвязывающий белок содержит полипептид, имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более гомологии с последовательностью, описанной в таблице 6 или таблице 7 (SEQ ID NO: 1-48). В некоторых вариантах осуществления триспецифический антигенсвязывающий белок имеет последовательность, содержащую, по меньшей мере, часть последовательности, описанной в таблице 6 или таблице 7 (SEQ ID NO: 1-48). В некоторых вариантах осуществления триспецифический антигенсвязывающий белок содержит полипептид, содержащий одну или более последовательностей, описанных в таблице 6 или таблице 7 (SEQ ID NO: 1-48).

[0037] Триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, предназначены для обеспечения специфического направленной доставки в клетки, экспрессирующие антиген-мишень, путем рекрутирования цитотоксических Т-клеток. Это повышает эффективность по сравнению с ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity), которая использует полноразмерные антитела, направленные против единственного антигена, и не способна непосредственно рекрутировать цитотоксические Т-клетки. Напротив, привлекая молекулы CD3, экспрессируемые конкретно на данных клетках, триспецифические антигенсвязывающие белки могут сшивать цитотоксические Т-клетки с клетками, экспрессирующими антиген-мишень, с высокой степенью специфичности, тем самым направляя цитотоксический потенциал Т-клетки в сторону клетки-мишени. Триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, привлекают цитотоксические Т-клетки через связывание с экспрессируемыми на клеточной поверхности белками CD3, которые образуют часть TCR. Одновременное связывание нескольких триспецифических антигенсвязывающих белков с CD3 и антигеном-мишенью, экспрессируемым на поверхности конкретных клеток, вызывает активацию Т-клеток и опосредует последующий лизис определенной клетки, экспрессирующей антиген-мишень. Таким образом, предполагается, что триспецифические антигенсвязывающие белки осуществляют сильное, специфическое и эффективное уничтожение клеток-мишеней. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки стимулируют уничтожение клеток-мишеней цитотоксическими Т-клетками с целью устранения патогенных клеток (например, опухолевых клеток, инфицированных вирусами или бактериями клеток, аутореактивных Т-клеток и т. д.). В некоторых из таких вариантов осуществления клетки избирательно удаляются, тем самым снижая вероятность токсических побочных эффектов. В других вариантах осуществления те же самые полипептиды могут быть использованы для усиления элиминации эндогенных клеток, таких как В- или Т-лимфоциты при аутоиммунном заболевании или гемопоэтических стволовых клеток (hematopoietic stem cells (HSC)) при трансплантации стволовых клеток, с целью получения терапевтического эффекта.

[0038] Триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, придают дополнительные терапевтические преимущества по отношению к традиционным моноклональным антителам и другим биспецифическим молекулам меньшего размера. Как правило, эффективность рекомбинантных белков в качестве лекарственных средств, в

значительной степени, зависит от внутренней фармакокинетики самого белка. Одним из таких преимуществ в настоящем изобретении является то, что триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, имеют удлинённый фармакокинетический период полувыведения, обусловленный наличием домена, обеспечивающего удлинение периода полувыведения, такого как домен, специфичный к HSA. В этом отношении, триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, имеют удлинённый период полувыведения из сыворотки крови, составляющий около двух, трех, около пяти, около семи, около 10, около 12 или около 14 дней в некоторых вариантах осуществления. Это контрастирует с другими связывающими белками, такими как молекулы BiTE или DART, которые имеют относительно более короткие периоды полувыведения. Так, например, в случае CD19 × CD3 биспецифической scFv-scFv слитой молекулы BiTE, требуется непрерывная доставка данного лекарственного средства путем внутривенной инфузии (IV) из-за его короткого периода полувыведения. Более длительные внутренние периоды полувыведения триспецифических антигенсвязывающих белков решают данную проблему, тем самым обеспечивая повышенный терапевтический потенциал, такой как фармацевтические препараты с низкой дозой, уменьшенное периодическое введение и/или новые фармацевтические композиции.

[0039] Триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, также имеют оптимальный размер для улучшения проникновения в ткани и распределения в ткани. Большие размеры ограничивают или предотвращают проникновение или распределение белка в ткани-мишени. Триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, избегают этого, имея небольшой размер, который позволяет улучшить проникновение и распределение в ткани. Соответственно, описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки в некоторых вариантах осуществления имеют размер от около 50 кД до около 80 кДа, от около 50 кД до около 75 кДа, от около 50 кД до около 70 кДа или от около 50 кД до около 65 кД. Таким образом, размер триспецифических антигенсвязывающих белков имеет преимущество по сравнению с IgG-антителами, размер которых составляет около 150 кД, и молекулами диател BiTE и DART, размер которых составляет около 55 кДа, но которые не имеют удлинённого периода полувыведения и, следовательно, быстро выводятся через почки.

[0040] В других вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, имеют оптимальный размер для улучшения проникновения и распределения в ткани. В данных вариантах осуществления

триспецифические антигенсвязывающие белки сконструированы настолько малыми, насколько это возможно, при сохранении специфичности по отношению к их мишеням. Соответственно, в данных вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, имеют размер от около 20 кД до около 40 кДа или от около 25 кД до около 35 кД, до около 40 кДа, около 45 кДа, до около 50 кДа, до около 55 кДа, до около 60 кДа, до около 65 кДа. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, имеют размер, составляющий около 50 кД, 49, кД, 48 кД, 47 кД, 46 кД, 45 кД, 44 кДа, 43 кДа, 42 кДа, 41 кДа, 40 кДа, около 39 кДа, около 38 кДа, около 37 кДа, около 36 кДа, около 35 кДа, около 34 кДа, около 33 кДа, около 32 кДа, около 31 кДа, около 30 кДа, около 29 кДа, около 28 кДа, около 27 кД, около 26 кД, около 25 кДа, около 24 кДа, около 23 кДа, около 22 кДа, около 21 кДа или около 20 кД. В качестве примера, подход, позволяющий получить малые размеры, заключается в использовании фрагментов однодоменного антитела (single domain antibody (sdAb)) для каждого из доменов. Например, конкретный триспецифический антигенсвязывающий белок имеет анти-CD3 sdAb, анти-HSA sdAb и sdAb для антигена-мишени. Это уменьшает размер иллюстративного триспецифического антигенсвязывающего белка до менее 40 кДа. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления домены триспецифических антигенсвязывающих белков представляют собой фрагменты однодоменного антитела (sdAb). В других вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки включают низкомолекулярные (small molecule entity (SME)) связывающие элементы для HSA и/или антигена-мишени. SME-связывающие элементы представляют собой небольшие молекулы, составляющие в среднем от 500 до 2000 Да, и присоединяются к триспецифическим антигенсвязывающим белкам с помощью известных способов, таких как опосредуемые сортазой лигирование или конъюгация. В данных случаях один из доменов триспецифического антигенсвязывающего белка представляет собой последовательность распознавания сортазы, например, LPETG (SEQ ID NO: 57). Чтобы присоединить SME-связывающий элемент к триспецифическому антигенсвязывающему белку с последовательностью распознавания сортазы, белок инкубируют с сортазой и SME-связывающим элементом, при этом сортаза присоединяет SME-связывающий элемент к последовательности распознавания. Известные SME-связывающие элементы включают MIP-1072 и MIP-1095, которые связываются со специфическим к простате мембранным антигеном (prostate-specific membrane antigen (PSMA)). В других вариантах осуществления домен, который связывается с антигеном-

мишенью триспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем изобретении, содержит пептид ноттин для связывания с антигеном-мишенью. Ноттины представляют собой стабилизированные дисульфидными связями пептиды с каркасной структурой цистинового узла и имеют средние размеры, составляющие около 3,5 кДа. Предполагается связывание ноттинов с определенными молекулами опухолей, такими как фибронектин и VEGF-рецептор. В других вариантах осуществления домен, который связывается с антигеном-мишенью триспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем изобретении, включает природный рецепторный лиганд, такой как В-клеточный активирующий фактор (B-cell activating factor (BAFF/BLyS)).

[0041] Еще одна особенность описанных в настоящем изобретении триспецифических антигенсвязывающих белков заключается в том, что они представляют собой однополипептидный дизайн с гибкой связью между доменами. Это позволяет легко производить и изготавливать триспецифические антигенсвязывающие белки, поскольку они могут быть кодированы молекулой одной кДНК, которая легко может быть включена в вектор. Кроме того, поскольку описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки являются мономерной единичной полипептидной цепью, нет ни проблем со спариванием цепей, ни необходимости димеризации. Предполагается, что описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки снижают тенденцию к агрегации в отличие от других опубликованных молекул, таких как биспецифический белок с доменами Fc-гамма-иммуноглобулина.

[0042] В описанных в настоящем изобретении триспецифических антигенсвязывающих белках домены связаны внутренними линкерами L1 и L2, причем L1 связывает первый и второй домен триспецифических антигенсвязывающих белков, а L2 связывает второй и третий домены триспецифических антигенсвязывающих белков. Линкеры L1 и L2 имеют оптимизированную длину и/или аминокислотный состав. В некоторых вариантах осуществления линкеры L1 и L2 имеют одинаковую длину и аминокислотный состав. В других вариантах осуществления L1 и L2 различны. В некоторых вариантах осуществления внутренние линкеры L1 и/или L2 являются «короткими», *то есть*, состоят из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков. Таким образом, в некоторых случаях внутренние линкеры состоят из около 12 или менее аминокислотных остатков. В случае 0 аминокислотных остатков, внутренний линкер представляет собой пептидную связь. В некоторых вариантах осуществления внутренние линкеры L1 и/или L2 являются «длинными», *то есть*, состоят из 15, 20 или 25 аминокислотных остатков. В некоторых

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

CD3-связывающий домен

[0043] Специфика ответа Т-клеток опосредуется распознаванием антигена (отображаемого в контексте крупного комплекса гистосовместимости, МНС) комплексом TCR. В составе TCR CD3 представляет собой белковый комплекс, который включает цепь CD3γ (гамма), цепь CD3δ (дельта) и две цепи CD3ε (эпсилон), которые присутствуют на поверхности клетки. CD3 ассоциируется с α (альфа) и β (бета) цепями TCR, а также с цепью CD3 ζ (дзета), которые все вместе образуют полный TCR. Кластеризация CD3 на Т-клетках, например, посредством иммобилизованных антител против CD3, приводит к активации Т-клеток, сходной с вовлечением Т-клеточного рецептора, но не зависящей от его специфичности в отношении определенного клона.

[0044] В одном аспекте описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки содержат домен, который специфически связывается с CD3. В одном аспекте описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки содержат домен, который специфически связывается с CD3 человека. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки включают домен, который специфически связывается с CD3γ. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки содержат домен, который специфически связывается с CD3δ. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки содержат домен, который специфически связывается с CD3ε.

[0045] В других вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении триспецифические антигенсвязывающие белки содержат домен, который специфически связывается с TCR. В некоторых случаях триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, содержат домен, который специфически связывает α -цепь TCR. В некоторых случаях триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, содержат домен, который специфически связывает β -цепь TCR.

[0046] В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен описанных в настоящем изобретении триспецифических антигенсвязывающих белков демонстрирует не только сильное сродство к CD3-связыванию с человеческим CD3, но также и отличную перекрестную реактивность с соответствующими белками CD3 яванского макака. В некоторых случаях CD3-связывающий домен триспецифических антигенсвязывающих белков является перекрестно-реактивным с CD3 яванского макака. В определенных случаях соотношения величин K_D для человеческого CD3 и для CD3 яванского макака (human:synomolgous K_D) составляют от 5 до 0,2.

[0047] В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка может представлять собой любой домен, который связывается с CD3, включая, но не ограничиваясь ими, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. В некоторых случаях является преимуществом, чтобы домен, связывающий CD3, был получен из того же вида, в котором, в конечном счете, будет использоваться триспецифический антигенсвязывающий белок. Например, для применения на людях может являться преимуществом, чтобы CD3-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка содержал человеческие или гуманизированные остатки из антигенсвязывающего домена антитела или фрагмента антитела.

[0048] Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения антигенсвязывающий домен содержит гуманизированное или человеческое антитело или фрагмент антитела или мышинное антитело или фрагмент мышинного антитела. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит одну или более (например, все три) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LC CDR1), определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (LC CDR2) и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (LC CDR3) гуманизированного или человеческого анти-CD3-связывающего домена, описанного в настоящем изобретении,

и/или одну или более (например, вся три) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (НС CDR1), определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (НС CDR2) и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (НС CDR3) гуманизированного или человеческого анти-CD3-связывающего домена, описанного в настоящем изобретении, например, гуманизированного или человеческого анти-CD3-связывающего домена, содержащего одну или более, например, все три, LC CDR и одну или более, например, все три, HC CDR.

[0049] В некоторых вариантах осуществления гуманизированный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит вариабельную область гуманизированной или человеческой легкой цепи, специфичную для CD3, причем вариабельная область легкой цепи, специфичная для CD3 человека, содержит последовательности CDR человеческой или нечеловеческой легкой цепи в каркасной области человеческой легкой цепи. В определенных случаях, каркасная область легкой цепи является каркасной областью легкой цепи λ (лямбда). В других случаях, каркасная область легкой цепи является каркасной областью легкой цепи κ (каппа).

[0050] В некоторых вариантах осуществления гуманизированный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит вариабельную область гуманизированной или человеческой тяжелой цепи, специфичную для CD3, причем вариабельная область тяжелой цепи, специфичная для CD3, содержит последовательности CDR человеческой или нечеловеческой тяжелой цепи в каркасной области человеческой тяжелой цепи.

[0051] В определенных случаях, определяющие комплементарность области тяжелой цепи и/или легкой цепи получены из известных анти-CD3-антител, таких как, например, муромонаб-CD3 (OKT3), отеликсизумаб (TRX4), теплизумаб (MGA031), визилизумаб (Nuvion), SP34, X35, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, OKT3D, M-T301, SMC2, F101.01, UCNT-1 и WT-31.

[0052] В одном варианте осуществления изобретения анти-CD3-связывающий домен представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий легкую цепь и тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью, представленной в данном описании. Как использовано в данном описании, «одноцепочечный вариабельный фрагмент» или «scFv» относится к фрагменту антитела, содержащему вариабельную область легкой цепи и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, причем вариабельные области легкой и тяжелой цепи смежно связаны через

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

[0053] В некоторых случаях, scFv, которые связываются с CD3, получены в соответствии с известными способами. Например, молекулы scFv могут быть получены при связывании областей VH и VL вместе при помощи гибких полипептидных линкеров. Молекулы scFv содержат scFv-линкер (например, линкер Ser-Gly) с оптимизированной длиной и/или аминокислотным составом. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, длина scFv-линкера такова, что VH- или VL-домен можно связать межмолекулярно с другим переменным доменом с образованием сайта связывания с CD3. В определенных вариантах осуществления такие scFv-линкеры являются "короткими", т.е. состоят из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков. Таким образом, в некоторых случаях scFv-

линкеры состоят из около 12 или менее аминокислотных остатков. В случае 0 аминокислотных остатков, scFv-линкер представляет собой пептидную связь. В некоторых вариантах осуществления данные scFv-линкеры состоят из от около 3 до около 15, например, 8, 9 или 10 смежных аминокислотных остатков. Что касается аминокислотного состава scFv-линкеров, выбраны пептиды, которые придают гибкость, не мешают переменным доменам а также позволяют осуществить межцепочный фолдинг с тем, чтобы объединить два переменных домена для образования функционального сайта связывания с CD3. Так, например, scFv-линкеры, включающие остатки глицина и серина, обычно обеспечивают устойчивость к протеазам. В некоторых вариантах осуществления линкеры в scFv содержат остатки глицина и серина. Аминокислотная последовательность scFv-линкеров может быть оптимизирована, например, с помощью способов фагового дисплея для улучшения связывания с CD3 и получения большего количества scFv. Примеры пептидных scFv-линкеров, подходящих для связывания переменного домена легкой цепи и переменного домена тяжелой цепи, в scFv включает, но не ограничиваются ими (GS)_n (SEQ ID NO: 49), (GGS)_n (SEQ ID NO: 50), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 51), (GGSG)_n (SEQ ID NO: 52), (GGSGG)_n (SEQ ID NO: 53) или (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 54), в котором n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10. В одном из вариантов осуществления линкер в scFv может быть (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 55) или (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 56). Изменение длины линкера может сохранить или повысить активность, что приводит к более высокой эффективности в исследованиях активности.

[0054] В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка имеет сродство к CD3 на клетках, экспрессирующих CD3, с K_D, равной 1000 нМ или менее, 500 нМ или менее, 200 нМ или менее, 100 нМ или менее, 80 нМ или менее, 50 нМ или менее, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее, 5 нМ или менее, 1 нМ или менее или 0,5 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка имеет сродство к CD3ε, γ или δ с K_D, равной 1000 нМ или менее, 500 нМ или менее, 200 нМ или менее, 100 нМ или менее, 80 нМ или менее, 50 нМ или менее, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее, 5 нМ или менее, 1 нМ или менее, или 0,5 нМ или менее. В других вариантах осуществления CD3-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка имеет низкое сродство к CD3, то есть, около 100 нМ или выше.

[0055] Сродство к связыванию с CD3 может быть определено, например, по способности самого триспецифического антигенсвязывающего белка или его CD3-связывающего домена

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

Домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения

[0056] Настоящее изобретение относится к доменам, которые удлиняют период полувыведения антигенсвязывающего домена. Предполагается, что такие домены включают, но не ограничиваются ими, HSA-связывающие домены, домены Fc, небольшие молекулы, а также другие домены, обеспечивающие удлинение периода полувыведения, известные в данной области техники.

[0057] Человеческий сывороточный альбумин (Human serum альбумин (HSA)) (молекулярная масса ~ 67 кДа) является наиболее распространенным белком в плазме крови, присутствует в количестве, составляющем около 50 мг/мл (600 мкМ), и имеет период полувыведения, составляющий около 20 дней в организме человека. HSA служит для поддержания pH плазмы крови, способствует поддержанию коллоидного артериального давления, выполняет функции в качестве носителя многих метаболитов и жирных кислот, а также служит в качестве основного белка для транспорта лекарственных средств в плазме.

[0058] Нековалентная ассоциация с альбумином удлиняет период полувыведения короткоживущих белков. Например, рекомбинантное сливание альбумин-связывающего домена с фрагментом Fab привело к *in vivo* 25- и 58-кратному клиренсу и удлинению периода полувыведения в 37 и 26 раз при внутривенном введении мышам и кроликам, соответственно, по сравнению с введением только фрагмента Fab. В другом примере, когда инсулин ацилируют жирными кислотами для улучшения связи с альбумином, длительный эффект наблюдался при подкожном введении у кроликов или свиней. Взяты вместе, данные

этих исследований демонстрируют связь между связыванием с альбумином и пролонгированным действием.

[0059] В одном аспекте настоящего изобретения триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, включают в себя домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, например домен, который специфически связывается с HSA. В некоторых вариантах осуществления HSA-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка может быть любым доменом, который связывается с HSA, включая, но не ограничиваясь ими, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. В некоторых вариантах осуществления HSA-связывающий домен представляет собой одноцепочечные переменные фрагменты (ScFv), однодоменное антитело, такое как переменный домен тяжелой цепи (VH), переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен (VHH) из полученного из верблюда однодоменного антитела, пептид, лиганд или низкомолекулярную группу, специфичные к HSA. В определенных вариантах осуществления HSA-связывающий домен является однодоменным антителом. В других вариантах осуществления HSA-связывающий домен представляет собой пептид. В других вариантах осуществления HSA-связывающий домен представляет собой низкомолекулярную группу. Предполагается, что HSA-связывающий домен триспецифического антигенсвязывающего белка имеет достаточно малый размер и не более 25 кДа, не более 20 кДа, не более 15 кДа или не более 10 кДа, в некоторых вариантах осуществления. В некоторых случаях HSA-связывающий домен имеет размер 5 кДа или менее, если он представляет собой пептид или низкомолекулярную группу.

[0060] Домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, триспецифического антигенсвязывающего белка обеспечивают изменение фармакодинамики и фармакокинетики самого триспецифического антигенсвязывающего белка. Как упомянуто выше, домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, продлевает период полувыведения. Домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, также изменяет фармакодинамические свойства, включая изменение распределения, проникновения и диффузии триспецифического антигенсвязывающего белка в ткани. В некоторых вариантах осуществления домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, обеспечивает улучшение направленной доставки в ткани (включая опухоли), распределения в ткани, проникновения в ткани, диффузии внутри ткани, а также повышенную эффективность, по сравнению с белком без домена, обеспечивающего удлинение периода полувыведения. В

одном варианте осуществления терапевтические способы эффективно и продуктивно используют пониженное количество триспецифического антигенсвязывающего белка, что приводит к снижению побочных эффектов, например, к снижению клеточной неопухоловой цитотоксичности.

[0061] Дополнительно, аффинность связывания домена, обеспечивающего удлинение периода полувыведения, может быть выбрана таким образом, чтобы соответствовать определенному периоду полувыведения в конкретном триспецифическом антигенсвязывающем белке. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, имеет высокую аффинность связывания. В других вариантах осуществления домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, имеет среднюю аффинность связывания. В других вариантах осуществления домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, имеет низкую или маргинальную аффинность связывания. Примеры аффинности связывания включают в себя K_D -концентрации при 10 нМ или менее (высокая), в диапазоне от 10 нМ до 100 нМ (средняя), и более 100 нМ (низкая). Как упомянуто выше, аффинности связывания с HSA определяются с помощью известных способов, например, поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Домен связывания антигена-мишени

[0062] В дополнение к описанным CD3 и домену, обеспечивающему удлинение периода полувыведения, триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, также содержат домен, который связывается с антигеном-мишенью. Антиген-мишень вовлечен в заболевание, расстройство или состояние и/или связан с заболеванием, расстройством или состоянием. В частности, антиген-мишень связан с пролиферативным заболеванием, опухолевым заболеванием, воспалительным заболеванием, иммунологическим расстройством, аутоиммунным заболеванием, инфекционным заболеванием, вирусным заболеванием, с аллергической реакцией, с паразитной реакцией, болезнью «трансплантат-против-хозяина» или болезнью «хозяин-против-трансплантата». В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген, экспрессированный на опухолевой клетке. В качестве альтернативы, в некоторых вариантах осуществления антиген-мишень связывается с патогеном, таким как вирус или бактерия.

[0063] В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой молекулу клеточной поверхности, такую как белок, липид или полисахарид. В некоторых вариантах

осуществления антиген-мишень находится на опухолевой клетке, зараженной вирусом клетки, бактериально инфицированной клетке, поврежденном эритроците, клетке артериальной бляшки или клетке фиброзной ткани.

[0064] Конструкция триспецифических антигенсвязывающих белков, описанных в настоящем изобретении, делает возможным, чтобы домен связывания антигена-мишени был универсальным в том смысле, что домен связывания антигена-мишени может представлять собой любой тип связывающего домена, включая, но не ограничиваясь этим, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. В некоторых вариантах осуществления домен связывания антигена-мишени представляет собой одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), однодоменное антитело, такие как переменный домен тяжелой цепи (VH), переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен (VHH) из полученного из верблюда однодоменного антитела. В других вариантах осуществления домен связывания антигена-мишени представляет собой не являющийся Ig связывающий домен, то есть, антитело-миметик, такое как антикарины, аффилины, молекулы аффитела, аффимеры, аффитины, альфатела, авимеры, белки с анкириновым повтором DARPin, финомеры, пептиды с доменом Кунитца и монотела. В других вариантах осуществления домен связывания антигена-мишени представляет собой лиганд или пептид, который связывается с или ассоциируется с антигеном-мишенью. В других вариантах осуществления домен связывания антигена-мишени представляет собой ноттин. В других вариантах осуществления домен связывания антигена-мишени представляет собой низкомолекулярную группу.

Модификации триспецифических белков

[0065] Триспецифические антигенсвязывающие белки, описанные в настоящем изобретении, включают производные или аналоги, в которых (i) аминокислота замещена остатком аминокислоты, который не является остатком аминокислоты, кодируемым генетическим кодом, (ii) зрелый полипептид слит с другим соединением, таким как полиэтиленгликоль, или (iii) дополнительные аминокислоты слиты с белком, такие как лидерная последовательность или секреторная последовательность или последовательность для очистки белка.

[0066] Типичные модификации включают, но не ограничиваются ими, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гема, ковалентное присоединение нуклеотида или нуклеотидного

производного, ковалентное присоединение липида или липидного производного, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных сшивок, образование цистина, образование пироглутамата, формилирование, гамма карбоксилирования, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредуемое транспортной РНК добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование и убиквитинирование.

[0067] Модификации выполнены в любом месте в триспецифических антигенсвязывающих белках, описанных в настоящем изобретении, включая пептидный остов, аминокислотные боковые цепи и аминокислотные или карбоксильные концы. Некоторые общие модификации пептидов, которые являются применимыми для модификации триспецифических антигенсвязывающих белков, включают гликозилирование, присоединение липида, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, гидроксилирование, блокирование аминокислотной или карбоксильной группы или обеих групп в полипептиде, посредством ковалентной модификации, и АДФ-рибозилирование.

Полинуклеотиды, кодирующие триспецифические антигенсвязывающие белки

[0068] Настоящее изобретение также относится, в некоторых вариантах осуществления, к полинуклеотидным молекулам, кодирующим триспецифический антигенсвязывающий белок, описанный в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения полинуклеотидные молекулы представлены в виде ДНК-конструкции. В других вариантах осуществления изобретения обеспечены полинуклеотидные молекулы в виде транскрипта информационной РНК.

[0069] Полинуклеотидные молекулы построены известными способами, например, путем объединения генов, кодирующих три связывающих домена, либо разделенных пептидными линкерами, либо, в других вариантах осуществления, непосредственно связанных пептидной связью, в единую генетическую конструкцию, функционально связанную с подходящим промотором и необязательно подходящим терминатором транскрипции, и их экспрессирования в бактериях или других подходящих экспрессионных системах, например, в клетках CHO. В вариантах осуществления изобретения, где домен связывания антигена-мишени представляет собой низкомолекулярную группу, полинуклеотиды содержат гены,

кодирующие домен связывания CD3 и домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения. В вариантах осуществления, где домен, обеспечивающий удлинение периода полувыведения, представляет собой низкомолекулярную группу, полинуклеотиды содержат гены, кодирующие домены, которые связываются с CD3 и антигеном-мишенью. В зависимости от используемых векторной системы и хозяина, может быть использовано любое число подходящих элементов транскрипции и трансляции, включая конститутивные и индуцируемые промоторы. Промотор выбирают таким образом, что он приводит в действие экспрессию полинуклеотида в соответствующей клетке-хозяине.

[0070] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид встраивают в вектор, предпочтительно экспрессирующий вектор, что представляет дополнительный вариант осуществления. Данный рекомбинантный вектор может быть сконструирован в соответствии с известными способами. Векторы, представляющие особый интерес, включают плазмиды, фагмиды, производные фагов, вирусы (например, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, лентивирусы и тому подобные) и космиды.

[0071] Различные экспрессионные системы вектор/хозяин могут применяться, чтобы служить в качестве носителя и использоваться для экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид описанного триспецифического антигенсвязывающего белка. Примерами экспрессирующих векторов для экспрессии в *E.coli* являются pSKK (Le Gall et al., J Immunol Methods. (2004) 285(1):111-27) или pcDNA5 (Invitrogen), для экспрессии в клетках млекопитающих.

[0072] Таким образом, триспецифические антигенсвязывающие белки, как описано в настоящем изобретении, в некоторых вариантах осуществления получают путем введения вектора, кодирующего белок, как описано выше, в клетку-хозяина и культивирования упомянутой клетки-хозяина в условиях, при которых белковые домены экспрессируются, могут быть выделены и, при необходимости, дополнительно очищены.

Фармацевтические композиции

[0073] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения обеспечены фармацевтические композиции, включающие триспецифический антигенсвязывающий белок, описанный в настоящем изобретении, вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид триспецифических антигенсвязывающих белков, или клетку-хозяина, трансформированную данным вектором, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. Термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает в себя,

но не ограничиваясь этим, любой носитель, который не мешает эффективности биологической активности ингредиентов и который не является токсичным для пациента, которому его вводят. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области и включают фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих средств, стерильные растворы и т.д. Такие носители могут быть приготовлены обычными способами и может вводиться субъекту в подходящей дозе. Предпочтительно композиции являются стерильными. Данные композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, эмульгаторы и диспергирующие средства. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено путем включения различных антибактериальных и противогрибковых средств.

[0074] В некоторых вариантах осуществления фармацевтической композиции триспецифический антигенсвязывающий белок, описанный в настоящем изобретении, инкапсулирован в наночастицах. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения наночастицы представляют собой фуллерены, жидкие кристаллы, липосомы, квантовые точки, суперпарамагнитные наночастицы, дендримеры или наностержни. В других вариантах осуществления фармацевтической композиции триспецифический антигенсвязывающий белок присоединен к липосомам. В некоторых случаях, триспецифический антигенсвязывающий белок конъюгирован с поверхностью липосом. В некоторых случаях, триспецифический антигенсвязывающий белок инкапсулирован внутри оболочки липосомы. В некоторых случаях, липосома представляет собой катионную липосому.

[0075] Триспецифический антигенсвязывающий белок, описанный в настоящем изобретении, рассматривается для применения в качестве лекарственного средства. Введение осуществляется различными способами, например, путем внутривенного, внутривенного, подкожного, внутримышечного, местного или внутрикожного введения. В некоторых вариантах осуществления способ введения зависит от вида терапии и вида соединения, содержащегося в фармацевтической композиции. Режим дозирования будет определяться лечащим врачом и другими клиническими факторами. Дозирование для любого пациента зависит от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, пол, конкретное соединение, подлежащее введению, время и путь введения, вид терапии, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства, вводимые одновременно. «Эффективная доза» относится к количествам активного ингредиента, которые являются достаточными, чтобы повлиять на ход и тяжесть заболевания, что

приводит к уменьшению или ремиссии такой патологии, и может быть определено с использованием известных способов.

Способы лечения

[0076] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения обеспечиваются способы и применения для стимуляции иммунной системы индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение триспецифического антигенсвязывающего белка, описанного в настоящем изобретении. В некоторых случаях, введение триспецифического антигенсвязывающего белка, описанного в настоящем изобретении, индуцирует и/или поддерживает цитотоксичность по отношению к клетке, экспрессирующей антиген-мишень. В некоторых случаях, клетки, экспрессирующие антиген-мишень, представляет собой раковую или опухолевую клетку, инфицированную вирусом клетку, бактериально инфицированную клетку, аутореактивную Т- или В-клетку, поврежденные эритроциты, артериальные бляшки или фиброзные ткани.

[0077] Настоящее изобретение также относится к способам и и применениям для лечения заболевания, расстройства или состояния, связанного с антигеном-мишенью, включающим введение индивидууму, нуждающемуся в этом, триспецифического антигенсвязывающего белка, описанного в настоящем изобретении. Заболевания, нарушения или состояния, связанные с антигеном-мишенью, включают, но не ограничиваются ими, вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантата, атеросклероз или фиброз. В других вариантах осуществления заболевание, расстройство или состояние, связанное с антигеном-мишенью, представляет собой пролиферативное заболевание, опухолевое заболевание, воспалительное заболевание, иммунологическое расстройство, аутоиммунное заболевание, инфекционное заболевание, вирусное заболевание, аллергическую реакцию, паразитарную реакцию, болезнь «трансплантат-против-хозяина» или болезнь «хозяин-против-трансплантата». В одном варианте осуществления заболевание, расстройство или состояние, связанное с антигеном-мишенью, представляет собой рак. В одном случае рак является гематологическим раком. В другом случае рак представляет собой рак с солидной опухолью.

[0078] Как использовано в данном описании, в некоторых вариантах осуществления «лечение» или «лечить» или «леченный» относится к терапевтическому лечению, задача которого состоит в том, чтобы замедлить (уменьшить) нежелательное физиологическое состояние, расстройство или заболевание, или для получения благоприятных или желаемых

клинических результатов. Для целей, описанных в настоящем изобретении, благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, облегчение симптомов; уменьшение степени состояния, расстройства или заболевания; стабилизацию (*т.е.*, отсутствие ухудшения) уровня состояния, расстройства или заболевания; задержку начала или замедление прогрессирования состояния, расстройства или заболевания; коренное улучшение состояния, расстройства или болезненного состояния; и ремиссию (частичную или полную), будь то обнаруживаемая или необнаруживаемая, или облегчение или улучшение состояния, расстройства или заболевания. Лечение включает в себя выявление клинически значимого ответа без чрезмерных уровней побочных эффектов. Лечение также включает в себя продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если не было получено лечение. В других вариантах осуществления «лечение» или «лечить» или «леченный» относится к профилактическим мерам, задача которых состоит в задержке начала или уменьшении тяжести нежелательного физиологического состояния, расстройства или заболевания, например, у человека, который предрасположен к заболеванию (например, человек, который несет в себе генетический маркер для заболевания, такого как рак молочной железы).

[0079] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем изобретении, триспецифический антигенсвязывающий белок вводят в сочетании со средством для лечения конкретного заболевания, расстройства или состояния. Средства включают, но не ограничиваются ими, терапии, включающие антитела, небольшие молекулы (например, химиотерапевтические препараты), гормоны (стероидные, пептидные и тому подобное), радиотерапии (гамма-лучи, рентгеновские лучи и/или направленная доставка радиоизотопов, микроволновые печи, УФ-излучение и тому подобное), генную терапию (например, препараты антисмысловой, антиретровирусной терапии и тому подобное) и другие иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки вводят в сочетании с антидиарейными средствами, антирвотными средствами, анальгетиками, опиоидами и/или нестероидными противовоспалительными средствами. В некоторых вариантах осуществления триспецифические антигенсвязывающие белки вводят до, во время или после операции.

Некоторые определения

[0080] Как используется в настоящем изобретении, «период полувыведения» используется в его обычном смысле, как это описано в *Goodman and Gillman's The Pharmaceutical Basis of*

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

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Построение иллюстративного триспецифического антигенсвязывающего белка к CD20

Генерирование scFv CD3-связывающего домена

[0081] Каноническая последовательность цепи CD3ε человека имеет номер доступа в базе данных UniProt P07766. Каноническая последовательность цепи CD3 человека имеет номер доступа в базе данных UniProt P09693. Каноническая последовательность цепи CD3δ человека имеет номер доступа в базе данных UniProt P043234. Антитела против CD3ε, CD3γ или CD3δ получают с помощью известных технологий, таких как созревание аффинности. Когда в качестве исходного материала используют мышинные анти-CD3 антитела, гуманизация мышинных анти-CD3 антител желательна для клинических условий, где мышь-специфические остатки могут индуцировать выработку человеческих антимышиных антител (human-anti-mouse antigen (НАМА)) у субъектов, которые получают в качестве лечения триспецифический антигенсвязывающий белок, описанный в настоящем изобретении. Гуманизация осуществляется путем прививки CDR-областей из мышинового анти-CD3

антитела на соответствующие акцепторные каркасные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека, необязательно включая другие модификации CDR и/или каркасных областей. Как предусмотрено в настоящем изобретении, нумерация остатков в антителах и фрагментах антител следует системе нумерации Kabat (Kabat E. A. et al, 1991; Chothia et al, 1987).

[0082] Человеческие или гуманизированные анти-CD3 антитела, следовательно, используются для создания scFv-последовательностей для CD3-связывающих доменов триспецифического антигенсвязывающего белка. Получают последовательности ДНК, кодирующие человеческие или гуманизированные домены VL и VH, и кодоны для конструкций являются необязательно оптимизированными для экспрессии в клетках из *Homo sapiens*. Порядок, в котором домены VL и VH появляются в scFv, варьируется (т.е. ориентация VL-VH или VH-VL), и три копии "G4S" (SEQ ID NO: 58) или "G4S" (SEQ ID NO: 58) субъединицы (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 56) соединяют переменные домены для создания домена scFv. Плазмидные конструкции, содержащие анти-CD3 scFv, могут иметь дополнительный Flag, His или другие аффинные метки, и их вводят при помощи электропорации в HEK293 или другие подходящие клеточные линии человека или млекопитающих и очищают. Проверочные анализы включают анализ связывания с помощью FACS, кинетический анализ с использованием Proteon и окрашивание CD3-экспрессирующих клеток.

Генерирование scFv CD20-связывающего домена

[0083] CD20 является одним из белков клеточной поверхности, присутствующих на В-лимфоцитах. Антиген CD20 обнаруживается в нормальных и злокачественных пре-В и зрелых В-лимфоцитах, включая таковые в более чем 90% В-клеточных неходжкинских лимфом (non-Hodgkin's lymphomas (NHL)). Антиген отсутствует в гематопозитических стволовых клетках, активированных В-лимфоцитах (плазматические клетки) и в нормальной ткани. Как таковые, были описаны несколько антител, в основном, мышиного происхождения: 1F5, 2B8/C2B8, 2H7 и 1H4.

[0084] scFv-домен связывания CD20 генерируется аналогично описанному выше способу генерации scFv-домена связывания CD3.

Клонирование ДНК-конструкций экспрессии, кодирующих триспецифический антигенсвязывающий белок

[0085] Анти-CD3 scFv-домены, которые используются для построения триспецифического антигенсвязывающего белка в сочетании с анти-CD20 scFv-доменом и HSA-связывающим доменом (например, пептид или домен VH), представляют собой домены, организованные, как показано на **фигуре 1**. Для экспрессии триспецифического антигенсвязывающего белка в клетках CHO кодирующие последовательности всех белковых доменов клонируют в систему экспрессирующего вектора в клетках млекопитающих. Вкратце, генные последовательности, кодирующие CD3-связывающий домен, HSA-связывающий домен и CD20-связывающий домен, наряду с пептидными с помощью линкеров L1 и L2, отдельно синтезируют и субклонируют. Полученные конструкции затем лигируют вместе в порядке «CD20-связывающий домен - L1 - CD3-связывающий домен - L2 - HSA-связывающий домен», с получением окончательной конструкции. Все экспрессионные конструкции разработаны таким образом, что они содержат кодирующие последовательности для N-концевого сигнального пептида и С-концевой гексагистидиновой (6xHis) метки (SEQ ID NO: 59), чтобы облегчить секрецию и очистку белка, соответственно.

Экспрессия триспецифических антигенсвязывающих белков в стабильно трансфицированных клетках CHO

[0086] Используют систему экспрессии в клетках CHO (FLP-In®, Life Technologies), производном клеток CHO-K1 яичника китайского хомячка (ATCC, CCL-61) (Kao and Puck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1968;60(4):1275-81). Прикрепленные клетки пересевают в соответствии со стандартными протоколами клеточных культур, предоставляемыми Life Technologies.

[0087] Для адаптации к росту в суспензии, клетки отделяют от флаконов для выращивания культуры ткани и помещают в среду без сыворотки. Адаптированные к росту в суспензии клетки подвергают криоконсервации в среде с 10% DMSO.

[0088] Рекомбинантные CHO-клеточные линии, стабильно экспрессирующие секретируемые триспецифические антигенсвязывающие белки, генерируют путем трансфекции адаптированных к росту в суспензии клеток. При отборе с антибиотиком гигромицином В, плотности жизнеспособных клеток измеряют два раза в неделю, и клетки центрифугируют и ресуспендируют в свежей среде селекции при максимальной плотности $0,1 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. Клеточные популяции, стабильно экспрессирующие триспецифические антигенсвязывающие белки, извлекают через 2-3 недели селекции, при этом клетки переносят в стандартную культуральную среду во встряхивающихся колбах.

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

[0089] Триспецифические антигенсвязывающие белки получают в 10-дневных подпитываемых культурах стабильно трансфицированных CHO-клеточных линий путем секреции в надосадочную жидкость клеточной культуры. Надосадочные жидкости клеточных культур собирают через 10 дней при жизнеспособности культур типично $> 75\%$. Образцы отбирают из производственных культур каждый день и оценивают клеточную плотность и жизнеспособность. В день сбора клеток надосадочные жидкости клеточных культур очищают центрифугированием и вакуумной фильтрацией перед дальнейшим использованием.

[0090] Титры экспрессии белков и целостность продукта в надосадочных жидкостях клеточных культур анализируют с помощью SDS-PAGE.

Очистка триспецифических антигенсвязывающих белков

[0091] Триспецифические антигенсвязывающие белки очищают от надосадочной жидкости культуры клеток CHO согласно двухступенчатой процедуре. Конструкции подвергают аффинной хроматографии на первой стадии с последующей препаративной хроматографией с исключением по размеру (size exclusion chromatography (SEC)) на Superdex 200 на второй стадии. В образцах меняют буфер и их концентрируют при помощи ультрафильтрации до типичной концентрации > 1 мг/мл. Чистоту и гомогенность (обычно $> 90\%$) конечных образцов оценивают с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, а затем с помощью иммуоблоттинга с использованием анти-HSA или антиидиотипического антитела, а также с помощью аналитической SEC, соответственно. Очищенные белки хранят в аликвотах при -80°C до использования.

Пример 2: Определение аффинности к антигену с помощью проточной цитометрии

[0092] Триспецифические антигенсвязывающие белки из примера 1 проверяют на их аффинности связывания с человеческими CD3^{+} и CD20^{+} клетками и CD3^{+} и CD20^{+} клетками яванского макака.

[0093] CD3^{+} и CD20^{+} клетки инкубируют с 100 мкл серийных разведений триспецифических антигенсвязывающих белков из примера 1. После трехкратной промывки в буфере FACS клетки инкубируют с 0,1 мл 10 мкг/мл мышинового моноклонального антиидиотипического антитела в том же буфере в течение 45 мин на льду. После второго промывочного цикла

клетки инкубируют с 0,1 мл 15 мкг/мл FITC-конъюгированных козьих анти-мышинных IgG антител в тех же условиях, что и раньше. В качестве контроля, клетки инкубируют с анти-His IgG с последующей инкубацией с FITC-конъюгированными козьими анти-мышинными IgG антителами без триспецифических антигенсвязывающих белков. Затем клетки снова промывают и ресуспендируют в 0,2 мл буфера FACS, содержащего 2 мкг/мл пропидий йодида (PI), чтобы исключить мертвые клетки. Флуоресценцию 1×10^4 живых клеток измеряют, используя проточный цитометр Beckman-Coulter FC500 MPL с использованием программного обеспечения MXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Германия) или проточный цитометр Millipore Guava EasyCyte с использованием программного обеспечения Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Германия). Средние интенсивности флуоресценции образцов клеток вычисляют с использованием программного обеспечения CXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Германия) или программного обеспечения Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Германия). После вычитания значений интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных только вторичными и третичными реагентами, значения затем используют для расчета значений K_D с уравнением для моносайтового связывания (гиперболы), используя программное обеспечение для построения нелинейных кривых GraphPad Prism (версия 6.00 для Windows, GraphPad Software, La Jolla, California США).

[0094] Аффинность связывания с CD3 и перекрестную реактивность оценивают с помощью титрования и экспериментов по проточной цитометрии на CD3⁺ клетках Jurkat и CD3⁺ HSC-F клеточной линии (JCRB, cat.:JCRB1164) яванского макака. Связывание с CD20 и перекрестную реактивность оценивают на линиях опухолевых клеток человека, экспрессирующих CD20⁺. K_D -отношение перекрестной реактивности вычисляют с использованием значений K_D , определенных на линиях клеток CHO, экспрессирующих либо рекомбинантные человеческие антигены, либо рекомбинантные антигены яванского макака.

Пример 3: Анализ цитотоксичности

[0095] Триспецифический антигенсвязывающий белок в примере 1 оценивают *in vitro* на его посредничество в зависимой от Т-клеток цитотоксичности по отношению к клеткам-мишеням, экспрессирующим CD20⁺.

[0096] Флуоресцентно-меченые CD20⁺ клетки REC-1 (линия мантийноклеточной лимфомы, ATCC CRL-3004) инкубируют с выделенными РВМС случайных доноров или с Т-клетками CB15 (стандартизованная линия Т-клеток) в качестве эффекторных клеток в присутствии триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1. После инкубации в течение 4

ч при 37°C в инкубаторе с увлажнением, высвобождение флуоресцентного красителя из клеток-мишеней в надосадочную жидкость определяют в спектрофлуориметре. Клетки-мишени, инкубированные без триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1 и клетки-мишени, полностью лизированные при добавлении сапонины в конце инкубации, служат в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно.

[0097] На основании измеренных оставшихся живых клеток-мишеней, рассчитывают процент специфического лизиса клеток в соответствии со следующей формулой: $[1 - (\text{число живых мишеней}_{\text{(образец)}} / \text{количество живых мишеней}_{\text{(самопроизвольный)}})] \times 100\%$. Сигмовидные кривые зависимости ответа от дозы и значения EC_{50} вычисляют с помощью нелинейной регрессии/аппроксимации 4-параметрической логистической модели с использованием программного обеспечения GraphPad. Значения лизиса, полученные для данной концентрации антитела, используют для расчета сигмоидальных кривых дозы-ответа с помощью анализа аппроксимации 4-параметрической логистической модели с использованием программного обеспечения Prism.

Пример 4: Фармакокинетика триспецифических антигенсвязывающих белков

[0098] Триспецифический антигенсвязывающий белок из примера 1 оценивают на период полувыведения в исследованиях на животных.

[0099] Триспецифический антигенсвязывающий белок вводят яванским макакам в виде 0,5 мг/кг болюсной инъекции внутримышечно. Еще одна группа яванских макак получает белок, сопоставимый по размеру с доменами связывания CD3 и CD20, но без HSA-связывания. Третья и четвертая группа получают белок с CD3- и HSA-связывающими доменами и белок с CD20- и HSA-связывающими доменами, соответственно, причем оба сравнимы по размеру с триспецифическим антигенсвязывающим белком. Каждая испытываемая группа состоит из 5 обезьян. Образцы сыворотки крови отбирают в упомянутые моменты времени, серийно разводят, и концентрацию белков определяют с помощью анализа ELISA на связывание с CD3 и/или CD20.

[00100] Фармакокинетический анализ выполняют с использованием плазменных концентраций испытываемого образца. Средние по группе плазменные данные для каждого испытываемого образца соответствуют мультиэкспоненциальному профилю на графике в зависимости от времени после введения дозы. Данные аппроксимируют при помощи стандартной двухкомпарментной модели с болюсным введением и константами скорости реакции первого порядка для фаз распределения и выведения. Общее уравнение для лучшей

аппроксимации данных для внутривенного введения имеет вид: $c(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$, где $c(t)$ представляет собой концентрацию в плазме крови в момент времени t , A и B являются отрезками, отсекаемыми по оси ординат, а α и β представляют собой кажущиеся константы скорости первого порядка для фаз распределения и выведения, соответственно. α -фаза является начальной фазой клиренса и отражает распределение белка во всей внеклеточной жидкости животного, в то время как вторая часть или часть β -фазы кривой спада представляет истинный плазменный клиренс. Способы аппроксимации таких уравнений хорошо известны в данной области техники. Так, например, $A = D/V(\alpha - k_{21})/(\alpha - \beta)$, $B = D/V(\beta - k_{21})/(\alpha - \beta)$, и α и β (для $\alpha > \beta$) являются корнями квадратного уравнения: $r^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10})r + k_{21}k_{10} = 0$ с использованием расчетных параметров V = объем распределения, k_{10} = скорость выведения, k_{12} = скорость переноса из компартмента 1 в компартмент 2 и k_{21} = скорость переноса из компартмента 2 в компартмент 1, и D = введенная доза.

[00101] Анализ данных: Графики концентрации в зависимости от временных профилей построены с использованием Kaleidagraph (KaleidaGraph™ V. 3.09 Copyright 1986-1997. Synergy Software. Reading, Pa.). Сообщенные значения, меньшие, чем подлежащие сообщению (less than reportable (LTR)), не включены в анализ PK и не представлены в графическом виде. Фармакокинетические параметры определяют компартментным анализом с помощью программного обеспечения WinNonlin (WinNonlin® Professional V. 3.1 WinNonlin™ Copyright 1998-1999 Pharsight Corporation. Mountain View, штат Калифорния). Фармакокинетические параметры вычисляют, как описано в Ritschel W A and Kearns G L, 1999, IN: *Handbook Of Basic Pharmacokinetics Including Clinical Applications*, 5th edition, American Pharmaceutical Assoc., Washington, D.C.

[00102] Предполагается, что триспецифический антигенсвязывающий белок из примера 1 имеет улучшенные фармакокинетические параметры, такие как увеличение периода полувыведения, по сравнению с белками, лишенными HSA-связывающего домена.

Пример 5: Модель ксенотрансплантатной опухоли

[00103] Триспецифический антигенсвязывающий белок из примера 1 оценивают в модели ксенотрансплантата.

[00104] Самок иммунодефицитных NOD/SCID мышей сублетально облучают (2 Gy) и подкожно инокулируют 4×10^6 клеток Ramos RA1 в правый бок. Когда опухоли достигают размера от 100 до 200 мм³, животных распределяют на 3 группы обработки. Группам 2 и 3 (8

животных в каждой) внутрибрюшинно вводят $1,5 \times 10^7$ активированных Т-клеток человека. Через три дня животных из группы 3 затем обрабатывают в общей сложности 9 внутривенными дозами в 50 мкг триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1 (qdx9d). Группы 1 и 2 обрабатывают только носителем. Массу тела и объем опухоли определяют в течение 30 дней.

[00105] Ожидается, что у животных, обработанных триспецифическим антигенсвязывающим белком из примера 1, имеется статистически значимое снижение роста опухоли по сравнению с соответствующей обработанной носителем контрольной группой.

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

[00106] Данное исследование является клиническим исследованием фазы I/II с целью изучения триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1 в качестве лечения для пациентов с В-клеточной лимфомой.

[00107] Результаты исследования:

[00108] *Основной:* Максимальная переносимая доза триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1

[00109] *Вторичный:* Определить, является ли *in vitro* ответ триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1 связанным с клиническим ответом

[00110] Фаза I

[00111] Максимально переносимая доза (maximum tolerated dose (MTD)) будет определяться в разделе фазы I исследования.

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

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

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

[00112] Фаза II

2.1 В следующем разделе фазы II участники будут получать MTD с целью определения, будет ли лечение с терапией триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1 давать по меньшей мере 20%-ный уровень ответа.

Основной результат для фазы II --- Определить, приводит ли терапия триспецифического антигенсвязывающего белка из примера 1 к достижению клинического ответа по меньшей мере у 20% пациентов (взрывной ответ, незначительный ответ, частичный ответ или полный ответ)

[00113] Право на участие в исследовании:

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

Любая стадия заболевания.

Лечение с помощью R-CHOP или R-CHOP в виде схем лечения (+/- трансплантат).

Возраст ≥ 18 лет

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

Средняя продолжительность жизни ≥ 6 недель

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

[00114] Получение белка

[00115] Последовательности триспецифических молекул были клонированы в вектор pCDNA 3.4 (Invitrogen) экспрессии в млекопитающих, с предшествующей лидерной последовательностью и последующей последовательностью 6x Histidine Tag (SEQ ID NO: 59), Клетки Expi293F (Life Technologies A14527) поддерживали в суспензии в колбах для оптимального роста (Thomson) в количестве от 0,2 до 8 x 1E6 клеток/мл в среде для роста Expi293. Очищенную плазмидную ДНК трансфицировали в клетки Expi293 в соответствии с протоколами Expi293 Expression System Kit (Life Technologies, A14635) и выдерживали в течение от 4 до 6 дней после трансфекции. Кондиционированные среды частично очищали аффинной и обессоливающей хроматографией. Триспецифические белки впоследствии

дополнительно очищали путем ионного обмена, или, альтернативно, концентрировали в устройствах для центробежной фильтрации Amicon Ultra (EMD Millipore), наносили на среду Superdex 200 (GE Healthcare) для хроматографии исключения по размеру и элюировали в нейтральном буфере, содержащем наполнители. Собранные фракции и окончательную чистоту оценивали с помощью SDS-PAGE и аналитической SEC.

[00116] *Измерения аффинности*

[00117] Аффинности всех молекул связывающих доменов были измерены с помощью интерферометрии бислоев с использованием прибора Octet.

[00118] Аффинности к PSMA измеряли, загружая человеческий белок PSMA-Fc (100 нМ) на анти-человеческие биосенсоры IgG-Fc в течение 120 секунд, с последующим 60-секундным исходным уровнем, после чего связывания измеряли, инкубируя наконечник датчика в серии разведений триспецифических молекул в течение 180 секунд, с последующей диссоциацией в течение 50 секунд. Аффинности к EGFR и CD3 измеряли путем загрузки человеческого белка EGFR-Fc или человеческого белка CD3-Flag-Fc, соответственно, (100 нМ) на анти-человеческие биосенсоры IgG-Fc в течение 120 секунд, с последующим 60-секундным исходным уровнем, после чего связывания измеряли, инкубируя наконечник датчика в серии разведений триспецифических молекул в течение 180 секунд, с последующей диссоциацией в течение 300 секунд. Сродство к сывороточному альбумину человека (HSA) измеряли с помощью загрузки биотинилированного альбумина на стрептавидиновые биосенсоры, затем следуя тем же кинетическим параметрам, что и для измерений аффинности к CD3. Все стадии выполняли при 30° С в 0,25% казеина в фосфатно-буферном растворе.

[00119] *Анализ цитотоксичности*

[00120] Анализ зависимой от Т-клеток клеточной цитотоксичности (T-cell dependent cellular cytotoxicity (TDCC)) в клетках человека используется для измерения способности активаторов, привлекающих Т-клетки, включая триспецифические молекулы, направлять Т-клетки с тем, чтобы уничтожить опухолевые клетки (Nazarian et al. 2015. J Biomol Screen. 20:519-27). В данном анализе Т-клетки и клетки-мишени линии раковых клеток смешивали вместе при соотношении 10:1 в 384-луночной планшете и добавляли различные количества привлекающего Т-клетки активатора. Через 48 часов Т-клетки смывали, оставляя прикрепленные к пластине клетки-мишени, которые не были убиты Т-клетками. Для количественной оценки оставшихся жизнеспособных клеток использовали анализ CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega).

[00121] *Анализы на цитокины*

[00122] AlphaLISA анализы (Perkin Elmer) для TNF-альфа и гамма-интерферона используются для получения доказательств того, что Т-клетки активируются триспецифическими молекулами в присутствии клеток-мишеней. Для данного анализа первичные Т-клетки человека и опухолевые клетки человека инкубируют в присутствии тестируемых молекул, как описано в анализах на цитотоксичность. Через 48 ч инкубации 2-микролитровые аликвоты надосадочных жидкостей анализа анализируют в соответствии с инструкциями изготовителя

[00123] *Диффузионные тесты*

[00124] Слой матригеля (Matrigel) (75 мкл) добавляли к 24-луночным вкладышам Transwell (0,4 мкм), после чего к верхней и нижней камерам добавляли PBS (100 и 1025 мкл, соответственно) и уравнивали в течение ночи при 4° С. 100 пмоль IgG или Fab (козий анти-человеческий Fc, Jackson ImmunoResearch) или триспецифических молекул добавляли в верхнюю камеру, и диффузию каждой молекулы в нижнюю камеру определяли количественно во времени с помощью анализа ELISA для каждой конкретной молекулы. IgG и Fab захватывали ослиным антикозьим IgG (Jackson ImmunoResearch), который был иммобилизован на ELISA-планшетах, и детектировали с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена ослиного антикозьего IgG (Jackson ImmunoResearch) и по развитию TMB. Триспецифические молекулы захватывали человеческим сывороточным альбумином (Athens Research & Technology), который был иммобилизован на ELISA-планшетах, и детектировали с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена анти-His-антитела (GenScript) и по развитию TMB.

[00125] Относительную диффузию в каждой временной точке рассчитывали как: (концентрация в нижней камере в момент времени = t)/(концентрация в верхней камере в момент времени = t).

[00126] Статистически значимые различия в диффузии между молекулой IgG и Fab или триспецифическими молекулами были идентифицированы с использованием непарного t-теста.

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

[00127] Аффинности трех связывающих доменов в молекуле, направленной против EGFR, измеряли интерферометрией бислоев с использованием прибора Octet, и соответствующие данные обобщены в таблице 1.

[00128] Триспецифические молекулы, в которых EGFR-связывающий домен расположен на N-конце молекулы, показали значительно более высокие аффинности к EGFR, по сравнению с триспецифическими молекулами, которые содержали EGFR-связывающий домен в центре или в С-концевом положении. Аналогичным образом, триспецифические молекулы, содержащие альбумин-связывающий домен на N-конце, также демонстрировали более высокую аффинность к HSA, чем те, которые содержат альбумин в середине или в С-концевых положениях. В противоположность этому, все триспецифические молекулы показали очень сходные аффинности к CD3 человека, независимо от положения связывающего домена в пределах триспецифической молекулы.

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

[00129] Аффинности трех связывающих доменов в молекулах, направленных против PSMA, были измерены интерферометрией бислоев с использованием прибора Octet, и соответствующие данные обобщены в таблице 2.

[00130] Триспецифические молекулы, содержащие альбумин-связывающий домен на N-конце, имели более высокие аффинности к HSA, чем те, которые содержат альбумин-связывающий домен в середине или в С-концевых положениях. В отличие от этого, положение CD3-связывающего домена не влияет на аффинность к его мишени. Точно так же, положение PSMA-связывающего домена имело небольшое влияние на аффинность, причем все триспецифические молекулы имеют аффинности к PSMA человека, отличающиеся друг от друга не более чем в 3 раза.

Пример 10: Анализы цитотоксичности с триспецифическими молекулами

[00131] Триспецифические молекулы испытывали в анализах зависимой от Т-клеток клеточной цитотоксичности (TDCC) в отношении их способности индуцировать первичные человеческие Т-клетки с тем, чтобы уничтожить опухолевые клетки человека зависимым от опухоли-мишени образом.

[00132] Триспецифические молекулы, содержащие полученные из однодоменного антитела нацеленные на опухоль домены против EGFR или PSMA, могут вызвать мощное

уничтожение клеток механизмом, сравнимым с механизмом действия привлекающих Т-клетки биспецифических активаторов (bispecific T cell engagers (BiTE)), см. **фигуру 5**.

[00133] Шесть направленных против EGFR триспецифических молекул с однодоменным анти-EGFR антителом (см. **фигуру 4**) и триспецифическая молекула, содержащая анти-EGFR scFv, были протестированы в количественных анализах TDCC с использованием линии NCI-1563 клеток аденокарциномы легких человека. Для сравнения EGFR BiTE был включен в каждом анализе (Lutterbuese et al. 2007. PNAS 107: 12605-12610.). Было продемонстрировано, что все 7 конфигураций направленных против EGFR триспецифических молекул эффективно убивают клетки-мишени (см. репрезентативные данные в **таблицах 3 и 4**, и **фигуры 6 и 8**) с активностью, аналогичной с таковой EGFR BiTE. Анализ TDCC также была проведен с добавлением 15 мг/мл человеческого сывороточного альбумина, чтобы оценить влияние связывания альбумина на TDCC-активность триспецифических молекул. Как и ожидалось, потенциальная эффективность EGFR BiTE, в котором отсутствует альбумин-связывающий домен, была сходной в отсутствие или в присутствии альбумина. Потенциальные эффективности триспецифических молекул уменьшались в присутствии альбумина, но величина снижения зависела от конфигурации молекулы. Конфигурации, потенциальные эффективности которых уменьшались, по меньшей мере, в присутствии альбумина, представляли собой EGFR-scFv:C:A и E:A:C (анти-EGFR-scFv:анти-CD3E-scFv:анти-ALB-sdAb и анти-EGFR-sdAb:анти-ALB-sdAb:анти-CD3E-scFv).

[00134] Для того, чтобы продемонстрировать, что результаты, полученные для направленных против EGFR триспецифических молекул, могут применяться ко всем триспецифическим молекулам, пять направленных против PSMA триспецифических молекул с однодоменным анти-PSMA антителом и триспецифическая молекула, содержащая анти-PSMA scFv, были протестированы в анализе TDCC с использованием эпителиальной клеточной линии 22Rv1 карциномы предстательной железы человека. Для сравнения, PSMA BiTE (pasotuxizumab) был включен в анализ. Типичные результаты можно найти в **таблице 5** и на **фигуре 7**. Большинство направленных против PSMA триспецифических молекул обладали сходной активностью к PSMA BiTE в анализе TDCC, за исключением триспецифической молекулы с конфигурацией A:C:P (анти-PSMA-sdAb:анти-CD3E-scFv:анти-ALB-sdAb), данные триспецифические молекулы были также протестированы в анализе TDCC, содержащем 15 мг/мл человеческого сывороточного альбумина, чтобы оценить влияние связывания альбумина на TDCC-активность триспецифических молекул. Как и ожидалось, потенциальная активность PSMA BiTE, в котором отсутствует альбумин-связывающий

домен, была сходной в отсутствие или в присутствии альбумина. Потенциальные эффективности триспецифических молекул уменьшались в присутствии альбумина, но величина снижения зависила от конфигурации молекулы. Конфигурации, потенциальные эффективности которых уменьшались, по меньшей мере, в присутствии альбумина, представляли собой Р:А:С (анти-PSMA-sdAb:анти-ALB-sdAb:анти-CD3E-scFv).

[00135] Триспецифические молекулы, описанные в настоящем изобретении, могут использовать различные модальности для направленной доставки в опухолевые клетки-мишени. На **фигурах 5, 6 и 7** показаны триспецифические молекулы с sdAb-производными доменами, направленными против опухоли, и **фигуры 7 и 8** показывают, что триспецифические молекулы с scFv-производным опухоль-связывающим доменом могут работать одинаково хорошо. На **фигуре 9** продемонстрировано, что домен, направленный против опухоли, не ограничивается конструкциями, полученными из антител, такими как sdAbs и scFvs, но что домены не из иммуноглобулинов могут также работать. В данном примере финомер с молекулярной массой в 7 кДа, специфичный к Her2, использовали для перенаправления покоящихся Т-клеток человека, чтобы уничтожить клетки рака яичников человека.

Пример 11: Определение цитокиновой продукции с триспецифическими молекулами

[00136] Для того, чтобы показать, что триспецифические молекулы, протестированные в настоящем изобретении, действительно активировали Т-клетки и перенаправляли данные Т-клетки, чтобы уничтожить клетки опухоли, было проведено определение продукции цитокинов TNF α и IFN γ , параллельно с определением активности Т-клеток по уничтожению клеток, так как Т-клетки продуцируют данные цитокины, когда они активируются.

[00137] Как показано на **фигурах 10 и 11**, четыре протестированные триспецифические молекулы, направленные против EGFR и PSMA, стимулировали продукцию TNF α и интерферона γ ; с потенциальной активностью, аналогичной их активности по уничтожению клеток. Полученные данные согласуются с утверждением, что триспецифические молекулы активируют Т-клетки, участвуя в привлечении клеток-мишеней.

Пример 12: Диффузионные тесты

[00138] Размер триспецифических молекул, анализируемых в настоящем изобретении, меньше, чем у обычных молекул IgG, и, следовательно, ожидается, что они будут диффундировать быстрее и проникать в ткань лучше, чем моноклональные антитела. Для

того чтобы оценить данное свойство, был разработан анализ диффузии/миграции через матриксель. Для этой цели планшеты Transwell для анализа покрывали матрикселем, желатинообразной белковой смесью, напоминающей сложную внеклеточную среду, найденную во многих тканях. Триспецифические молекулы, полноразмерные IgG или Fab-фрагменты добавляли в верхнюю камеру. Через восемь и 12 часов оценивали нижнюю камеру в отношении количества макромолекул, способных мигрировать через матрицу. Как показано на **фигуре 12**, триспецифические молекулы мигрируют в обеих временных точках со скоростью гораздо большей, чем полноразмерные молекулы IgG.

Пример 13: Определение анти-CD3ε scFv вариантов с различной аффинностью к человеческим CD3ε

Характеристика исходного анти-CD3ε фага

[00139] Исходный анти-CD3ε показывал хорошее связывание с биотин-CD3-ε и низкое связывание с биотин-HSA (**фигура 13**).

Анти-CD3ε scFv фаговые библиотеки

[00140] Библиотека с одиночными замещениями была обеспечена для доменов CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи. Остатки изменяли по одному посредством мутагенеза.

Выбор клонов и определение аффинности связывания

[00141] Библиотеки с одиночными замещениями связывали с биотинилированным hu-CD3ε, промывали, элюировали и подсчитывали. Биотинилированные cynoCD3 (яванского макака) использовали в качестве мишени для отбора первого раунда и промывали в течение 4 часов после комбинаторного связывания фагов из двух независимых библиотек (выбор ~ 2х). Биотинилированные hu-CD3 (человека) использовали в качестве мишени для отбора второго раунда и промывали в течение 3 часов после связывания обеих библиотек (выбор <2х). PCR-вкладыши из второго раунда отбора субклонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.4 His6. Отбирали 180 клонов, и ДНК очищали, секвенировали и трансфицировали в Expi293. Панель из шестнадцати клонов с диапазоном аффинностей для человеческого CD3ε была выбрана для более точного определения K_D (**Таблица 6**).

[00142] В таблице 1 приведены аффинности триспецифических молекул, содержащих однодоменное антитело, направленное против EGFR, для трех антигенов-мишеней.

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

Аффинность

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

[00143] В таблице 2 приведены аффинности триспецифических молекул, содержащих однодоменное антитело, направленное против PSMA, для трех антигенов-мишеней. Расшифровка сокращений в таблице: P = анти-PSMA однодоменное антитело, C = анти-CD3E scFv, A = однодоменное антитело против альбумина.

Аффинность

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

[00144] В таблице 3 приведены потенциальные активности триспецифических молекул, содержащих однодоменное антитело, направленное против EGFR, в анализах уничтожения клеток. Значения EC50 представлены в виде молярных концентраций. Расшифровка сокращений в таблице: E = анти-EGFR однодоменное антитело, C = анти-CD3E scFv, A = однодоменное антитело против альбумина.

Белок	EC50 (M)	EC50 с HSA (M)	Кратность изменения
E:C:A	1,30E-12	4,5E-11	35,4
E:A:C	1,40E-12	1,70E-11	12,3
C:E:A	5,60E-12	1,10E-10	20,4
C:A:E	5,50E-12	2,00E-10	36,2
A:E:C	6,90E-12	5,60E-10	81,5
A:C:E	6,10E-12	2,80E-10	45,5
EGFR BiTE	1,50E-12	2,30E-12	1,5

[00145] В таблице 4 приведены потенциальные активности триспецифических молекул, содержащих scFv-антитело, направленное против EGFR, и молекулу BiTE, в анализах уничтожения клеток. Значения EC50 представлены в виде молярных концентраций. Расшифровка сокращений в таблице: E = анти-EGFR однодоменное антитело, C = анти-CD3E scFv, A = однодоменное антитело против альбумина.

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

[00146] В таблице 5 приведены потенциальные активности триспецифических молекул, содержащих однодоменное антитело, направленное против PSMA, в анализах уничтожения клеток. Значения EC50 представлены в виде молярных концентраций. Расшифровка сокращений в таблице: P = анти-PSMA однодоменное антитело, C = анти-CD3E scFv, A = однодоменное антитело против альбумина.

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

[00147] В таблице 6 приведены аффинности связывания фаговых библиотек scFv CD3e.

анти-CD3e scFv	K _D (нМ) CD3e человека	kon(1/Мс)	кдисс(1/с)	K _D (нМ) CD3e макака	kon(1/Мс)	кдисс(1/с)	Соотно- шение макак/ человек
Дикий тип	4,4	4,71E+05	2,07	3,9	4,63	1,83+05	0,9
2B2	3,8	6,08E+05	2,32	3,5	5,57E+05	1,93+05	0,9
9F2	4,1	3,61E+05	1,33	3,4	3,38E+05	1,05+05	0,8
5A2	4,3	5,66E+05	2,36	4,2	4,75E+05	1,93+05	1,0
6A2	4,7	5,22E+05	2,48	4,9	4,56E+05	2,22+05	1,0
2D2	6,4	5,27E+05	3,38	6,6	4,71E+05	3,09+05	1,0
3F2	8,0	7,04E+05	5,02	6,6	7,12E+05	4,38+05	0,8
2E4	14,4	4,16E+05	5,99	13,2	4,04E+05	5,32+05	0,9
2H2	16,0	5,87E+05	9,06E-03	16,0	5,25E+05	8,37+05	1,0
10B2	17,9	4,90E+05	8,74E-03	16,6	4,93E+05	8,15+05	0,9
1A2	19,9	5,99E+05	1,19E-02	17	5,31E+05	9,03+05	0,9
1C2	36,8	6,63E+05	2,44E-02	30	6,69E+05	1,97+05	0,8
2A4	46,3	3,64E+05	1,66E-02	43,4	3,53E+05	1,53+05	0,9
10E4	49,8	5,2E+05	2,60E-02	46,8	5,08E+05	2,38+05	0,9
8A5	109	7,46E+05	8,10E-02	103	7,23E+05	7,44+05	0,9
2G5	117	9,94E+05	1,15E-01	115	9,64E+05	1,11+05	1,0
1G4	132,9	1,67E+05	2,20E-02	133,7	1,64E+05	2,19+05	1,0

[00148] Таблица 7: Последовательности

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

			DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSN RWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSRSSQGT LTVSSHHHHHH
2	Триспецифическая α EGFR: α Альбумин: α CD3	E:C:A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTF SSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGST YYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL KPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEY DYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSRSSQGT LTVSSGGGGSGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWA YWGQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSL LGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
3	Триспецифическая α CD3: α EGFR: α Альбумин	C:E:A	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWA YWGQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSL LGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGG SEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGS TYYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSL KPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEY

			DYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSHHHHHH*
4	Триспецифическая α CD3: α Альбумин: α EGFR	C:A:E	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAI NWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTQVTVSSHHHHHH
5	Триспецифическая α Альбумин: α EGFR: α CD3	A:E:C	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAI WSSGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH*
6	Триспецифическая	A:C:E	EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFS

	ческая αАльбумин: αCD3:αEGFR		SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCA ASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFK LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAA SGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINW SSGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFK DYEYDYWGQGTQVTVSSHHHHHHH*
7	EGFR BiTE		DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTN IHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFS GSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN WPTTFGAGTKLELKGGGGSGGGGSGGGG SQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLT NYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWSGGNTD YNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSN DTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTTLV VSASGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYISYWAYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC GSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL HHHHHH
8	EGFR-scFv:C:A	EGFR-scFv:C:A	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTN IHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFS GSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN WPTTFGAGTKLELKGGGGSGGGGSGGGG SQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLT NYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWSGGNTD YNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSN

			DTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVT VSASGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC GSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRL SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVS SISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTL YLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LTVSSHHHHHH
9	Триспецифи- ческая α PSMA: α CD3: α Альбумин	P:C:A	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMIS EYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTD YAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKP EDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSSGGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA SGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYIS YWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFL APGTPARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGG GGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LTVSSHHHHHH
10	Триспецифи- ческая α PSMA: α Альбумин: α C D3	P:A:C	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMIS EYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTD YAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKP EDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVSSGGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LTV

			SSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNSYISYWAYYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRG LIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKL TVLHHHHHHH
11	Триспецифи- ческая α CD3: α Альбумин: α PSMA	C:A:P	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTF NKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWA YWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGG SEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTF SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAAKTTLYLQMNSLR PEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTLSC AASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTI NPAGTTDYAESVKGRFTISRDNAAKNTLYL QMNSLKPEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVT VSSHHHHHHH
12	Триспецифи- ческая α Альбумин: α PSMA: α CD3	A:P:C	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAAKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCA ASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTIN PAGTTDYAESVKGRFTISRDNAAKNTLYLQ MNSLKPEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVT SSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC AASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGN SYISYWAYYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGG

			SGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS STGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHH HHHH*
13	Триспецифи- ческая α Альбумин: α CD3: α PSMA	A:C:P	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLSCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAAKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCA ASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAA SRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINP AGTTDYAESVKGRFTISRDNAAKNTLYLQM NSLKPEDTAVYYCDGYGYRGQGTQVTVS SHHHHHH*
14	Триспецифи- ческая α PSMA- scFv: α CD3: α Альбумин	PSMA- scFv:C:A	QVQLVESGGGLVKPGESLRSLSCAASGFTFS DYMYWVRQAPGKGLEWVAIISDGGYYT YYSDIKGRFTISRDNAAKNSLYLQMNSLKA EDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRTITCKASQNVDTNVAWYQQ KPGQAPKSLIYSASYRYSVPSRFSGSASG TDFTLTISSVQSEDFATYYCQQYDSYPYTF GGGKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGG GGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ APRGLIGGTFLAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGG GTKLTVLGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ

			PGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGS LSRSSQGTLLTVSSH HHHHHH
15	PSMA BiTE		QVQLVESGGGLV KPGESLRLSCAASGFTFS DYMYWVRQAPGKGLEWVAIISDGGYYT YYSDIHKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLKA EDTAVYYCARGFLLRHGAMDYWGQGTL VTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRTITCKASQNVDTNVAWYQQ KPGQAPKSLIYSASYRSDVPSRFSGSASG TDFTLTISSVQSEDFATYYCQQYDSYPYTF GGGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYISYWAYWGQGTLTVTSSGG GGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGG GTKLTVLHHHHHHH
16	Триспецифи- ческая Her2- Финомер:αCD 3:αАльбумин		GVTLFVALYDYTSYNTRDLSFHKGEKFQIL RMEDGVWWEARSLTTGETGYIPSNYVAP VDSIQGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYISYWAYWGQGTLTVTSSGGG GSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAP RGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVLGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG NSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGK GLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLS RSSQGTLLTVSSH HHHHHH*
17	Триспецифи- ческая	A:M:C	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRP

	α CD3: α Альбумин: α MSLN		EDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSGGG GSGGGSQVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCA ASDFDFAAYDMSWVRQAPGQGLEWVAIIS HDGIDKYYDDSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNTLRAEDTATYQCLRLGAVGQGTLLTV VSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGS GGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VT LTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTK LTVLHHHHHH
18	Триспецифическая α Альбумин: α MSLN: α CD3	A:M:C	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSGGG GSGGGSQVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCA ASDFDFAAYDMSWVRQAPGQGLEWVAIIS HDGIDKYYDDSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNTLRAEDTATYQCLRLGAVGQGTLLTV VSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGS GGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VT LTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPR GLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTK LTVLHHHHHH
19	Триспецифическая α Альбумин: α CD3: α MSLN	A:C:M	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS SFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRP EDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLLTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCA ASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY

			ISYWAYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGG SGGGSQVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAA SDFDFAAYDMSWVRQAPGQGLEWVAISH DGIDKYYDDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNTLRAEDTATYQCLRLGAVGQGLVTV SSHHHHHH*
--	--	--	--

[00149] Таблица 8: Последовательности

SEQ ID NO:	Связывающий элемент	Название	Цепь	Последовательность
20	CD3	Анти-huCD3E-scFv		DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRY TMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQK FKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARYYDDHYCLDYWGQGTTTLTVSSVEGGSGG SGGSGGSGGVDDIQLTQSPAISASPGEKVTM TCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSK VASGVPIRFSGSGSGTSYSLTISMEADAATY YCQQWSSNPLTFGAGTKLELK
21	CD3	Анти-huCD3E	Варибельная тяжелая	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFKFSGY GMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDGSKKYYV DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARQMGYWHFDLWGRGTLTVSS
22	CD3	Анти-huCD3E	Варибельная легкая	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRAITGIPARFSGSG SGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTF GGGTKVEIK
23	CD3	Анти-huCD3E	Варибельная тяжелая	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFP MAWVRQAPGKGLEWVSTISTSGGRTYYRDSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKFRQYSGGFDYWGQGTLTVSS
24	CD3	Анти-huCD3E	Варибельная легкая	DIQLTQPNVSTSLGSTVKLSCTLSGNIENNY VHWYQLYEGRSPTTMIYDDDKRPDGVPRFS GSIDRSSNSAFLTIHNVAIEDEAIYFCHSYVSSF NVFGGGTKLTVLR
25	CD3	Анти-huCD3E-scFv		DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTR YTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYAD SVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYY CARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEGTSTG SGGSGGSGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKV ASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEADAATYY CQQWSSNPLTFGGGTKVEIK
26	CD3	Анти-huCD3E (гуманизированный ОКТ3)	Варибельная тяжелая	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRY TMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQK VKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYF CARYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSS
27	CD3	Анти-huCD3E (гуманизированный)	Варибельная легкая	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMN WYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSG SGTDYFTFTISLQPEDATYYCQQWSSNPFTFG QGTLQITR

		й ОКТЗ)		
28	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная тяжелая	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTY AMNWVRQAPGKGLEWVSRIISKYNNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS
29	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная легкая	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTS NYANWVQEKPGQAIFRGLIGGTNKRAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYS NLWVFGGGTKLTVL
30	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная тяжелая	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDY TMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSGIYADS VKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYY CAKDNSGYGHYYYGMDVWGQGTITVTVAS
31	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная легкая	AEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSN LAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQHYINWPLT FGGGTKVEIK
32	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная тяжелая	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTR STMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSSAYTNYNQ KFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY YCASRQVHYDYNQFPYWGQGTLLTVSS
33	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная легкая	QVVLTTQSPAIMSAFPGEKVTMTCSASSSVSYM NWYQQKSGTSPKRWIYDSSKLASGVPARFSGS GSGTSYSLTISSMETEDAATYYCQQWSRNPPTF GGGTKLQITR
34	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная тяжелая	EVKLLESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTY AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYY ADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTA MYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSA
35	CD3	CD3- связываю щий элемент	Вариабель ная легкая	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSN YANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFS GSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNL WVFGGGTKLTVLG
36	CD3	гуманизи рованный scFv		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTY AMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS SGGGGSGGGGSGGGGSGQAVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
37	CD3	CD3- связываю щий		QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTR YTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQ KFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY

		элемент		YCARYYDDHYSLDYWGGQTTLTVSSAKTTPD IVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMN WYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGS GSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFT FGSGTKLEINRADTAAAGSHHHHHH
38	HSA	Только домен VH		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKY WMSWVRQAPGKGLEWVSSIDFMGPHTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGRTSMLPMKGKFDYWGQGTLLTVSS
39	HSA	Только домен VH		EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFDEY NMSWVRQAPGKGLEWVSTILPHGDRITYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKQDPLYRFDYWGQGTLLTVSS
40	HSA	Только домен VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQKIATYL NWKYQQKPGKAPKLLIYRSSLQSAVPSRFSGS GSGTVFTLTISSLQPEDFATYYCQQTAVPPTF GQGTKVEIKR
41	HSA	Только домен VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYRNSPLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYRVPPTFG QGTKVEIKR
42	HSA	MSA21		QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRF GMTWVRQAPGKGVEWVSGISSLG DSTLYADS VKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYY CTIGGSLNPGGQGTQVTVSS
43	HSA	Неприрод ные консенсу сные альбумин - связываю щие домены		LKEAKEKAIEELKKAGITSDYYFDLINKAKTVE GVNALKDEILKA
44	HSA	анти- ALB FAB	Вариабель ная тяжелая	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGIDLSNY AINWVRQAPGKC LEWIGIIWASGTTFYATWAK GRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA RTVPGYSTAPYFDLWGQGTLLTVSS
45	HSA	анти- ALB FAB	Вариабель ная легкая	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQSSPSVWSNF LSWYQQKPGKAPKLLIYEASKLTSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGGGYSSISDTT FGCGTKVEIKRT
46	HSA	Только HSA VH		AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSF GMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTQVTVSS

47	HSA	Только HSA VH		EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTLVTVSS
48	HSA	Только HSA VH		AVQLVESGGGLVQGGGSLRLACAASERIFDLN LMGWYRQGPGENERELVATCITVGDSTNYADS VKGRFTISMDYTKQTVYLHMNSLRPEDTGLY YCKIRRTWHSELWGQGTQVTVSS

[00150] В то время как в настоящем изобретении были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления приведены только в качестве примера. Многочисленные варианты, изменения и замены будут очевидны специалистам в данной области техники без отступления от сущности изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящем изобретении, могут быть использованы в практической реализации изобретения. Предполагается, что последующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения, и что способы и конструкции в пределах объема данных требований и их эквивалентов, таким образом, будут покрыты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Триспецифический антигенсвязывающий белок, причем триспецифический антигенсвязывающий белок содержит

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

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

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

причем домены соединены в порядке $H_2N-(A)-(C)-(B)-COOH$ или $H_2N-(B)-(A)-(C)-COOH$ с помощью линкеров L1 и L2; причем линкеры L1 и L2 независимо представляют собой $(GS)_n$ (SEQ ID NO: 49), $(GGS)_n$ (SEQ ID NO: 50), $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 51), $(GGSG)_n$ (SEQ ID NO: 52) или $(GGSGG)_n$ (SEQ ID NO: 53), $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 54), причем n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10; причем триспецифический антигенсвязывающий белок имеет сродство к связыванию с опухолевым антигеном-мишенью, составляющее 200 нМ или менее; и

причем триспецифический антигенсвязывающий белок имеет размер меньше чем 60 кДа.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12. Полинуклеотид, кодирующий триспецифический антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-11.

13. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.12.

14. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.12 или вектор по п.13.

15. Фармацевтическая композиция для лечения пролиферативного заболевания индивидуума, содержащая (i) триспецифический антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-11, полинуклеотид по п.12 или вектор по п.13 и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

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

17. Применение по п. 16, в котором рак представляет собой гематологический рак.

18. Применение по п. 16, в котором рак представляет собой рак с солидной опухолью.

19. Применение по п. 17, в котором рак с солидной опухолью представляет собой рак молочной железы, рак легкого, рак предстательной железы, рак яичников или рак поджелудочной железы.

20. Применение по п. 16, в котором лекарственное средство предназначено для введения в сочетании с химиотерапией, гормональной терапией, радиотерапией, генной терапией или иммунотерапией.

21. Применение по п. 16, в котором лекарственное средство предназначено для введения в комбинации с антидиарейным средством, антирвотным средством, анальгетиком, опиоидом и/или нестероидным противовоспалительным средством.

22. Применение триспецифического антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1-6, полинуклеотида по п.12 или вектора по п.13 для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния, связанного с PSMA у индивидуума, причем указанный (с) третий домен (C) содержит sdAb, который специфически связывается с опухолевым антигеном-мишенью, который представляет собой PSMA.

23. Применение триспецифического антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1-6, полинуклеотида по п.12 или вектора по п.13 для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния, связанного с MSLN у индивидуума, причем указанный (с) третий домен (C) содержит sdAb, который специфически связывается с опухолевым антигеном-мишенью, который представляет собой MSLN.

24. Применение триспецифического антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1-11, полинуклеотида по п.12 или вектора по п.13 для изготовления лекарственного средства для стимулирования иммунной системы индивидуума.

25. Триспецифический антигенсвязывающий белок, причем триспецифический антигенсвязывающий белок содержит

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

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

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

причем домены соединены в порядке $H_2N-(A)-(C)-(B)-COOH$ или $H_2N-(B)-(A)-(C)-COOH$, или с помощью линкеров L1 и L2, причем линкеры L1 и L2 независимо представляют собой GGGGSGGGG (аминокислотные остатки 128-136 из SEQ ID NO: 1) и $(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO: 56),

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

причем триспецифический антигенсвязывающий белок имеет размер меньше чем 60 кДа.

26. Полинуклеотид, кодирующий триспецифический антигенсвязывающий белок по п.25.

27. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.26.

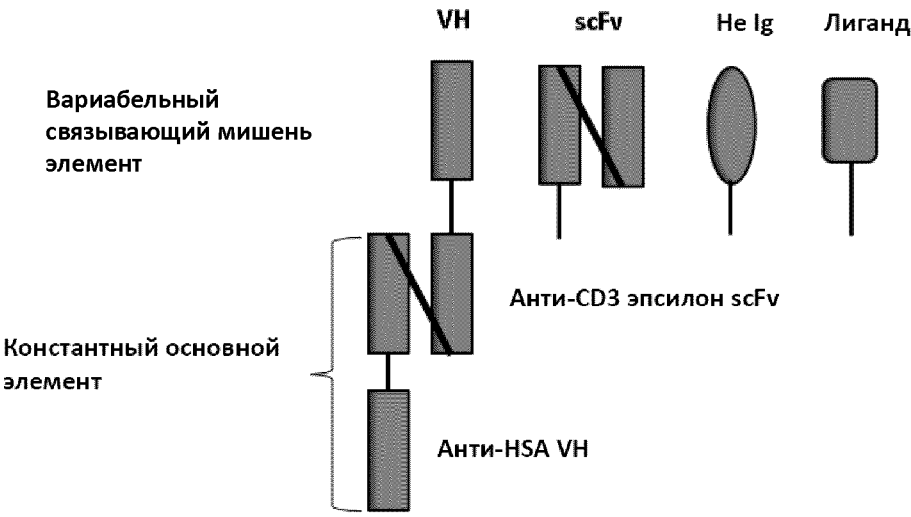
28. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.26 или вектор по п.27.

29. Фармацевтическая композиция для лечения пролиферативного заболевания индивидуума, содержащая (i) триспецифический антигенсвязывающий белок по п. 25, полинуклеотид по п.26 или вектор по п.27 и (ii) фармацевтически приемлемый носитель.

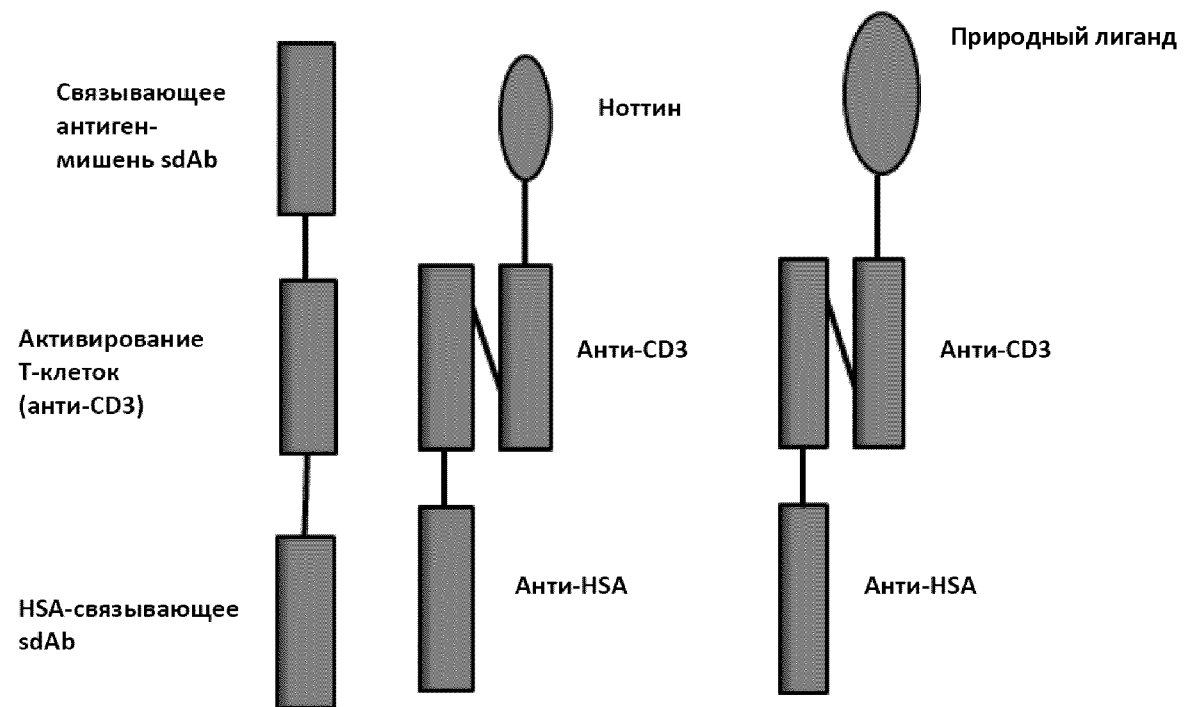
30. Применение триспецифического антигенсвязывающего белка по п.25, полинуклеотида по п.26 или вектора по п.27 для изготовления лекарственного средства для стимулирования иммунной системы индивидуума.

По доверенности

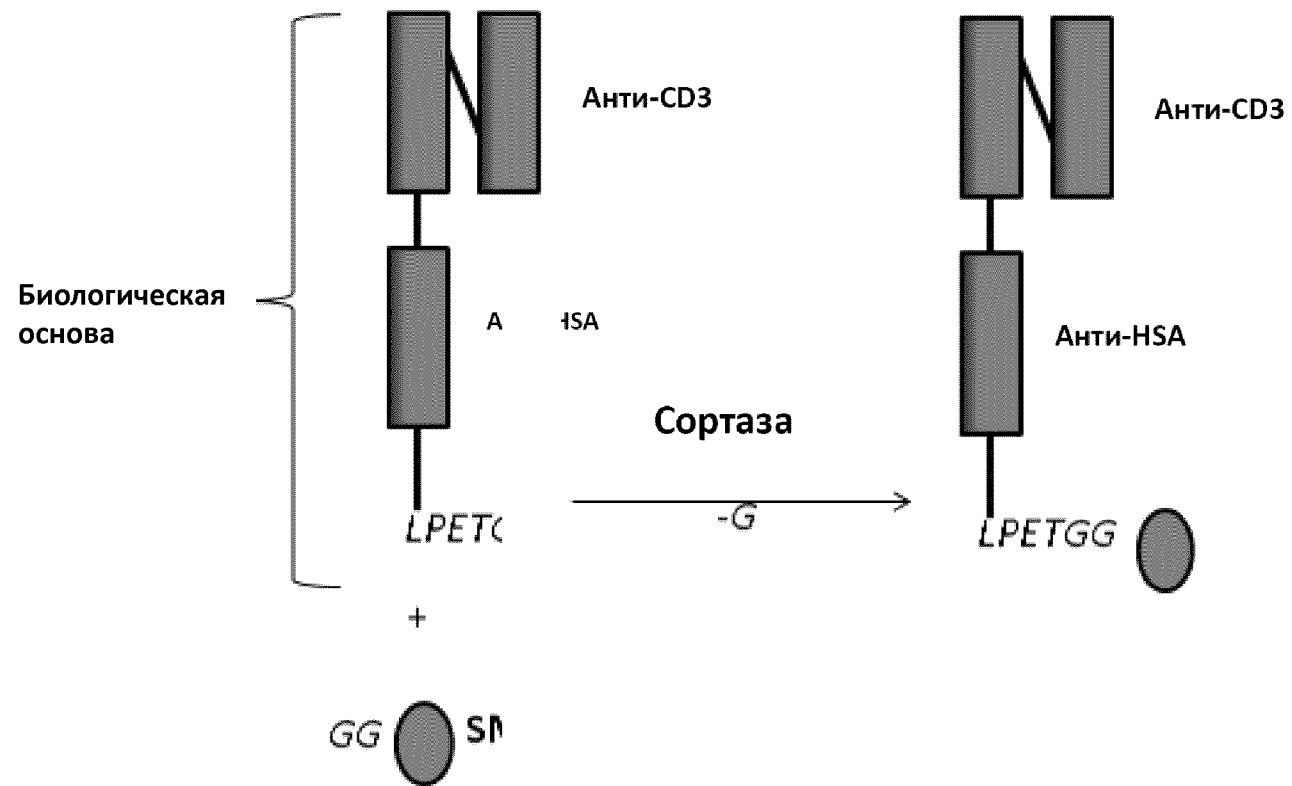
Фигура 1



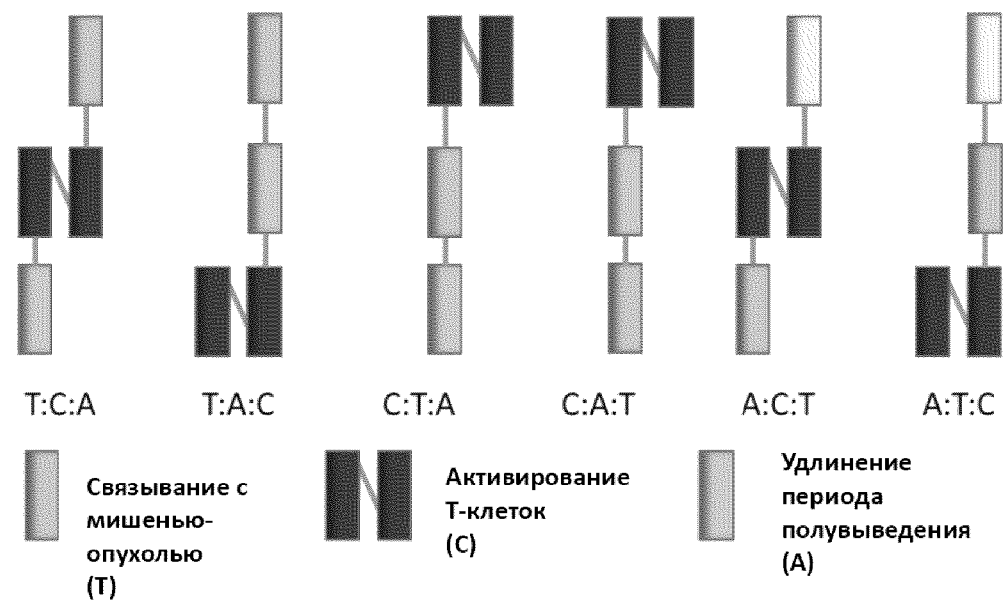
Фигура 2



Фигура 3

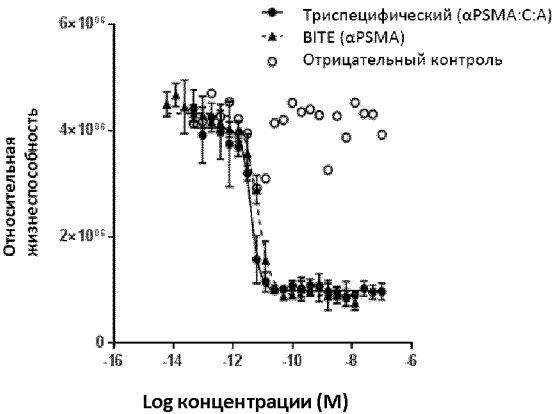


Фигура 4

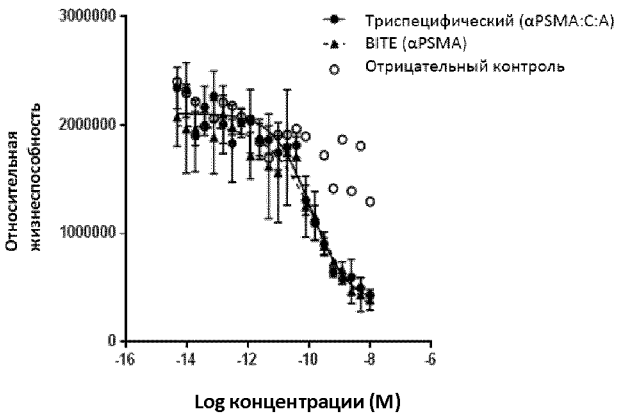


Фигура 5

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

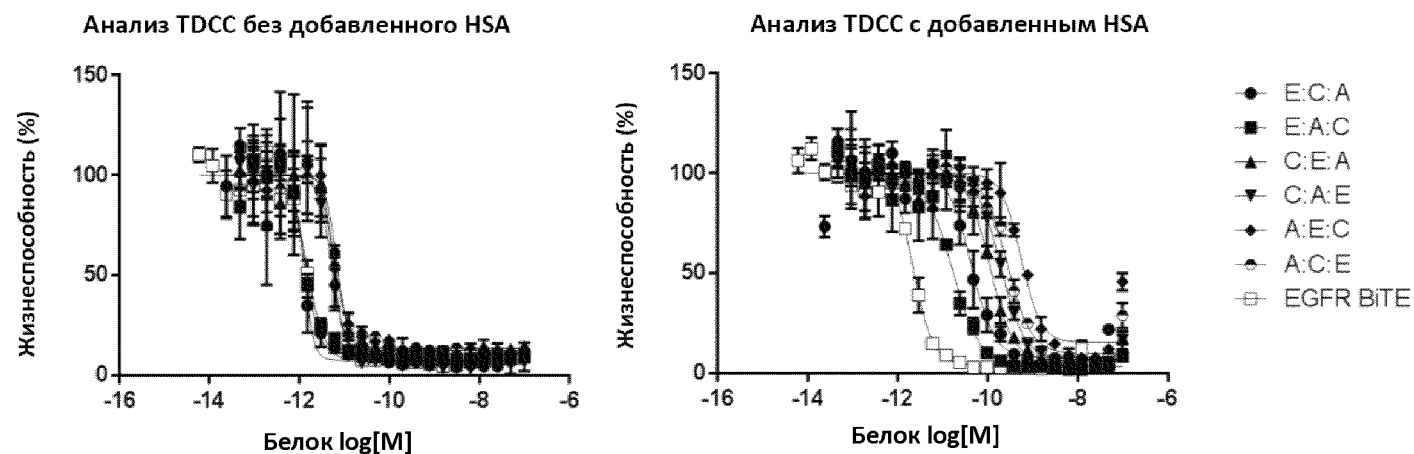


Опосредованный Т-клетками лизис клеток
линии 22Rv1 рака простаты направленными
против PSMA активаторами Т-клеток



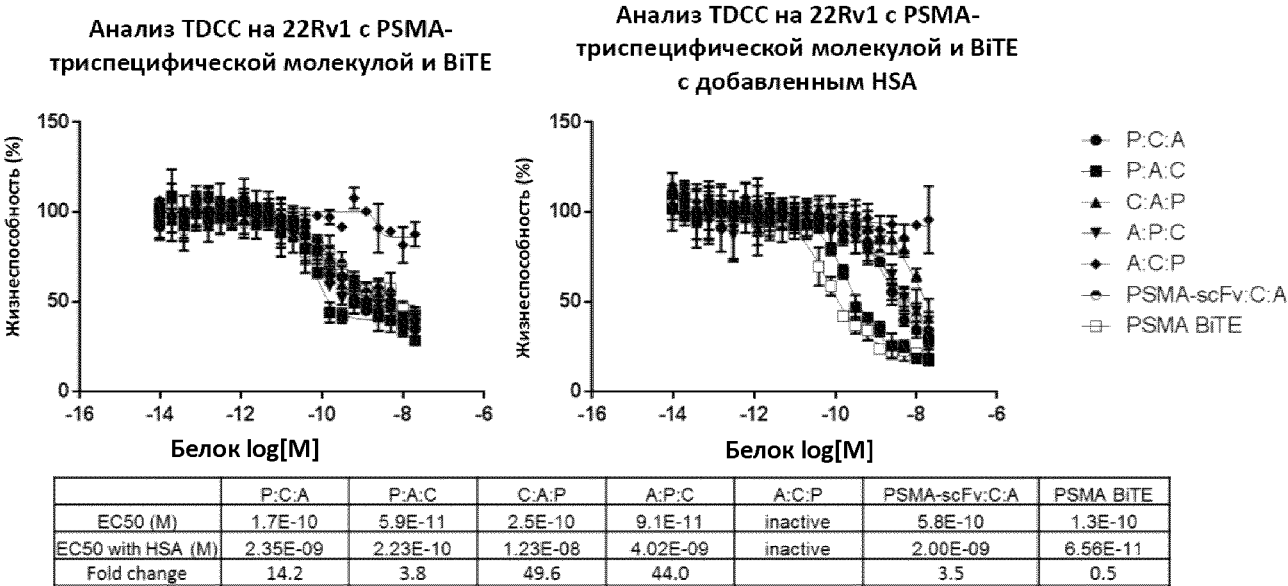
	Триспецифический (EGFR)	BiTE (EGFR)	Триспецифический (PSMA)	BiTE (PSMA)
EC ₅₀ (pM)	3.9	6.4	113	189

Фигура 6



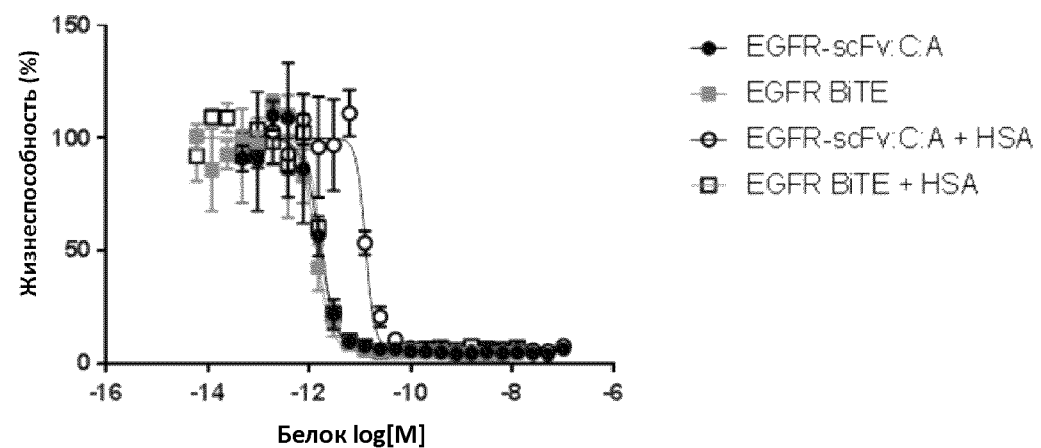
	E:C:A	E:A:C	C:E:A	C:A:E	A:E:C	A:C:E	EGFR BiTE
EC50 (M)	1.3E-12	1.4E-12	5.6E-12	5.5E-12	6.9E-12	6.1E-12	1.5E-12
EC50 with HSA (M)	4.5E-11	1.7E-11	1.1E-10	2.0E-10	5.6E-10	2.8E-10	2.3E-12
Fold change	35.4	12.3	20.4	36.2	81.5	45.5	1.5

Фигура 7



Фигура 8

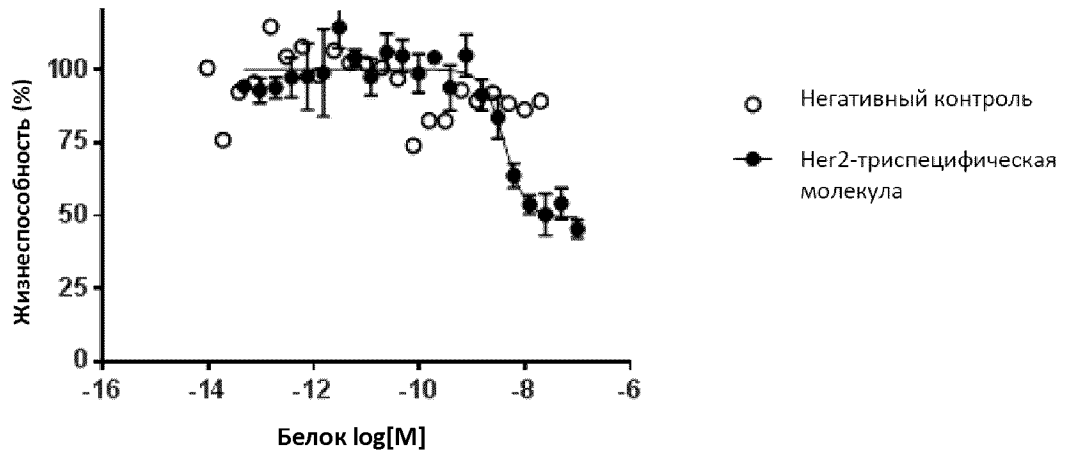
Активность триспецифической молекулы EGFR-scFv и EGFR-BiTE при анализе TDCC NCI-1563



	EGFR-scFv:C:A	EGFR BiTE
EC50 (M)	1.6E-12	1.3E-12
EC50 with HSA (M)	1.3E-11	1.7E-12
Fold change	7.8	1.3

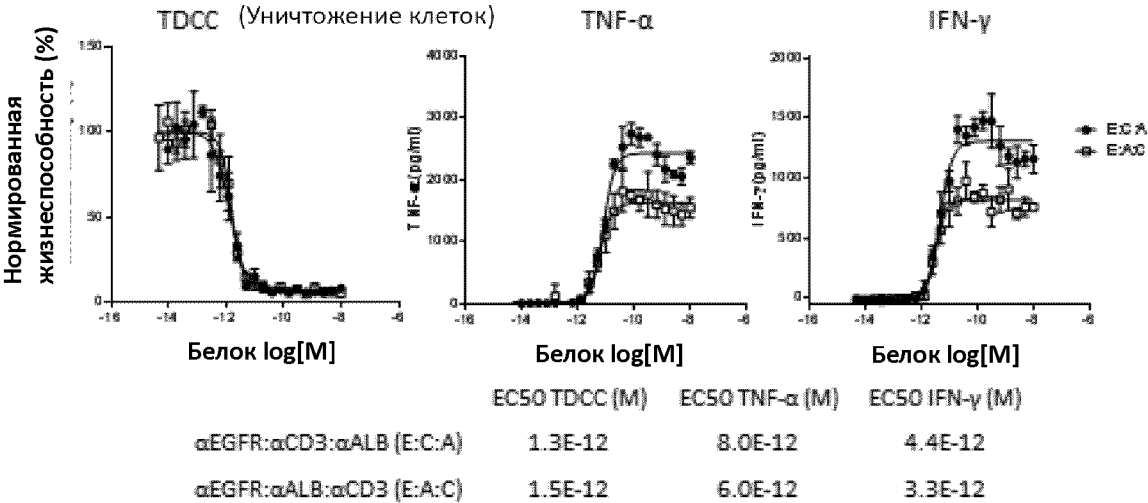
Фигура 9

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

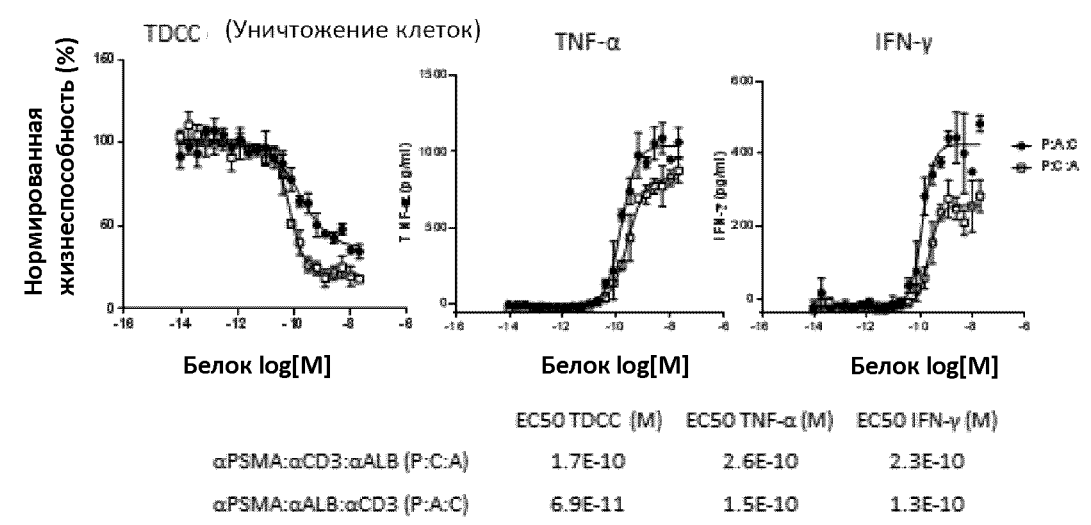


	Триспецифическая молекула (Her2)
EC ₅₀ (nM)	4.1

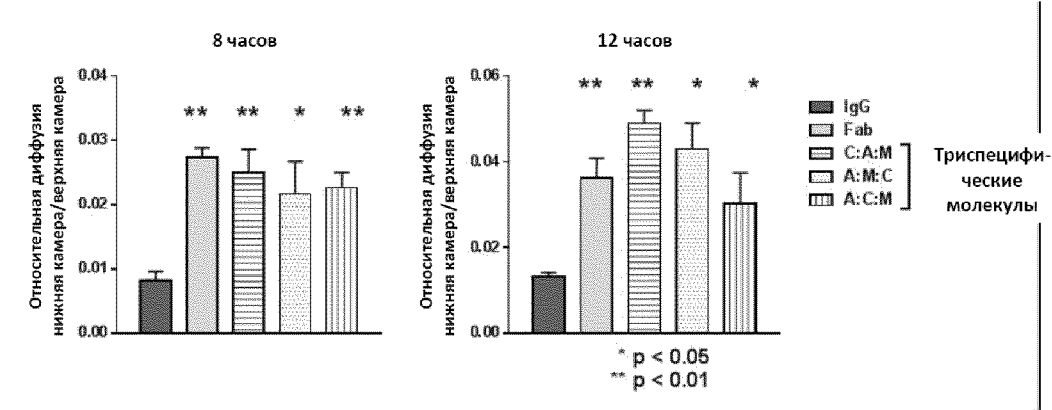
Фигура 10



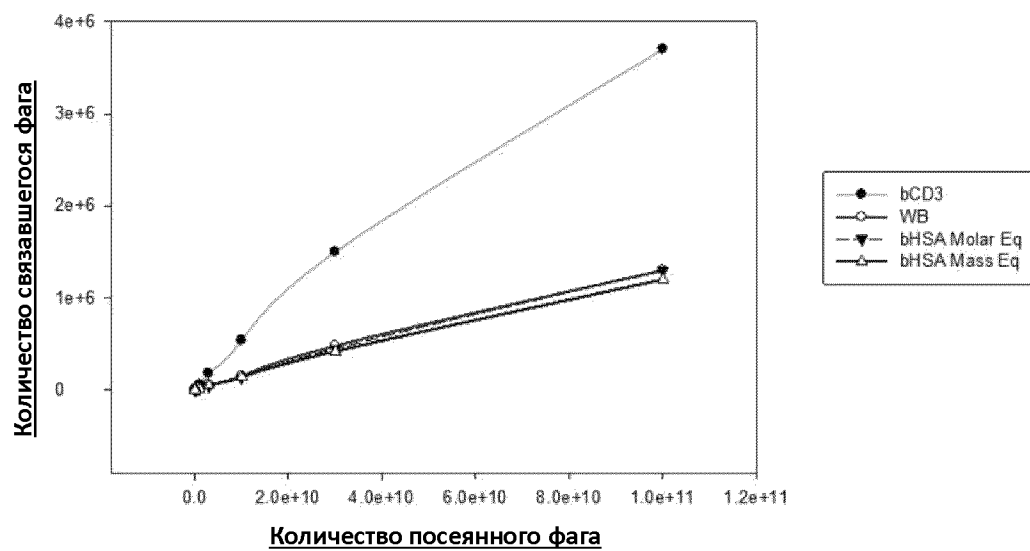
Фигура 11



Фигура 12



Фигура 13



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 47517-701601	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 16/33644	International filing date (<i>day/month/year</i>) 20 May 2016 (20.05.2016)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 21 May 2015 (21.05.2015)
Applicant HARPOON THERAPEUTICS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 6
☒ as suggested by the applicant.
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/33644

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/33644

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-46, 50-53
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/33644

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395, A61K 47/48, C07K 16/28 (2016.01) CPC - A61K 2039/505, C07K 16/2809, C07K 16/468, C07K 2317/31 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 39/395, A61K 47/48, C07K 16/28 (2016.01) CPC - A61K 2039/505, C07K 16/2809, C07K 16/468, C07K 2317/31 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C07K 2317/50, C07K 2317/73, C07K 2317/90 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar Search terms: CD3, cluster of differentiation 3, trispecific, tri-specific, multispecific, multi-specific, antibody, single-chain variable fragment, scFv, half-life, half life, extend, prolong, increase, improve, human, serum albumin		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/0017200 A1 (Scheer et al.) 17 January 2013 (17.01.2013) para [0003], [0026], [0050], [0054], [0083], [0137], [0143], [0148], [0314], [0325], [0336], [0370], [0376], [0381]	1-5, 47-49, 54-57
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 August 2016 (06.08.2016)		Date of mailing of the international search report 06 SEP 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774